



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Proyecto de Investigación:

**“Promoción de la permeación transdérmica de ranitidina mediante su  
formulación en sistemas submicrónicos”**

Línea de Investigación:

Diseño y Producción de Formas Farmacéuticas (DPFF)

Presenta:

Irene de Jesús Martínez Segoviano

Matrícula: 2121801458

Tutor:

Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

Asesores:

Dra. Luz María Melgoza Contreras

Dra. Elizabeth Piñón Segundo

**“Promoción de la permeación transdérmica de ranitidina mediante su  
formulación en sistemas submicrónicos”**

**COMITÉ TUTORAL**

Tutor:

---

Vo. Bo. Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

Asesores:

---

Vo. Bo. Dra. Luz María Melgoza Contreras

---

Vo. Bo. Dra. Elizabeth Piñón Segundo

Alumna:

---

Q.F.B Irene de Jesús Martínez Segoviano

Matricula: 2121801458

**“Promoción de la permeación transdérmica de ranitidina mediante su  
formulación en sistemas submicrónicos”**

**JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Presidente:

---

Dra. María Josefa Bernad Bernad

Vocal:

---

Dra. María Guadalupe Nava Arzaluz

Secretario:

---

Dra. Luz María Melgoza Contreras

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por brindar las áreas en las que desarrolle mis actividades académicas durante la maestría.

A la Maestría en Ciencias Farmacéuticas, por el apoyo ante cualquier duda y a los profesores por los conocimientos compartidos.

A CONACyT porque gracias a la beca pude realizar una de mis metas en la vida: estudiar una maestría (CVU/Becario 446058/270497).

Al laboratorio de Investigación y Posgrados en Tecnología Farmacéutica Laboratorio L-323, Campo 1 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por los materiales y equipos brindados durante la realización del proyecto experimental.

A mis asesores la Dra. Adriana Ganem, la Dra. Elizabeth Piñón y la Dra. Luz Melgoza, por su apoyo incondicional, paciencia y por compartir sus conocimientos para poder comprender y realizar el trabajo experimental.

A mis padres por todo el apoyo y el cariño, en especial a mi mamá por estar conmigo en todo el proceso desde el examen de admisión hasta la culminación del proyecto.

A mis hermanos por ayudarme siempre en lo que necesite para poder terminar la tesis. En especial a mi hermano Bruno por el apoyo con la edición de algunas imágenes.

A mi esposo Arturo por darme ánimos durante la realización del proyecto experimental, por su comprensión y amor.

A dios por darme vida para terminar la maestría.

## RESUMEN

La ranitidina se utiliza en el tratamiento del reflujo gastroesofágico en bebés, está disponible para su administración en el mercado por vía oral; sin embargo, su biodisponibilidad es muy variable entre los sujetos, especialmente entre los neonatos (40-80%), esto debido al efecto del primer paso. Por ello, es necesario contar con una vía de administración alterna, en este sentido la vía transdérmica o percutánea puede considerarse como una alternativa. Esta vía es útil para fármacos con características fisicoquímicas (peso molecular bajo, solubilidad > 1mg/mL y coeficiente de partición entre 1-3) y farmacocinéticas (tiempos de vida media cortos y potencia elevada) idóneas. Una de las ventajas de esta vía es que se evitan las molestias digestivas que acompañan la administración de algunos fármacos por vía oral y se obtienen concentraciones plasmáticas sostenidas de fármaco durante largos periodos de tiempo, además de tener una mejor aceptación por parte del paciente.

Por otro lado la piel está compuesta por la epidermis, dermis e hipodermis, siendo en la epidermis donde se encuentra el estrato córneo, el cual funciona como una barrera semipermeable que no deja pasar en este caso a los fármacos, por lo cual para administrar un fármaco éste debe formularse en sistemas que favorezcan su absorción, de modo que pueda alcanzar el torrente sanguíneo.

En el presente trabajo se propone la vía transdérmica como una alternativa para la administración de ranitidina, evitando los inconvenientes antes señalados de la vía oral. Para ello se desarrollaron dos sistemas submicrónicos (microemulsiones y liposomas): que contienen ranitidina. Se formularon dos microemulsiones (ME) utilizando como surfactantes Brij<sup>®</sup> 58 y Brij<sup>®</sup> 96 y liposomas con fosfatidilcolina: colesterol 40:10, estudiando la liberación y permeación *in vitro* del fármaco a partir de estos sistemas. Los resultados mostraron que en general todos los sistemas son capaces de modular la liberación de ranitidina, presentando diferentes cinéticas, y aunque los flujos obtenidos muestran una baja permeación a través de la piel, tomando en cuenta la cantidad de ranitidina que alcanzó el medio

receptor, se estima que un sistema con un área de 18.65 cm<sup>2</sup> (para liposomas), 19.55 cm<sup>2</sup> (para ME con Brij<sup>®</sup> 58) y 20.83 cm<sup>2</sup> (para ME con Brij<sup>®</sup> 96) sería suficiente para alcanzar concentraciones terapéuticas en un lapso de 24 h.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	10
<b>1. ANTECEDENTES TEÓRICO</b> .....	12
1.1. La piel .....	12
1.1.1. Anatomía y fisiología.....	13
1.1.1.1. Epidermis.....	13
1.1.1.2. Dermis.....	15
1.1.1.3. Hipodermis (tejido subcutáneo).....	15
1.1.2. Absorción percutánea.....	16
1.2. Vía de administración transdérmica.....	16
1.2.1. Factores que influyen en la liberación de los fármacos.....	18
1.2.2. Rutas de permeación .....	20
1.2.3. Promotores de permeación/penetración .....	21
1.2.3.1. Promotores químicos.....	22
1.2.3.2. Nanoacarreadores.....	¡Error! Marcador no definido.
1.2.3.3. Promotores físicos.....	33
1.2.4. Estudios de permeación.....	33
1.3. Reflujo gastroesofágico .....	35
1.3.1. Definición .....	35
1.3.2. Epidemiología .....	36
1.3.3. Diagnóstico.....	36
1.3.4. Tratamiento .....	37
1.3.1.1. Farmacológico.....	38
1.3.1.1.1. Antagonistas de los receptores H <sub>2</sub> .....	38
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	42
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	43
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	44



<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
<b>6.1. Caracterización de ranitidina HCl.....</b>	<b>59</b>
<b>6.2. Validación de los métodos para la cuantificación de ranitidina HCl .....</b>	<b>63</b>
<b>6.2.1.Ranitidina HCl en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4.....</b>	<b>63</b>
<b>6.2.2.Ranitidina HCl en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en             contacto con piel de cerdo.....</b>	<b>65</b>
<b>6.2.3.Método de extracción del fármaco remanente en la piel.....</b>	<b>66</b>
<b>6.3. Microemulsiones con ranitidina HCl.....</b>	<b>68</b>
<b>6.3.1.Microemulsiones con miristato de isopropilo como fase oleosa .....</b>	<b>68</b>
<b>6.3.2.Microemulsiones con aceite mineral como fase oleosa.....</b>	<b>73</b>
<b>6.3.2.1.Formulación de microemulsiones.....</b>	<b>73</b>
<b>6.3.2.2.Caracterización de las microemulsiones.....</b>	<b>76</b>
<b>6.3.2.3. Permeación <i>in vitro</i> y extracción del fármaco en la piel.....</b>	<b>79</b>
<b>6.3.2.4. Liberación <i>in vitro</i> del fármaco a partir de las microemulsiones.....</b>	<b>88</b>
<b>6.4.Liposomas preparados con ranitidina HCl .....</b>	<b>94</b>
<b>6.4.1.Efecto del método para determinar tasa de encapsulamiento para los             liposomas.....</b>	<b>94</b>
<b>6.4.2.Influencia del tamaño de vesícula de las formulaciones preparadas .....</b>	<b>95</b>
<b>6.4.3.Caracterización de liposomas .....</b>	<b>96</b>
<b>6.4.4.Permeación <i>in vitro</i> y extracción del fármaco en la piel.....</b>	<b>98</b>
<b>6.4.5.Liberación <i>in vitro</i> del fármaco a partir de los liposomas.....</b>	<b>102</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>104</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>105</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>106</b>

## INTRODUCCIÓN

El reflujo gastroesofágico (RGE) se define como el paso del contenido gástrico hacia el esófago. Ocurre en más de dos tercios de los lactantes menores de un año de edad y ha sido asociado al síndrome de muerte súbita del lactante y al “casi ahogamiento”, así como a enfermedades respiratorias crónicas como hiperactividad bronquial, tos crónica, estridor y neumonía recurrentes.

De los fármacos que inhiben la secreción gástrica de ácido clorhídrico, el más utilizado es la ranitidina, a razón de 4 a 8 mg/Kg/día repartidos en dos a tres dosis. Este medicamento es bien tolerado, sin reacciones colaterales.

La administración de la forma farmacéutica oral en bebés (tabletas y suspensión de ranitidina) puede presentar algunas desventajas entre las más importantes se pueden mencionar: el efecto del primer paso, irritabilidad gastrointestinal y dificultad para administrar; además de la alta variabilidad en la biodisponibilidad de la ranitidina entre sujetos pediátricos (40-80%); la vía transdérmica es mucho más sencilla de administrar y permite una liberación constante del fármaco durante un periodo determinado y en el caso de presentarse alguna reacción adversa se puede retirar el dispositivo sin mayor complicación.

Sin embargo, la piel es una membrana casi impermeable la cual impide el paso de diversas sustancias a través de ella (entre ellas los fármacos), debido a esto se han buscado alternativas para mejorar la permeación transdérmica de fármacos, una de estas es el uso de nanoacarreadores.

Debido a las ventajas que ofrece la administración transdérmica, así como la posibilidad de encapsular la ranitidina en vesículas, el presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar sistemas submicrónicos que contuvieran ranitidina como una alternativa para el tratamiento del RGE en bebés debido a su fácil aplicación y comodidad para el paciente. Se formularon dos microemulsiones agua/aceite utilizando como fase oleosa aceite mineral y tensoactivos no iónicos (debido a su

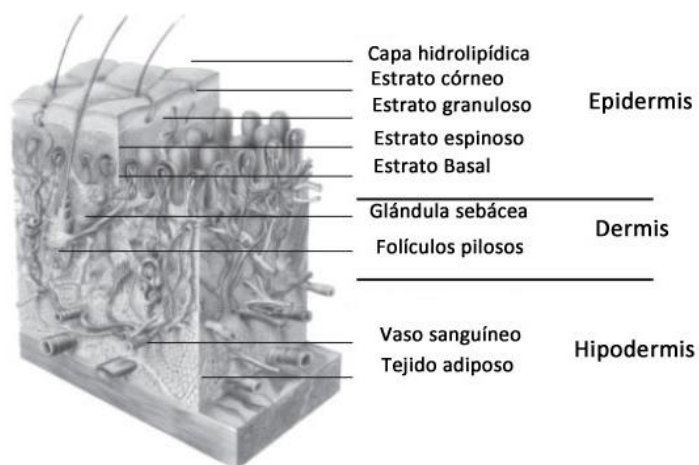
baja toxicidad); así como liposomas, cuya composición y estructura es similar a la de las membranas biológicas. Los sistemas se caracterizaron y se estudió la liberación de ranitidina y su permeación a través de piel *in vitro*.

# 1. ANTECEDENTES TEÓRICOS

## 1.1. La piel

La piel es el órgano más grande, mide alrededor de 1.5-2 m<sup>2</sup>, representa aproximadamente el 16 % del peso total del cuerpo y está dividida en tres capas: epidermis, dermis e hipodermis<sup>1</sup> como se muestra en la figura 1. Una piel sana transmite una sensación de bienestar y reacciona con intensidad ante los sentidos. Muchas enfermedades se detectan por las alteraciones de la piel.<sup>2</sup> Las principales funciones de la piel son:

- Actúa como una barrera que protege contra agentes físicos, químicos y biológicos del medio externo (p. ej., barrera mecánica, barrera de permeabilidad, barrera ultravioleta).<sup>3</sup>
- Participa en la homeostasis al regular la temperatura corporal y la pérdida de agua.<sup>3</sup>
- Desempeña funciones endocrinas al secretar hormonas, citosinas y factores de crecimiento y al convertir moléculas precursoras en las moléculas maduras con actividad hormonal (Vitamina D).<sup>3</sup>
- Interviene en la excreción a través de la secreción exocrina de las glándulas sudoríparas écrinas y apócrinas y las glándulas sebáceas.<sup>3</sup>



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura de la piel.<sup>18</sup>

Además ciertas sustancias liposolubles pueden ser absorbidas a través de la piel. Aunque en sí misma no es una función de la piel, esta propiedad se aprovecha con frecuencia para la administración de agentes terapéuticos. <sup>3</sup>

### **1.1.1. Anatomía y fisiología**

Existen diferentes estructuras que actúan como barrera para la penetración de fármacos: la capa epicutánea (un manto ácido y una capa acuosa), la capa electrolítica subcórnea, la epidermis, la unión dermoepidérmica, la dermis y la unidad pilosebácea. <sup>4</sup>

#### **1.1.1.1. Epidermis**

Una de las capas fundamentales de la piel es la epidermis, estratificada y queratinizada; es una estructura que se renueva continuamente a la que se asocian anexos, folículos pilosebáceos y glándulas sudoríparas, está constituida en su mayor parte por células epiteliales de origen ectodérmico, los queratinocitos.<sup>5, 6</sup> Tiene un espesor de 0.4 a 1.5 mm, mientras que el espesor total de la piel es de 1.5 a 4.0 mm.<sup>5</sup>

#### **Capas de la epidermis**

Las capas que forman la epidermis, de adentro hacia fuera, reciben el nombre de *estrato basal*, *estrato espinoso*, *estrato granuloso*, *estrato lúcido* y *estrato córneo*.  
7

Estrato basal. Los queratinocitos del estrato basal, células cilíndricas o cúbicas, establecen una unión sólida con la dermis subyacente por medio de una

membrana basal, además garantizan la renovación de la epidermis gracias a la presencia de células madre (alrededor del 10%), que generan una población de células amplificadoras de la mitosis.<sup>6</sup>

Estrato espinoso. Está constituido por entre cuatro y ocho estratos, formados por células poliédricas de tamaño mayor que los queratinocitos basales y que se unen entre sí por numerosos desmosomas, lo que le confiere un aspecto “espinoso” al observarla mediante el microscopio óptico.<sup>6</sup>

Estrato granuloso. En esta capa comienza a formarse la envoltura de células queratinizadas.<sup>5</sup> Durante la diferenciación, los queratinosomas aumentan de tamaño, se acercan a la porción apical de los queratinocitos y vierten su contenido en los espacios intercelulares. Este proceso se vuelve especialmente masivo en la transformación de los queratinocitos granulosos más superficiales en corneocitos: los queratinocitos cornificados.<sup>7</sup>

Estrato lúcido. Es una línea intensamente eosinófila ubicada por debajo de la capa córnea y se le identifica en los sitios donde ésta es gruesa (palmas de las manos y plantas de los pies).<sup>8</sup>

Estrato córneo. La completa diferenciación de las células granulosas produce capas apiladas de células anucleadas, queratinizadas, aplanadas, que forman el estrato córneo. Esta capa proporciona a la piel protección mecánica y constituye una barrera para la pérdida de agua y la penetración de sustancias solubles desde el ambiente. La barrera del estrato córneo está formada por un sistema de dos compartimientos de corneocitos enriquecidos en proteínas y reducidos en lípidos, rodeados por una matriz lipídica extracelular continua. Estos dos compartimientos tienen funciones algo independientes aunque complementarias que constituyen en conjunto, la “actividad de barrera” de la epidermis. La regulación de la permeabilidad, descamación, actividad contra los péptidos microbianos, exclusión de toxinas y absorción química selectiva son todas funciones primarias de la matriz lipídica extracelular. Por otro lado, el esfuerzo mecánico, la hidratación, la iniciación

de la inflamación mediada por citocinas y la protección del daño por exposición a radiación UV son todas funciones a cargo de los corneocitos.<sup>5</sup>

#### **1.1.1.2. Dermis**

La dermis o corion es el retículo más profundo de colágeno y fibras elásticas que, por lo general, comprende la mayor parte del espesor de la piel; contiene además numerosos vasos sanguíneos y conductos linfáticos, nervios y terminaciones nerviosas sensitivas y cierta cantidad de tejido adiposo. También contiene folículos pilosos, glándulas sudoríparas y sebáceas y músculo liso (músculos erectores de los pelos).<sup>7</sup> La dermis se divide en dos estratos: estrato papilar y estrato reticular.<sup>9</sup>

Estrato papilar. Tejido conjuntivo superficial, delgado y rico en células y vasos sanguíneos. Su superficie forma papilas y contiene numerosos capilares.<sup>9</sup>

Estrato reticular. La capa más profunda y gruesa es rica en fibras, aporta firmeza al tejido conjuntivo cutáneo. Contiene los anexos cutáneos, los vasos sanguíneos y linfáticos y los nervios.<sup>9</sup> Es esta capa la que confiere a la piel su resistencia y fortaleza.<sup>7</sup>

#### **1.1.1.3. Hipodermis (tejido subcutáneo)**

El tejido de la hipodermis aísla al cuerpo, sirve como suplemento de reserva energética, acolchado y protección de la piel, y permite su movilidad sobre las estructuras subyacentes. El límite entre la dermis reticular profunda y la hipodermis es una transición abrupta de un tejido conjuntivo dérmico predominantemente fibroso a un tejido subcutáneo fundamentalmente adiposo. Los adipocitos forman la masa principal de la hipodermis. Están organizados en lóbulos definidos por tabique

de tejido conjuntivo fibroso. Los nervios, vasos sanguíneos y linfáticos están localizados dentro de los tabiques e inervan, nutren y drenan la región. <sup>7</sup>

### **1.1.2. Absorción percutánea**

La penetración de un principio activo hasta la circulación sistémica o los tejidos circundantes involucra múltiples procesos: disolución y liberación dentro y desde la formulación, partición dentro del estrato córneo, difusión a través del estrato córneo, partición desde el estrato córneo hacia la fase acuosa de la epidermis, difusión a través de la dermis y acceso a la circulación sistémica y/o tejidos circundantes. <sup>10</sup>

El estrato córneo funciona como una barrera altamente lipofílica, la cual evita la pérdida excesiva de agua y previene la penetración de moléculas. Los corneocitos queratinizados conforman una barrera que dificulta el pasaje de moléculas, independientemente de su tipo. Así mismo, los lípidos hidrofóbicos intercelulares lo hacen impermeable a las sustancias hidrofílicas. <sup>10</sup>

## **1.2. Vía de administración transdérmica**

Los sistemas de liberación transdérmica (SLT) o Sistemas Terapéuticos Transdérmicos (STT), se definen como formas de dosificación autónomas, discretas, de liberación controlada;<sup>11</sup> que tienen como premisa básica la penetración del fármaco a través del estrato córneo y la absorción en circulación sistémica.<sup>12</sup> Son una de las formas farmacéuticas más recientes (1980) y se utilizan sobre todo para fármacos de vida media corta que, de otro modo, precisarían de una administración oral muy frecuente, o para aquellos cuya absorción puede ser mejorada.<sup>13</sup>



## **Ventajas**

En comparación con los métodos tradicionales tales como la inyección y la vía oral, los STT poseen ventajas como: <sup>10, 13, 14, 15, 16</sup>

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

## **Limitaciones**

Algunas de las limitaciones que presenta la vía transdérmica se enuncian a continuación: <sup>15, 16</sup>

- Algunos pacientes desarrollan eritema, comezón y edema local en el sitio de aplicación debido a uno o más componentes del sistema.
- La función de barrera de la piel cambia en un sitio y otro en la misma persona, de persona a persona y con la edad.

- La administración transdérmica será muy difícil, si la dosis terapéutica del fármaco es mayor a 10 mg/día.
- Esta administración no es práctica cuando es necesario administrar dosis elevadas del fármaco a través de la piel.
- Baja permeabilidad para moléculas de alto peso molecular (> 500 Da) e hidrofílicas (péptidos y proteínas).

### **1.2.1. Factores que influyen en la liberación de los fármacos a partir de un sistema terapéutico transdérmico**

#### **Propiedades fisicoquímicas del fármaco**

Se ha planteado que el éxito de todo STT depende de la capacidad del fármaco para difundir a través de la piel en cantidades suficientes para lograr el efecto terapéutico deseado, algunas de las características que debe tener el fármaco para formularse en un STT son: <sup>1, 10, 16</sup>

- Bajo peso molecular (< 500 Daltons).
- Elevada potencia farmacológica (dosis <50 mg/día).
- Ausencia de propiedades irritantes para la piel.
- Estable a temperatura ambiente.
- Solubilidad en lípidos y agua (> 1 mg/mL).
- Coeficiente de partición (log P) entre 1-3; ya que si el fármaco es hidrofílico la cantidad que pase a través del estrato córneo será pequeña y en el caso de un fármaco muy lipofílico tenderá a retenerse en las membranas.
- Grado de ionización, este influye en la solubilidad del fármaco en las membranas, si una molécula se encuentra no ionizada podrá atravesar

más fácilmente el estrato córneo que una molécula ionizada porque esta podría interactuar con los iones presentes en la piel y por lo tanto no podrá atravesar el estrato córneo.

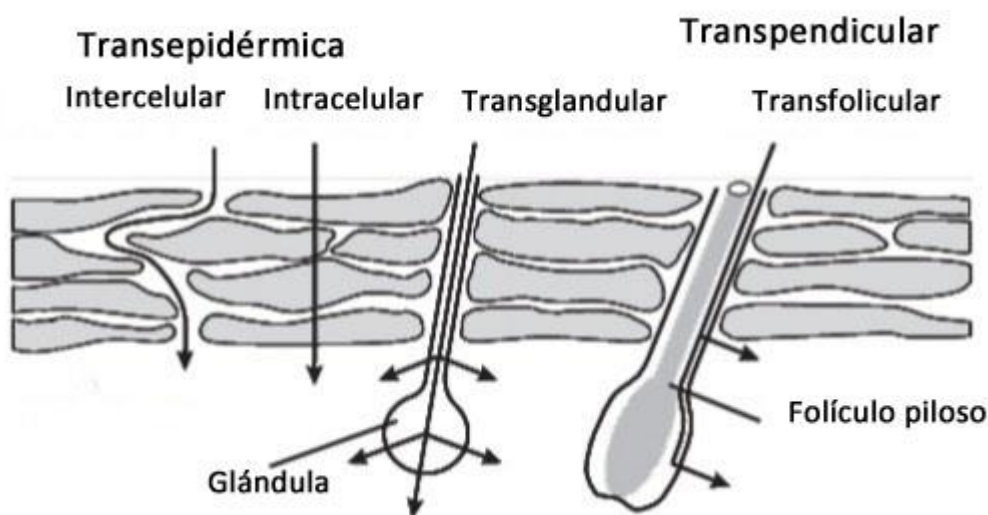
### **Propiedades del vehículo**

La velocidad de penetración de los fármacos a través de la piel dependerá de las interacciones entre el vehículo, la piel y el fármaco, y puede ser modificada por varios factores: <sup>13</sup>

- Oclusividad. Los vehículos lipófilicos son más hidratantes por su poder oclusivo y favorecen la absorción, mientras que los vehículos hidrofílicos no favorecen la penetración y en ocasiones son deshidratantes.
- Capacidad de penetración del vehículo. Los vehículos que no contienen emulsificantes u otros aditivos que favorecen la penetración son los menos penetrantes y están indicados para tratamientos superficiales. Para tratamientos que requieren penetración interesan excipientes penetrantes o bien potenciarla incorporándoles promotores de la absorción.
- Tensoactivos. Son sustancias que solubilizan el fármaco facilitando su acceso a la superficie cutánea y, por tanto, indirectamente mejoran su capacidad de penetración.
- Disolventes. Son compuestos capaces de modificar la naturaleza del estrato córneo aumentando temporalmente la permeabilidad de la piel.

### 1.2.2. Rutas de permeación

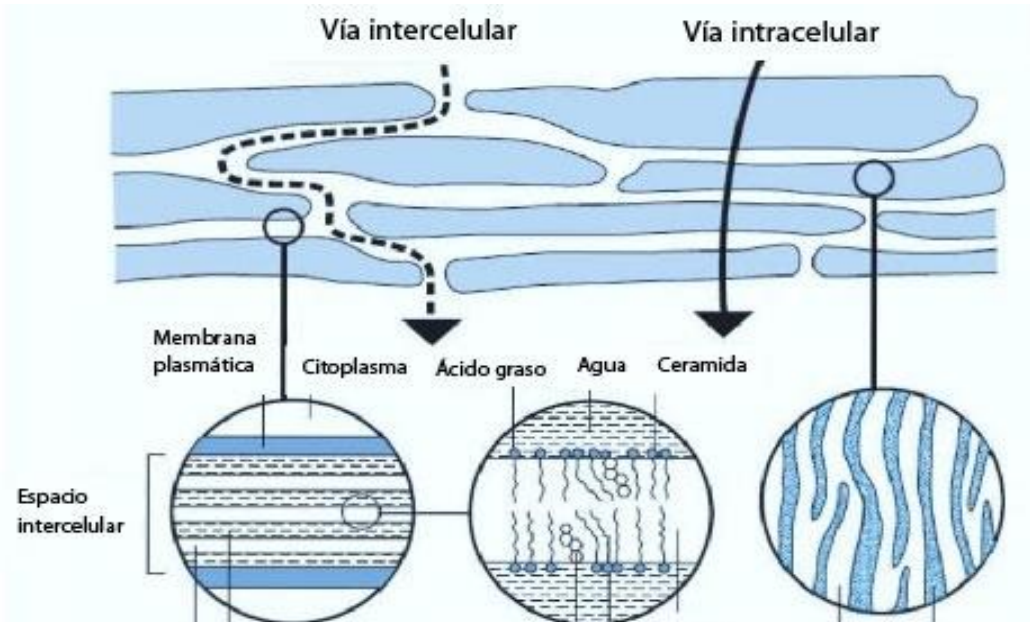
En un principio, cuando un medicamento se deposita sobre la piel, entra en contacto con una capa epicutánea constituida por una mezcla de secreciones lipídicas (sebo) y acuosas (sudor).<sup>13</sup> Las dos rutas principales de permeación en la piel son la vía transepidérmica y la vía transpendérmica. La vía transepidérmica también conocida como ruta de desviación, incluye la permeación a través de las glándulas sudoríparas (vía transglandular) y folículos pilosos (vía transfolicular) con su asociada glándula sebácea (Figura 2).<sup>17,18</sup> La vía transepidérmica es la más importante, ya que la vía transpendérmica es de escaso volumen, representa menos del 0.1 % de la superficie cutánea y admite la difusión de pocos tipos de sustancias.<sup>13</sup>



**Figura 2.** Rutas principales de permeación de la piel.<sup>18</sup>

La vía transepidérmica consta de dos vías, la vía intercelular y la vía intracelular (Figura 3).<sup>17</sup> La vía más directa es la intracelular; aquí el fármaco atraviesa la piel directamente pasando ambas estructuras lipídicas del estrato córneo y el citoplasma de queratinocitos muertos. Esta es la ruta más corta para el fármaco, pero habrá una resistencia significativa a la permeación porque tendrá que atravesar ambas

estructuras lipídicas e hidrofílicas.<sup>18</sup> La vía más común para la permeación de fármacos es la intercelular, a través de los intersticios celulares (entre los corneocitos); para las moléculas polares, la vía dominante residirá en la fase acuosa de los espacios intercelulares y para moléculas no polares, en las regiones hidrofóbicas de las cadenas lipídicas intercelulares.<sup>13,18</sup>



**Figura 3.** Rutas de la vía transepidérmica: vía intercelular y vía intracelular.<sup>16</sup>

### 1.2.3. Promotores de permeación/penetración

Cuando una sustancia se aplica sobre la piel con un simple vehículo, la terapia puede resultar insatisfactoria porque la concentración obtenida en la aplicación es insuficiente.<sup>19</sup> Sin embargo, el superar las limitaciones inherentes impuestas por el estrato córneo para lograr una concentración terapéutica sistémica de los fármacos ha llevado a perturbar la barrera de la piel y mejorar la liberación transdérmica. Los principales enfoques para mejorar la liberación transdérmica son los potenciadores físicos (ultrasonido, iontoforesis, magnetoforesis, microagujas), nanoacarreadores

(liposoma, niosoma, transfersomas, microemulsión, nanopartículas) y potenciadores químicos (sulfóxidos, azonas, glicoles, alcanos, terpenos, etc.).<sup>15, 20</sup>

Los promotores de la penetración se conocen como compuestos que modifican la fluidez de los lípidos del estrato córneo. La interacción con el estrato córneo puede darse ya sea mezclándose con los lípidos del estrato córneo alterando así su organización, o pueden extraer una parte de los lípidos del estrato córneo de este modo modificando el contenido total de lípidos en el estrato córneo y su composición en la piel.<sup>21</sup>

Algunas de las propiedades ideales de los potenciadores de penetración/absorción son: que sean seguros, que no sean tóxicos, que sean farmacológicamente inertes, que no sean irritantes, que no sean alergénicos y que tengan rápida dispersión para permitir la recuperación de la función de barrera.<sup>10</sup>

#### **1.2.3.1. Promotores químicos**

Con el fin de aumentar la penetración del fármaco, el vehículo puede estar integrado con potenciadores que al interactuar con lípidos intercelulares mejoren el coeficiente de difusión del fármaco en el estrato córneo. Los potenciadores químicos pueden: a) aumentar la capacidad de difusión del fármaco dentro de la barrera, b) aumentar la solubilidad en el vehículo o en ambos, o c) mejorar el coeficiente de reparto.<sup>19</sup>

Los excipientes como propilenglicol y dimetilsulfóxido (DMSO) pueden incrementar la difusión alterando la organización de los lípidos de la capa córnea. La interferencia con la biosíntesis de ciertos lípidos puede alterar la estructura de la barrera e incrementar la penetración.<sup>19</sup> Los alcoholes de cadena corta como etanol e isopropanol son los más usados; el etanol puede ser utilizado como cosolvente y como promotor de la penetración; la habilidad del etanol o mezclas de etanol-agua para modificar la función de barrera de la piel que ha sido reportada incluye la fluidización y extracción de lípidos, y efectos en el orden de los lípidos.<sup>22</sup>

Los tensoactivos, en particular, tienden a interactuar con la queratina de los corneocitos, abriendo la estructura densa de la queratina haciéndola más permeable, <sup>23</sup> estudios de calorimetría indican que los tensoactivos alteran la estructura de los lípidos incrementando así la permeabilidad de la membrana. <sup>22</sup> Además causan la depleción de lípidos en el estrato córneo por su solubilización en micelas (extracción de lípidos), debilitando así la propiedad de barrera y, afectando el transporte de materiales hidrofílicos causando el paso de agua a través de la piel.<sup>21</sup>

### **1.2.3.2. Nanoacarreadores**

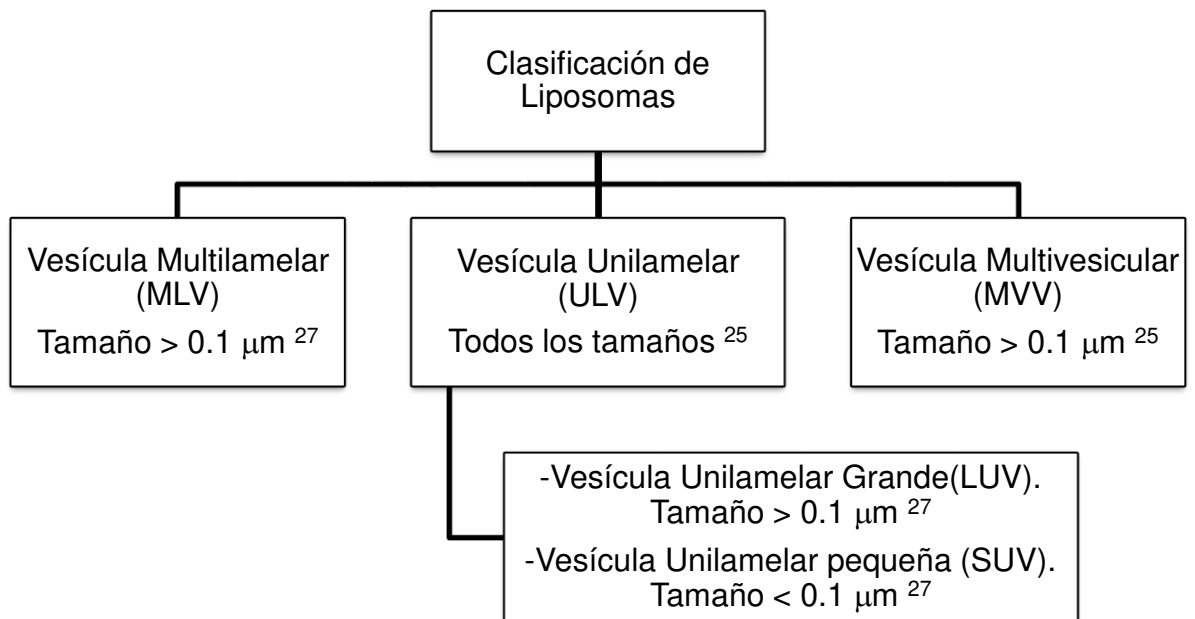
#### **Liposomas**

Los liposomas son acarreadores versátiles de fármacos los cuales pueden usarse para resolver problemas de solubilidad, inestabilidad y rápida degradación del fármaco. Tanto fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos pueden asociarse a los liposomas. <sup>24</sup>

Un liposoma es una pequeña vesícula hecha del mismo material que la membrana celular, que encapsula (encierra) un volumen acuoso dentro de una bicapa lipídica.<sup>25</sup> Las moléculas de lípidos son usualmente fosfolípidos (moléculas anfifílicas, es decir, que tienen una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica) con o sin aditivos que tienen una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica.<sup>25,26</sup> El colesterol puede ser incluido para mejorar las características de la bicapa de los liposomas, incrementando la microviscosidad de las bicapas, reduciendo la permeabilidad de la membrana a moléculas solubles en agua, estabilizando la membrana e incrementando la rigidez de las vesículas.<sup>26</sup>

## ***Tipos de liposomas***

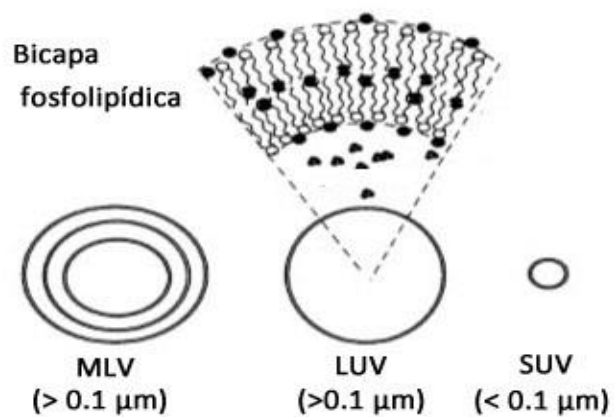
La clasificación de los liposomas de acuerdo a su estructura se muestra en la figura 4. Como se puede observar el tamaño depende de la clase de liposoma que se forme.



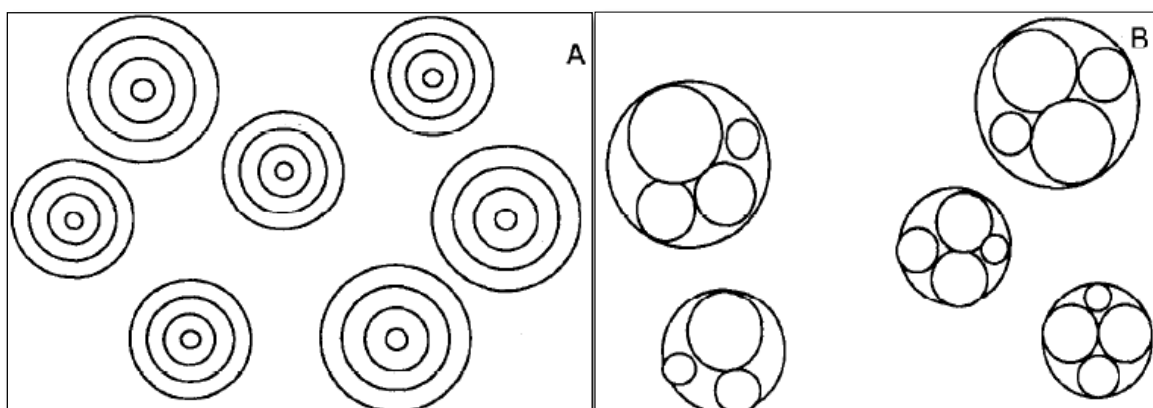
**Figura 4.** Clasificación de liposomas de acuerdo a su estructura y tamaño. <sup>27, 28</sup>

En la figura 5 se muestra la estructura de las MLV, LUV y SUV; en la figura 6 se muestran las diferencias en las estructuras de las MLV y MMV.





**Figura 5.** Clases de liposomas. De izquierda a derecha: Vesícula multilamelar, vesícula unilamelar grande y vesícula unilamelar pequeña.<sup>27</sup>



**Figura 6.** Vesículas multilamelares (A), vesículas multivesiculares (B).<sup>28</sup>

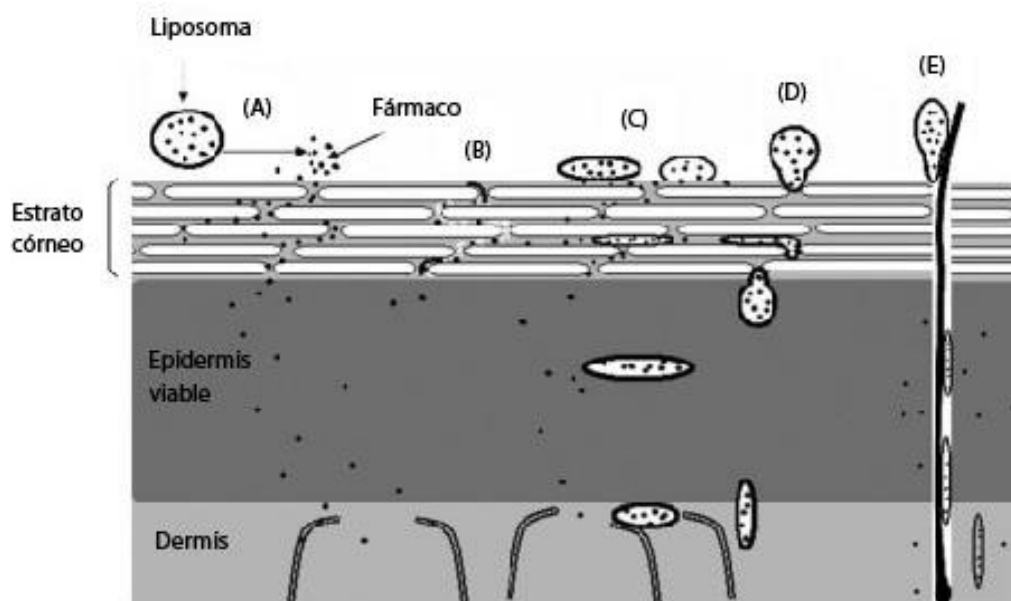
## **Mecanismos de penetración de los liposomas**

Los mecanismos que han sido sugeridos de cómo actúan los liposomas en la piel para la liberación de fármacos son: <sup>29</sup>

- Mecanismo del fármaco libre: de acuerdo con este proceso, el fármaco penetra la piel de forma independiente después de salir de las vesículas (Figura 7A).<sup>17</sup>
- Mecanismo de potenciar la permeación: después de la aplicación de las vesículas, se observaron cambios en las ultraestructuras de los lípidos intercelulares (Figura 7B). Se ha llegado a la conclusión que la lecitina mejora la liberación transdérmica mediante la reducción de la barrera de permeabilidad de la piel, lo cual indica que nano-agregados que contienen grupos relativamente pequeños en las cabezas hidrofílicas pueden interactuar con el estrato córneo humano *in vitro*.<sup>29</sup>
- Adsorción de vesículas y/o fusión con el estrato córneo: de acuerdo con este mecanismo, (Figura 7C), las vesículas pueden adsorberse a la superficie del estrato córneo con una transferencia de fármaco directamente de las vesículas a la piel o bien pueden mezclarse con la matriz lipídica del estrato córneo, aumentando la partición del fármaco en la piel. <sup>29</sup>
- Mecanismo de penetración de la vesícula intacta: la interacción de los liposomas con piel humana ha sido revisada y se concluyó que se pueden tener en la piel pero no pueden penetrar a través del estrato córneo intacto sano, por lo tanto los liposomas tradicionales no pueden penetrar la piel, sin embargo; los liposomas ultra deformables invaden la piel intacta y van lo suficientemente profundo para ser absorbidos por la circulación sistémica (Figura 7D).<sup>17</sup> Se dice que el gradiente de hidratación transdérmica produce una fuerza suficiente para conducir vesículas ultra deformables a través del estrato córneo y en la epidermis. La hidrofilia de los fosfolípidos conduce a la xerofobia (tendencia a evitar la sequedad de los alrededores); en

consecuencia las vesículas que permanezcan hinchadas en la superficie de la piel seguirán el gradiente de hidratación local, moviéndose dentro de los estratos más profundos de la piel.<sup>29</sup>

- Penetración transpendicular: esta ruta juega un menor rol en la liberación transdérmica de los liposomas (Figura 7E). La microscopía electrónica indica que los liposomas por debajo de 600 nm de diámetro pueden penetrar la piel pero los de 1000 nm o más grandes permanecerán interiorizados en el estrato córneo.<sup>17</sup>



**Figura 7.** Mecanismo de penetración de los liposomas.<sup>29</sup>

### ***Métodos de preparación***

Entre los métodos utilizados para la preparación de liposomas se encuentran:

- Método de hidratación de película: cuando se preparan liposomas con una mezcla de lípidos, los lípidos deben disolverse primero en un disolvente orgánico (usualmente cloroformo o mezcla de cloroformo: metanol). La

intención es obtener una solución lipídica clara. Usualmente las soluciones de lípidos se preparan a una concentración de 10-20 mg/mL de disolvente orgánico. Una vez mezclados, el disolvente orgánico es removido (por medio del rotavapor) para formar una película de lípidos. Para remover residuos del disolvente se puede dejar la muestra a vacío toda la noche. Después de este tiempo la película se hidrata con medio acuoso y se agita.<sup>25</sup>

- Método de dispersión de disolventes: 1) *Método de inyección de éter*. Una solución de lípidos disuelta en dietil éter o éter/metanol se inyecta lentamente a una solución acuosa a 55-65 °C, después se remueve el éter a vacío, para formar los liposomas. Los principales inconvenientes de éste método son que se obtienen poblaciones heterogéneas (desde 70 a 190 nm), que se puede encapsular solventes orgánicos o altas temperaturas. 2) *Método de inyección de etanol*. Una solución de lípidos en etanol es inyectada rápidamente a un exceso de solución amortiguadora. Las MLVs se forman inmediatamente. Los inconvenientes de este método son: la formación de poblaciones heterogéneas (30-110 nm) y la dificultad de remover todo el etanol porque forma un azeotropo con el agua.<sup>25</sup>
- Método de evaporación en fase reversa. Primero se forma una emulsión agua/aceite de fosfolípidos y solución amortiguadora en exceso de fase orgánica, las dos fases (lípidos y agua) son usualmente emulsificadas por métodos mecánicos o por sonicación.<sup>30</sup> El disolvente orgánico se remueve utilizando el rotavapor dando como resultado la formación de un gel.<sup>25</sup> El eliminar el disolvente orgánico, bajo presión reducida hace que el gel como matriz forme una pasta de consistencia suave. Esta pasta es una suspensión de LUV. La eficiencia de encapsulamiento es mayor al 60-65% (aunque esto depende también de las propiedades fisicoquímicas del fármaco).<sup>30</sup>

## **Microemulsiones**

La microemulsión se define como una dispersión que consiste de aceite, tensoactivo, cotensoactivo (el cual puede ser un alcohol de cadena corta u otra molécula de carácter anfifílico débil) y fase acuosa, es un líquido transparente, isotrópico y termodinámicamente estable, con un diámetro de gota usualmente en un rango de 10-100 nm. La microemulsión mejora la solubilización del fármaco y la actividad termodinámica hacia la piel, además es fácil de formular.<sup>31,32</sup> La formación y la estabilidad de una microemulsión pueden ser afectados por varios factores, incluyendo la naturaleza y el peso molecular del surfactante, la longitud y concentración de la cadena del alcohol, la salinidad y la temperatura.<sup>33</sup>

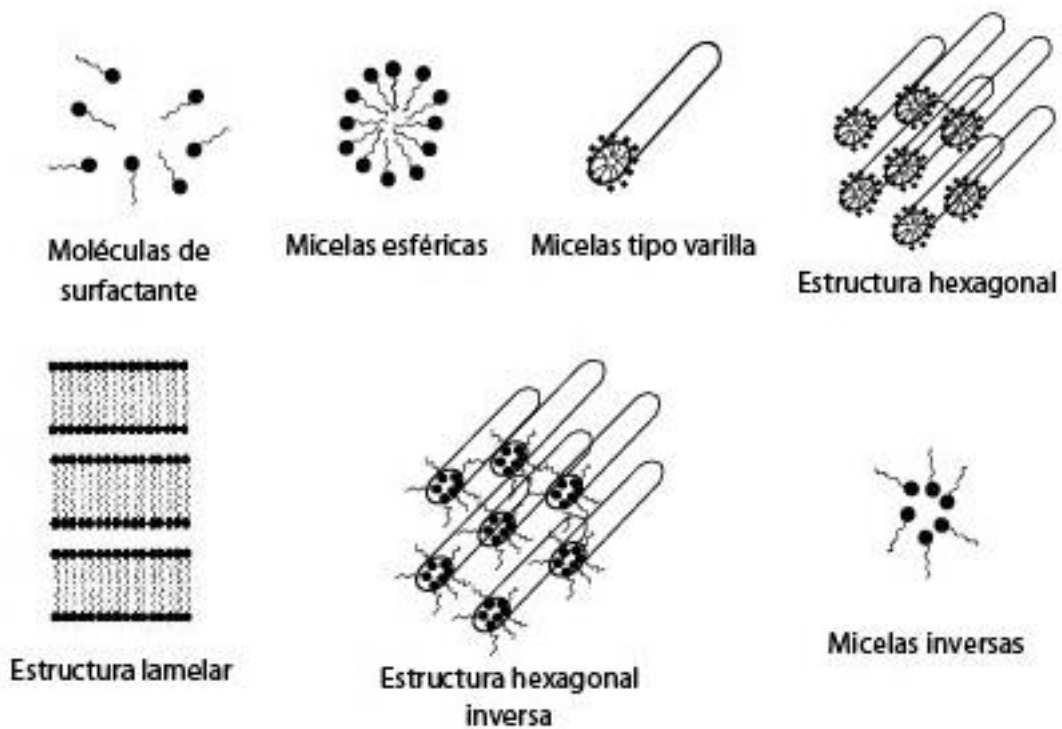
Estos sistemas a menudo requieren altas concentraciones de tensoactivo para proporcionar una tensión interfacial muy baja además de una cobertura interfacial suficiente para la entera microemulsificación de las fases oleosa y acuosa. Sin embargo, los altos niveles de tensoactivo no son aceptados debido a bio-incompatibilidad o razones económicas. Por lo tanto, los surfactantes y sus concentraciones son de gran interés para los formuladores. Es bien conocido que la incorporación de otro compuesto anfifílico, como los co-surfactantes, permite el ajuste de la eficiencia del surfactante así como la concentración requerida para formar una microemulsión.<sup>34</sup>

Los tensoactivos juegan un papel importante en la reducción de la tensión superficial en las microemulsiones. Se pueden seleccionar basándose en el concepto del HLB. Los tensoactivos con un valor de HLB bajo (3-6) se prefieren para la formación de microemulsiones agua/aceite mientras que los tensoactivos con un valor de HLB alto (8-18) se prefieren para microemulsiones aceite/agua. Las gotas formadas están cubiertas por una capa adecuada de tensoactivo y cotensoactivos. Las moléculas de tensoactivo forman una película interfase que separa la fase oleosa de la fase acuosa. La película tiene una tensión superficial baja en la mezcla aceite-agua. La adición de un cotensoactivo reduce aún más la

tensión interfacial y por lo tanto disminuye la energía libre lo que favorece la formación de microemulsiones estables.<sup>33</sup>

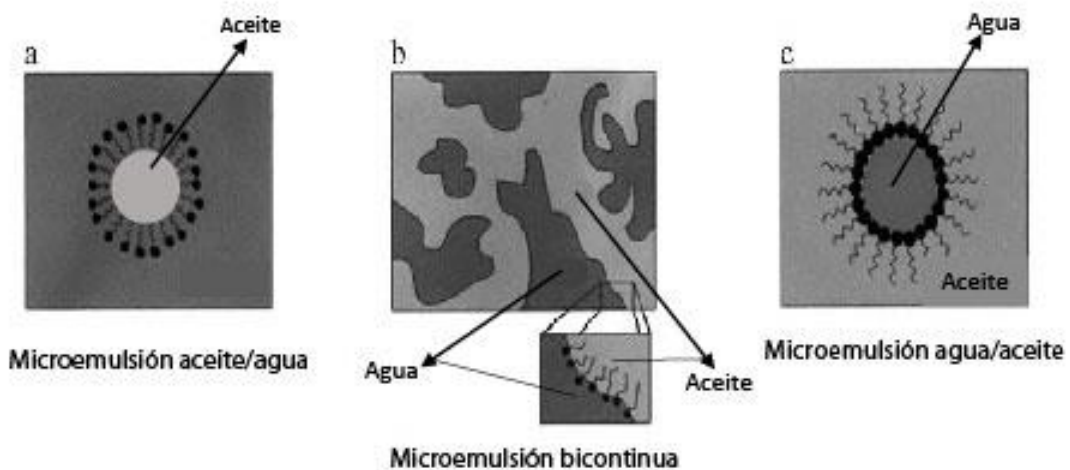
La aplicación de las microemulsiones como vehículos para la liberación cutánea de los fármacos está cada vez más de moda debido a la posibilidad de incluir fármacos tanto lipofílicos como hidrofílicos. Se encontró que las microemulsiones actúan como un vehículo eficaz para la solubilización de ciertos fármacos y como medio protector para la degradación, hidrólisis y oxidación de fármacos encapsulados y prolongar la liberación.<sup>35</sup>

En la figura 8 se muestran algunas de las posibles estructuras de auto-asociación que los tensoactivos pueden formar en presencia del agua, aceite o combinación de los tres.<sup>36</sup>



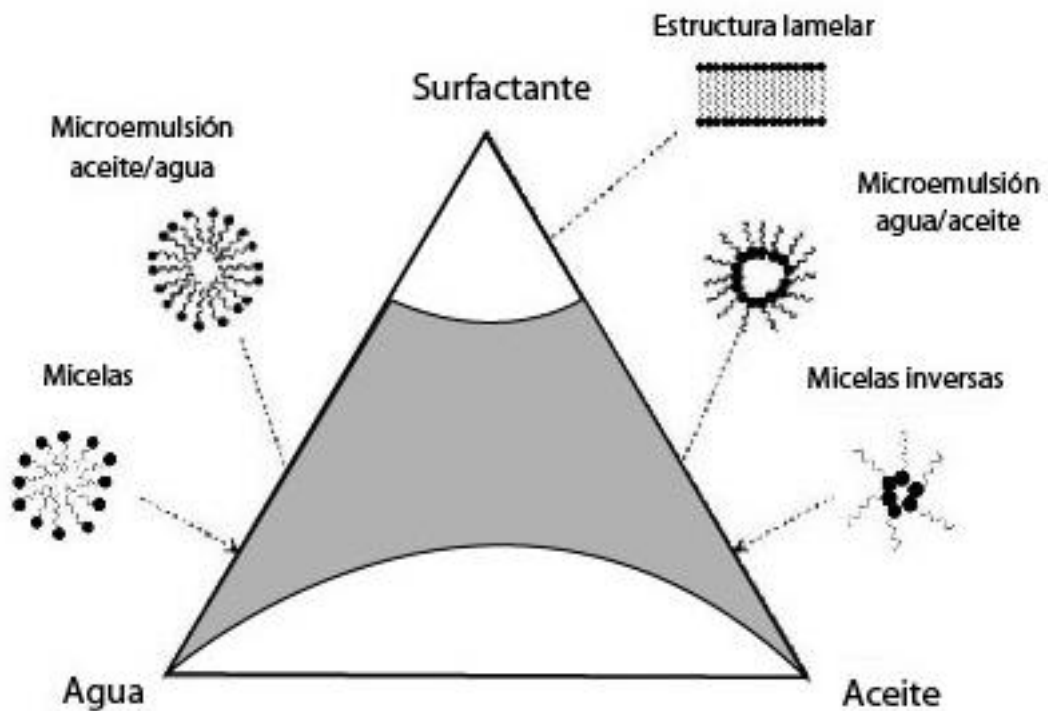
**Figura 8.** Representación esquemática de auto-asociaciones más comunes de las estructuras en agua, aceite o combinación.<sup>36</sup>

La figura 9 muestra representaciones esquemáticas de los tres tipos más probables de microemulsiones que se forman dependiendo de la composición. Se puede observar que mientras que las tres estructuras que se muestran son bastante diferentes, en cada una hay una monocapa interfacial del tensoactivo separando los dominios del agua y el aceite. Hay que tener en cuenta que mientras en las microemulsiones aceite-agua (o/w) y la agua-aceite (w/o) se representan con gotitas (fase dispersa), las gotas o/w son probables cuando la fracción de volumen de aceite es bajo; por el contrario, las gotas w/o son probables cuando la fracción de volumen de agua es bajo, y en los sistemas donde las cantidades de agua y aceite son similares, puede resultar una microemulsión bicontinua. En este último caso, tanto el aceite y el agua existen como una fase continua en presencia de una fluctuación continua de cotensoactivo estabilizado.<sup>36</sup>



**Figura 9.** Representación esquemática de las tres microemulsiones más comunes: (a) aceite en agua, (b) bicontinua, y (c) agua en aceite. <sup>36</sup>

Cuando se investigan cuatro o más componentes, se utilizan diagramas de fases pseudo-ternarios donde en un vértice se representa la mezcla de dos componentes que son tensoactivo/cotensoactivo, agua y fase oleosa (Figura 10). El número de diferentes fases presentes en una mezcla en particular puede evaluarse visualmente. Cabe señalar que no todas las combinaciones de componentes producen microemulsiones sobre toda la gama de posibles combinaciones, en algunos casos el grado de formación de una microemulsión puede ser muy limitada.<sup>36</sup>



**Figura 10.** Un diagrama hipotético de fases pseudo-ternario formado por aceite/cotensoactivo/agua, el cual muestra las áreas convencionales de formación de micelas, micelas reversas, microemulsiones agua en aceite (w/o) y microemulsiones aceite en agua (o/w).<sup>36</sup>



### 1.2.3.3. Promotores físicos

Los promotores físicos se describen a continuación: <sup>15</sup>

- Iontoforesis: Aplicación de corriente constante de bajo voltaje. Promueve el transporte de moléculas con carga (por un mecanismo de repulsión) y neutras (mediante flujo electroosmótico).
- Electroporación: Aplicación de pulsos de voltaje elevado de corta duración.
- Microagujas: Arreglos de agujas de talla micrométrica (100-200  $\mu\text{m}$ ). Traspasan el estrato córneo sin dolor, creando microporos. El fármaco puede estar incluido en la microaguja, fungiendo ésta como una matriz de liberación.
- Sonoforesis: ondas ultrasónicas de baja frecuencia, facilitan el paso de sustancias por cavitación.
- Sistemas inyectores libres de aguja. Dispositivos capaces de traspasar el estrato córneo al impactar partículas o gotas de líquido a gran velocidad (100-200 m/s), esto por la acción de un gas a alta presión (200-900 psi).

### 1.2.4. Estudios de permeación

#### Definiciones/Terminología

*La difusión* es, por definición el movimiento aleatorio de las moléculas a través de un dominio impulsado por un gradiente de concentración, de una alta concentración a una baja concentración. La difusión *in vitro* es generalmente la difusión pasiva de un permeante dentro de la cámara donante, a través de una membrana artificial o biológica a un fluido que se encuentra en una cámara receptora. *El permeante* es la especie molecular que se desplaza a través del tejido o membrana. *La permeación* es el movimiento del fármaco a través de la membrana

que comprende una primera partición en la membrana y, después una difusión a través de la membrana. La penetración puede ocurrir en la membrana sin necesidad de difundir o pasar a través de la membrana. <sup>37</sup>

El *flujo* es la cantidad de permeante que cruza una membrana por unidad de área al sistema circulante por unidad de tiempo, y para la permeación *in vitro* este “sistema” es la cámara receptora. El flujo se expresa en unidades de masa/área/tiempo. Del mismo modo, la acumulación es la cantidad de permeante que cruza una membrana dentro de cierto tiempo, expresado en unidades de masa/área. El *coeficiente de permeabilidad* ( $K_p$ ), describe la velocidad de penetración del permeante por unidad de concentración expresado en distancia/tiempo. <sup>37</sup>

Así mismo, un compuesto aplicado a cualquier tejido o membrana tendrá un tiempo de retardo (tiempo lag o tiempo de latencia), el cual 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. El *tiempo de latencia o tiempo lag*, es el período durante el cual la velocidad de permeación está aumentando. El estado estacionario se alcanza cuando hay un movimiento constante del permeante a través de la membrana. La cantidad de tiempo que se necesita para alcanzar el estado de equilibrio dependerá de varios factores: la permeabilidad del tejido o membrana estudiada y de las propiedades del compuesto en sí. <sup>37</sup>

### **1.3. Reflujo gastroesofágico**

El reflujo gastroesofágico (RGE), es un evento fisiológico que ocurre en bebés, niños y adultos normales. <sup>38</sup> Existe un RGE fisiológico prácticamente en todo el mundo, en particular en el período neonatal, debido a la inmadurez de los mecanismos de protección, que provocan la relajación inadecuada del esfínter esofágico inferior. La frontera entre el reflujo gastroesofágico fisiológico y patológico es difícil de establecer, pero se puede considerar que el reflujo se hace patológico cuando es demasiado frecuente o demasiado intenso. <sup>39</sup>

#### **1.3.1. Definición**

El reflujo gastroesofágico (RGE) se define como el paso del contenido gástrico hacia el esófago, y la enfermedad del reflujo gastroesofágico (ERGE) se define como los síntomas o complicaciones del reflujo gastroesofágico. <sup>40</sup> En el niño, el reflujo a menudo pasa a través del esófago y boca, dando como resultado la regurgitación o el vómito del contenido gástrico, poco aumento de peso, disfagia, dolor abdominal y desordenes respiratorios. <sup>38, 41</sup>

La regurgitación se define como el paso del contenido gástrico hacia el esófago y/o hacia la boca “sin esfuerzo alguno” es decir, no hay contracción del diafragma; es el regreso involuntario hacia la boca, de comida o secreciones previamente deglutidas. La regurgitación es la manifestación más frecuente y común de la enfermedad por reflujo gastroesofágico. <sup>40</sup>

El RGE ha sido asociado al síndrome de muerte súbita del lactante y al “casi ahogamiento”, así como a enfermedades respiratorias crónicas como hiperactividad bronquial, tos crónica, estridor y neumonía recurrentes. <sup>40</sup>

### **1.3.2. Epidemiología**

El RGE es una razón común para una visita al pediatra, muchos padres consideran las regurgitaciones como anormales; 24 % de los padres llevan al bebé al pediatra para atender el síntoma.<sup>42</sup> Las regurgitaciones diarias del lactante están presentes en el 50 % de los niños menores a 3 meses, en más del 65 % de los de 4 meses y en el 5 % de los de 1 año.<sup>43</sup>

El reflujo gastroesofágico ocurre en más de dos tercios de los lactantes menores de un año de edad, pero el reflujo patológico sólo se presenta en uno de cada 300 lactantes. Es una entidad que se autolimita y que generalmente se resuelve entre los 6 y 12 meses de edad, sin embargo; 1 % de los lactantes mayores de un año continúan con regurgitaciones.<sup>40</sup>

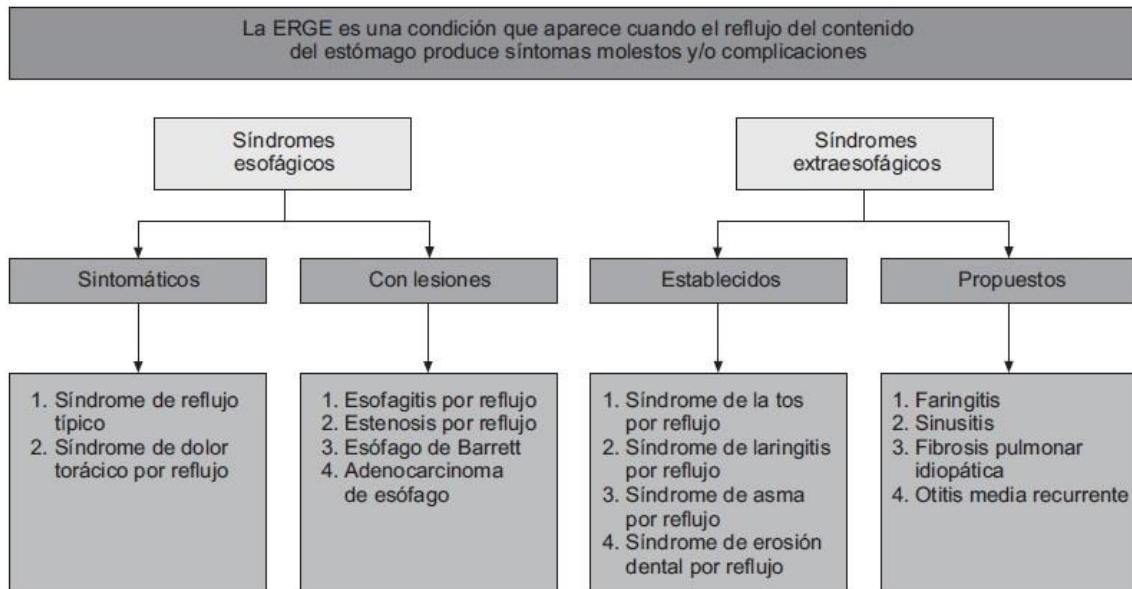
Debido a la frecuencia del RGE, es importante distinguir a los pacientes que evolucionan hacia un RGE patológico de los que tienen un RGE fisiológico. La presencia de síntomas asociados como poco aumento de peso, llanto excesivo, dificultades de sueño, respiratorias u otorrinolaringológicas (ORL), hacen pensar en un RGE patológico o ERGE.<sup>43</sup> El diagnóstico, el tratamiento y la referencia oportuna, contribuyen a mejorar la situación clínica en los pacientes pediátricos.<sup>40</sup>

### **1.3.3. Diagnóstico**

A la hora de realizar la historia clínica del paciente hay que tener presente que ningún síntoma es diagnóstico o predictor de respuesta al tratamiento y que habitualmente estos son inespecíficos.<sup>44</sup>

En los bebés con síntomas leves y sin señales de peligro el tratamiento farmacológico no es necesario. Estos bebés son considerados “escupidores felices” y por lo tanto no se requiere ningún tratamiento médico.<sup>45</sup>

Cuando el paciente presente síntomas típicos (esofágicos) o atípicos (extraesofágicos) los cuales se muestran en la figura 11, estará indicada la realización de pruebas complementarias para el diagnóstico de ERGE.<sup>44, 46</sup>



**Figura 11.** Definición de ERGE y síndromes constituyentes.<sup>46</sup>

### 1.3.4. Tratamiento

Los principales objetivos de la terapia son promover el crecimiento adecuado y la ganancia de peso, el alivio de los síntomas, la curación de las lesiones en tejidos y evitar la recurrencia y complicaciones asociadas con ERGE.<sup>45</sup>

La decisión para tratar el RGE está influenciada por la probabilidad de evitar consecuencias negativas para el niño.<sup>45</sup> El tratamiento debe aplicarse progresivamente, a partir de tratamiento no farmacológico (medidas preventivas, dietéticas y posturales), tratamiento farmacológico y con frecuencia termina con técnicas endoscópicas o quirúrgicas, las cuales son más invasivas.<sup>45,47</sup>

### 1.3.1.1. Farmacológico

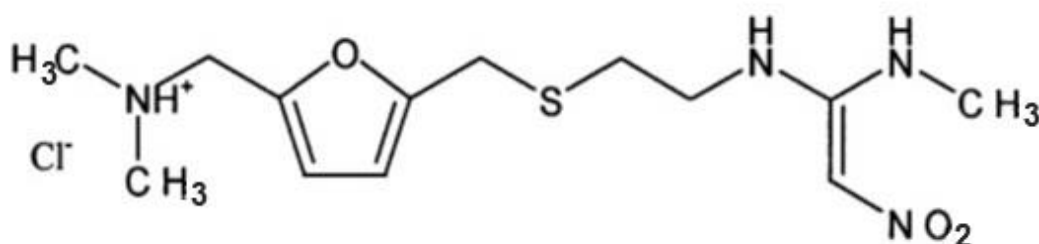
#### 1.3.1.1.1. Antagonistas de los receptores H<sub>2</sub>

Los antagonistas de los receptores H<sub>2</sub> de histamina o antihistamínicos H<sub>2</sub>, fueron descubiertos en 1972 por Black y colaboradores como consecuencia del descubrimiento de los receptores H<sub>2</sub> histaminérgicos que median la acción de la histamina endógena sobre la secreción ácida gástrica.<sup>48</sup> Con el descubrimiento y caracterización farmacológica de estos receptores se logró el desarrollo de la cimetidina, un antagonista de los receptores H<sub>2</sub>(RH<sub>2</sub>); utilizado en el tratamiento de la úlcera gástrica y duodenal.<sup>49</sup>

De los fármacos antagonistas de los receptores H<sub>2</sub> que inhiben la secreción gástrica de ácido clorhídrico, la más utilizada es la ranitidina; <sup>47</sup> a razón de 8-10 mg/Kg/día. <sup>43</sup> Siendo la sal de ranitidina (clorhidrato de ranitidina) la utilizada para formular una presentación farmacéutica.<sup>50</sup>

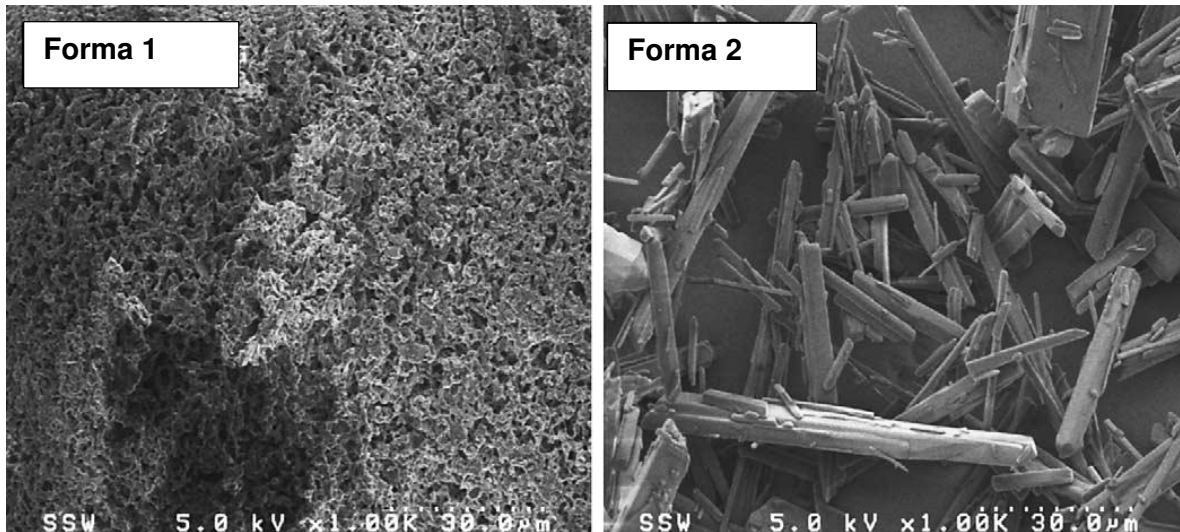
#### Propiedades fisicoquímicas de clorhidrato de ranitidina (ranitidina HCl)

- La estructura de la ranitidina HCl se muestra en la figura 12.



**Figura 12.** Estructura de clorhidrato de ranitidina. <sup>51</sup>

- La ranitidina HCl presenta polimorfismo (diferente forma cristalina).<sup>50,51</sup> Existen dos formas cristalinas conocidas como Forma 1 y Forma 2,<sup>51</sup> siendo la Forma 2 más estable con un punto de fusión entre 140-144 °C mientras que la Forma 1 presenta un punto de fusión entre 134-140 °C.<sup>52</sup> Las formas polimórficas se muestran en la figura 13.



**Figura 13.** Imagen SEM de Clorhidrato de ranitidina. Forma 1 y 2.<sup>53</sup>

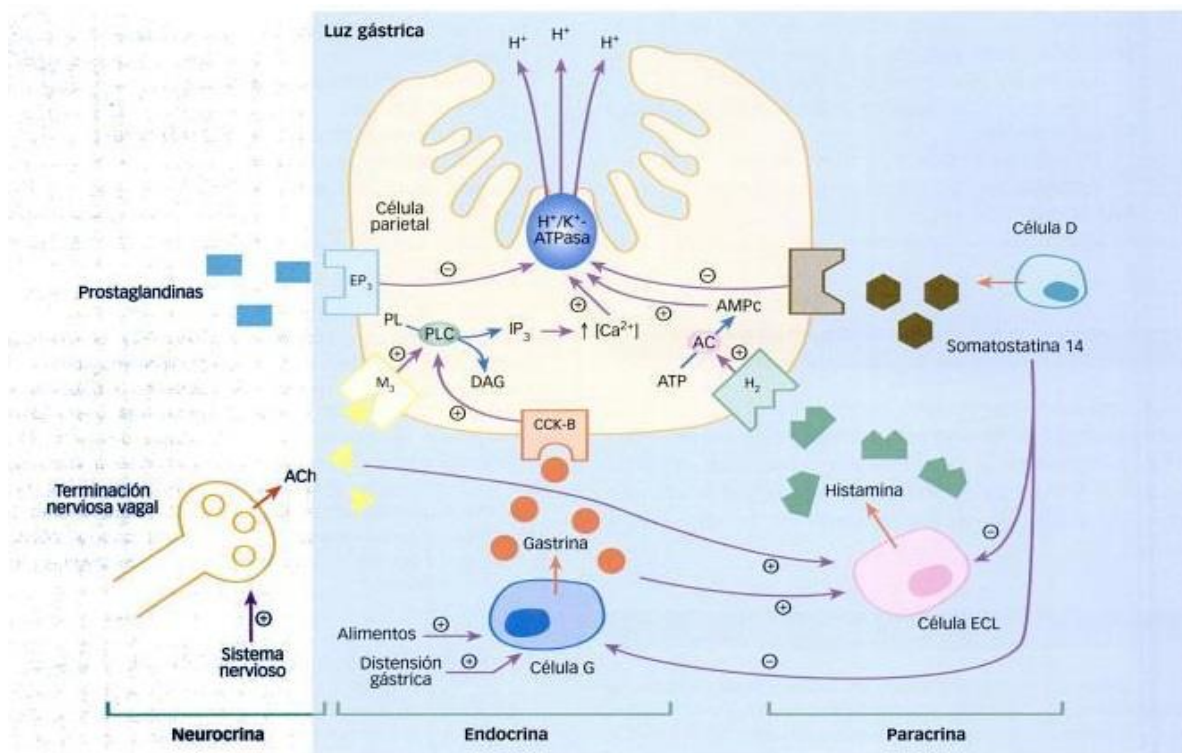
- Peso molecular. 350.9 g/mol<sup>54</sup>
- Solubilidad: En agua es de 660 mg/mL,<sup>50</sup> fácilmente soluble en ácido acético, soluble en metanol, poco soluble en etanol y prácticamente insoluble en cloroformo.<sup>54</sup>
- Coeficiente de partición (LogP): 1.28 (para molécula neutra) y 0.2 (para la forma ionizada)<sup>50</sup>
- pKa: 8.2 y 2.7<sup>50</sup>
- De acuerdo con la FDA la ranitidina HCl pertenece a la Clase III de la Clasificación Biofarmacéutica: alta solubilidad, baja permeabilidad.<sup>55</sup>

## Mecanismo de acción

Para entender cómo actúan los antagonistas de  $H_2$ , debemos entender el mecanismo de acción de la histamina.

La histamina se une a los receptores  $H_2$ , que acoplados a proteínas  $G_s$ , activan a la adenilato ciclasa y se genera AMPc que inicia la secuencia de reacciones bioquímicas para la liberación de  $H^+$  y la formación de HCl. <sup>56</sup>

En la figura 14, se muestra el mecanismo de acción para los antagonistas  $H_2$ , los cuales inhiben la secreción gástrica por bloqueo competitivo, impidiendo que la histamina se una a su receptor. <sup>57</sup>



**Figura 14.** Mecanismo de acción de la Histamina. ECL: células tipo enterocromafin, AC: adenilato ciclasa. <sup>57</sup>



## **Farmacocinética**

- Biodisponibilidad: la biodisponibilidad oral de la ranitidina es altamente variable entre sujetos pediátricos, especialmente en neonatos (40-80%) <sup>58</sup>
- Tiempo de vida media: cerca de 2 a 3 h. <sup>54</sup>
- Volumen de distribución: 1 a 2 L/Kg. <sup>54</sup>

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El reflujo gastroesofágico (RGE) en el niño es ocasionado por anomalías anatómicas de magnitud variables, que ocasionan alteraciones funcionales. Entre estas alteraciones funcionales sobresalen, el fenómeno de relajaciones transitorias del esfínter esofágico inferior, así como las alteraciones en la motilidad del esófago y vaciamiento gástrico retardado.<sup>59</sup>

De los fármacos que inhiben la secreción gástrica de ácido clorhídrico, el más utilizado es la ranitidina, a razón de 4 a 8 mg/Kg/día repartidos en dos a tres dosis. Este medicamento es bien tolerado, sin reacciones colaterales.<sup>59</sup>

Tomando en cuenta que, la administración de la forma farmacéutica oral en bebés (tabletas y suspensión de ranitidina) puede ser un poco complicada; además de la alta variabilidad en la biodisponibilidad entre sujetos pediátricos (40-80%); en este trabajo se propone una forma farmacéutica transdérmica para el uso pediátrico de la ranitidina.

### **3. HIPÓTESIS**

La inclusión de un fármaco hidrofílico como la ranitidina en un sistema submicrónico con características hidrófobas y por tanto más afín al ambiente lipídico de la superficie cutánea, promoverá su permeación a través de la piel.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo General

Proponer un sistema de liberación submicrónico que promueva la liberación transdérmica de ranitidina.

### Objetivos Particulares

- Formular, elaborar y caracterizar sistemas de liberación submicrónicos que contengan ranitidina.
- Estudiar y comparar la cinética de liberación *in vitro* de ranitidina a partir de los sistemas preparados.
- Llevar a cabo estudios de permeación *in vitro* a través de piel de cerdo de la ranitidina formulada en los sistemas de liberación preparados.
- Desarrollar y validar métodos analíticos para la cuantificación de ranitidina HCl en los estudios de permeación y liberación *in vitro*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM en el Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica Laboratorio L-323, Campo 1.

### **Equipos**

Balanza analítica (Boeco, Alemania), bomba de infusión (Syringepump New Era, NE-300, Australia), calorímetro diferencial de barrido (DSC Q10, TA instruments, Estados Unidos de América), centrifuga (Hettich Zentrifugen EBA12, Alemania), dermatoma (Zimmer Electric Dermatome, Estados Unidos de América), espectrofotómetro UV-Vis (Varian Cary 50, Estados Unidos de América), microbalanza (E. Mettler, Suiza), potenciómetro (Corning pH meter 430, Estados Unidos de América), rotavapor (Heidolph, Alemania), baño de ultrasonido (Cole-Parmer 8891, Estados Unidos de América), viscosímetro (Brookfield CAP 2000, Estados Unidos de América), zetasizer (Malvern Instruments Zen 3600, Estados Unidos de América).

### **Materiales**

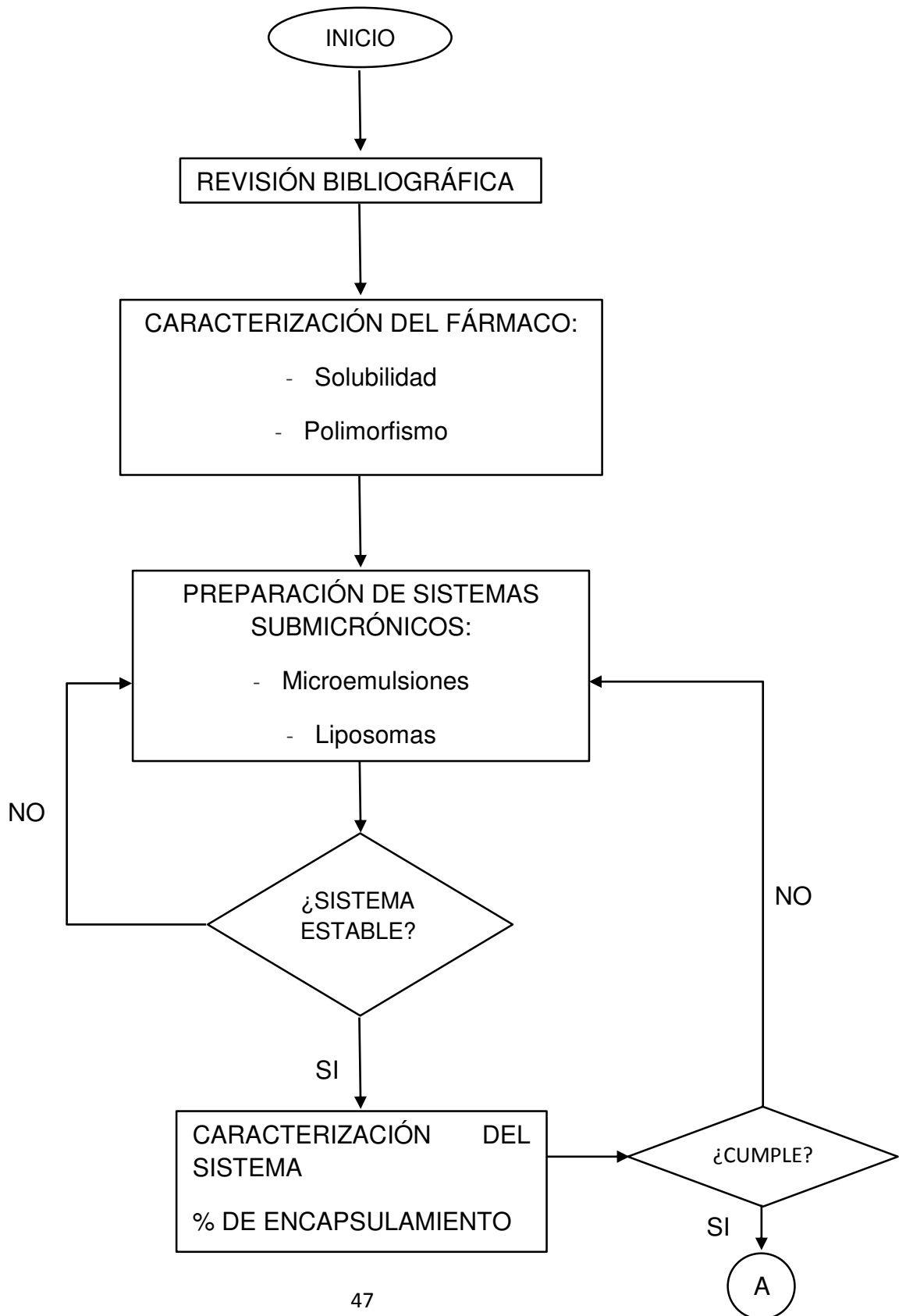
Oreja de cerdo con el estrato córneo intacto (recuperadas del rastro antes de que los animales sean tratados con agua caliente o vapor), membrana de diálisis (Tubing Cellulose Avg Flat Width 10 mm, 6000 a 8000 kDa, Lote: 3110. Sigma-Aldrich, México), portafiltros de polipropileno (Millipore<sup>®</sup>, Estados Unidos de América), papel filtro, pre-filtro tipo AP (Millipore<sup>®</sup>, Estados Unidos de América), filtro tipo HVMP 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore<sup>®</sup>, Estados Unidos de América), celdas tipo Franz.

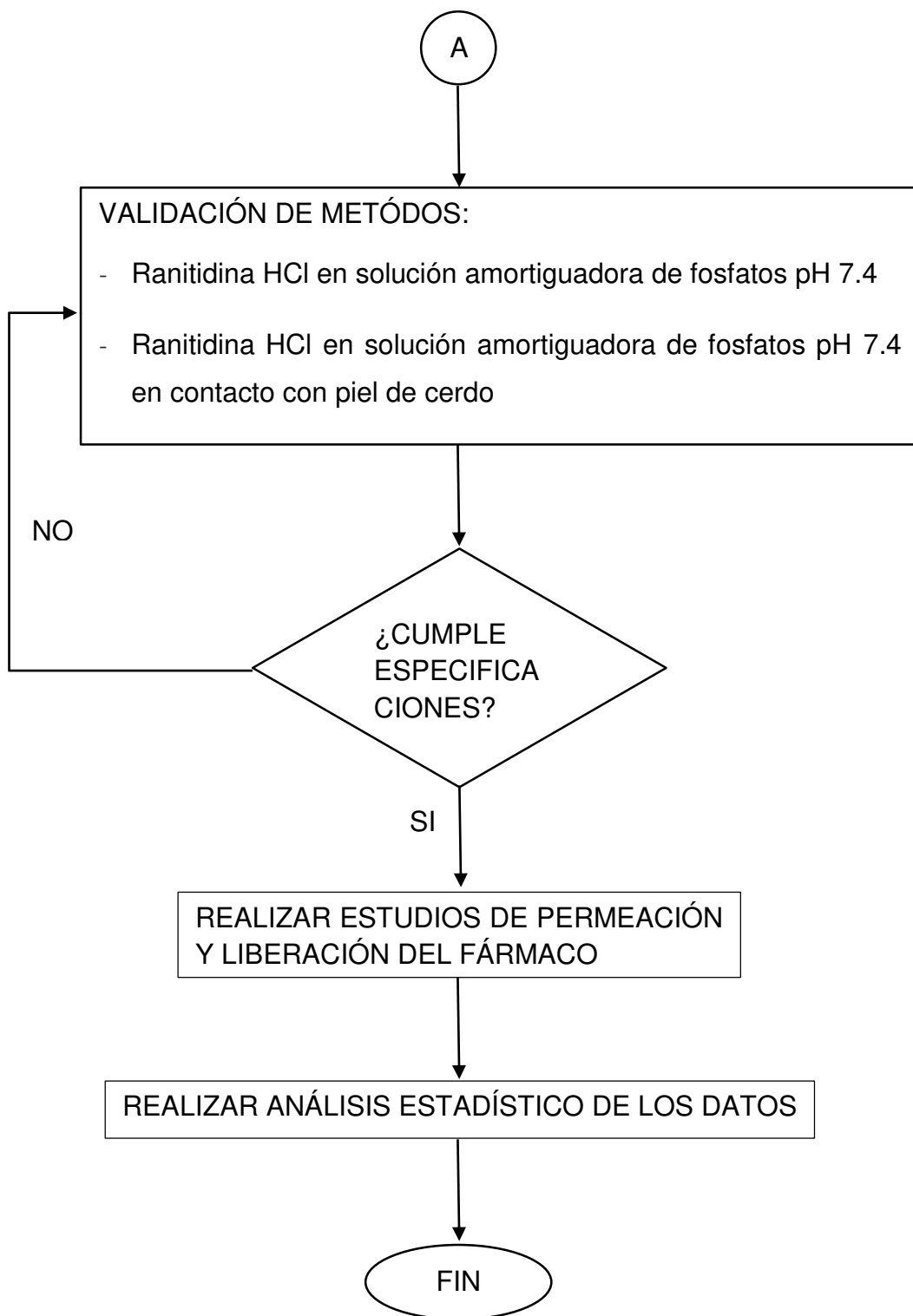
## **Excipientes y disolventes**

Ranitidina HCl (Generosamente donada por Helm de México, S.A. de C.V.), cloroformo (J.T Baker, Estados Unidos), etanol (Fermont, México), éter etílico (Teciquirem, México), metanol (J.T Baker, Estados Unidos), acetona (Fermont, México), Sorbitan<sup>®</sup> 80 (Euroquímica, México), colesterol (Sigma-Aldrich, Lote: SLBT3071V, Estados Unidos), Epikuron<sup>®</sup> 200 (Degussa, Lote: 149079, Alemania), Brij<sup>®</sup> 96 (Lipoquímica, Europa), aceite mineral (Farmacia París, México), alcohol isopropílico (J. T Baker, Estados Unidos), Tween<sup>®</sup> 80 (Droguería Cosmopolita, México), fosfato de potasio monobásico (J. T Baker, Estados Unidos), hidróxido de sodio (J.T Baker, Estados Unidos), Brij<sup>®</sup> 58 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), miristato de isopropilo (Droguería Cosmopolita, México), vitamina E (Droguería cosmopolita, México), butilhidroxitolueno (Droguería Cosmopolita, México), butilhidroxianisol (Droguería Cosmopolita, México), propilenglicol (Droguería Cosmopolita, México), Transcutol<sup>®</sup> (Gattefossé, Francia).

**Método**

***Diagrama de flujo de la metodología general del proyecto de tesis***







## ***Descripción de los métodos***

### **Caracterización del fármaco**

#### **Solubilidad**

Preparación de la muestra. Se colocaron 5 mL de diferentes excipientes (Tween<sup>®</sup>.20, Tween<sup>®</sup> 80, propilenglicol) y disolventes (etanol, alcohol isopropílico) en tubos de ensaye; se agregó un exceso de ranitidina HCl en cada uno, estas mezclas se dejaron en reposo durante 24 h. Pasado este tiempo se leyeron en un espectrofotómetro UV-VIS haciendo un barrido de 200 a 400 nm, utilizando como blanco cada sustancia utilizada.

Preparación de la referencia. Se pesaron 25.3 mg de ranitidina HCl con una pureza de 99.58% en base húmeda (% B.H), se disolvieron en 100 mL de agua, se tomó una alícuota de 2 mL y se diluyó a 50 mL con agua (10.08 µg/mL), se leyó en un espectrofotómetro UV-VIS haciendo un barrido de 200 a 400 nm utilizando agua como blanco.

Para calcular la solubilidad se utilizó el método de comparación con un estándar, la fórmula utilizada fue:

$$\frac{Abs\ muestra}{Abs\ referencia} \times \frac{25.3\ mg}{100\ mL} \times \frac{2\ mL}{50\ mL} \times \frac{99.58\%}{100\%} \times FD$$

FD: Factor de dilución

#### **Espectro UV**

Se preparó una muestra de ranitidina HCl a una concentración de 12 µg/mL aproximadamente en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4; se realizó un barrido de 200 a 400 nm.<sup>60</sup>

## **Validación de métodos para la cuantificación de ranitidina HCl**

### ***Ranitidina HCl en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4***

Se realizó una curva de calibración de ranitidina HCl en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 para la cuantificación del fármaco en los estudios de liberación.

Se prepararon 2 L de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 de acuerdo a la USP número 24.<sup>61</sup> Se pesaron 25.5 mg de ranitidina HCl (ran HCl) con una pureza de 99.58% en base húmeda, se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL (concentración 253.929 µg/mL). La concentración de la solución madre en todos los casos se determinó de la siguiente forma:

$$\text{Conc. Sln madre} = \frac{\text{Peso ran HCl (mg)}}{100 \text{ mL}} \times \frac{\text{Pureza en B.H (\%)}}{100\%} \times 1000 = \mu\text{g/mL}$$

A partir de esta solución madre se hicieron las diluciones necesarias para tener soluciones en un rango de concentraciones de 0.25 µg/mL a 25 µg/mL

Se evaluaron los siguientes parámetros:

- Linealidad: Se prepararon 5 concentraciones por triplicado a partir de una solución madre de concentración conocida. Se determinó el coeficiente de correlación ( $r^2$ ), la ordenada al origen y la pendiente.<sup>62,63</sup>

Preparación de la solución madre. Se pesaron aproximadamente 5 mg de ranitidina y se colocaron en un matraz volumétrico de 100 mL, aforando con diluyente.

- Exactitud: Se realizaron seis pesadas independientes de aproximadamente 5 mg de ranitidina HCl, se colocaron en un matraz volumétrico de 50 mL, se aforó con el diluyente correspondiente, se tomó una alícuota (de 0.5 mL para

la curva de ranitidina HCl con solución amortiguadora en contacto con piel y 0.75 mL para la curva de ranitidina con metanol en contacto con piel) y se llevó a 10 mL. Se determinó el porcentaje de recobro y el coeficiente de variación (C.V).<sup>64</sup>

- Precisión: Se prepararon a partir de una solución madre seis determinaciones de la concentración que representa el 100 % en dos diferentes días. Se determinó el coeficiente de variación (C.V).<sup>63</sup>
- Repetibilidad: Se prepararon a partir de una solución madre, tres concentraciones diferentes por sextuplicado. Se determinó el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) y el coeficiente de variación (C.V).<sup>63,64</sup>

### ***Ranitidina HCl en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel de cerdo***

Se preparó una curva de calibración para ranitidina en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, la cual se mantuvo previamente en contacto con piel de cerdo. Esta curva se utilizará para cuantificar la ranitidina que alcance el medio receptor durante los estudios de permeación. En este caso la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 se puso en contacto con la parte interna de piel de cerdo durante 8 h con agitación magnética. Esta solución se filtró para eliminar residuos o impurezas provenientes de la piel, que pudieran interferir en las lecturas de absorbancia. La curva se preparó en un rango de concentraciones de 2.5-15.0  $\mu\text{g/mL}$ .

La filtración se realizó de forma manual con un portafiltros pasando la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel primero a través de papel filtro, después por un pre-filtro tipo AP y finalmente a través de una membrana tipo HVMP de 0.45  $\mu\text{m}$ . La cuantificación se realizó por espectrofotometría UV a 315 nm. Se determinó la linealidad, precisión, exactitud y repetibilidad del método tal como

se indica en ranitidina HCl en solución amortiguadora de fosfatos en contacto con piel de cerdo.

### ***Extracción del fármaco remanente en la piel de cerdo***

Al concluir los estudios de permeación, se pretende determinar la cantidad de ranitidina retenida en la piel, para ello es necesario contar con un método de extracción optimizado, que permita extraer el máximo porcentaje de principio activo y sobre todo que sea reproducible.

Para el método de extracción se pesaron 10.2 mg de ranitidina HCl y se disolvieron en 10 mL de metanol, se colocaron 0.1 mL de la solución en piel de cerdo montada en celdas de Franz, se dejó evaporar el disolvente durante 24 h; se cortó la piel humectada en pequeños trozos extrayendo la ranitidina HCl con agitación magnética (velocidad media) durante 24 h en 5 mL de disolvente (solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 o metanol). Pasado este tiempo se filtró la muestra como se indica en el método de Ranitidina HCl en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel de cerdo. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro UV a 315 nm, tomando como blanco el respectivo disolvente.

### ***Ranitidina en metanol en contacto con piel de cerdo***

Para cuantificar la ranitidina retenida en piel al final de los estudios de permeación, se preparó una curva utilizando como disolvente metanol en contacto con piel de oreja de cerdo. En este caso la oreja de cerdo se cortó en trozos pequeños y se colocaron en 2 L de metanol, se tapó el recipiente perfectamente y se agitó mecánicamente durante 24 h. La solución se filtró de la misma forma que la solución de solución amortiguadora en contacto con piel de cerdo. Esta solución

se utilizó como disolvente en la validación para la cuantificación de ranitidina HCl extraída de la piel. La curva se preparó en un rango de concentraciones de 2.5-15.0 µg/mL.

### **Preparación de sistemas submicrónicos**

#### ***Método general para la preparación de microemulsiones***

Preparación de microemulsión placebo. (1) Se pesó la base oleosa, el tensoactivo y cotensoactivo (en ese orden), posteriormente se agitó la mezcla magnéticamente, una vez homogénea la mezcla y sin dejar de agitar, (2) se agregó el equivalente de agua poco a poco con la ayuda de una bureta. Una vez formada la microemulsión se agitó unos minutos más (Ver condiciones de preparación para cada microemulsión en resultados).<sup>31, 65</sup>

Preparación de la microemulsión con ranitidina. Se sigue la misma metodología para la preparación del placebo, sólo que en el paso (2) se disolvió el fármaco en el agua, luego se agregó poco a poco a la mezcla de tensoactivo, cotensoactivo y aceite (con agitación mecánica constante).<sup>31, 65</sup>

#### ***Métodos generales para la preparación de liposomas***

Se probaron distintos métodos para la preparación de los liposomas, con el fin de alcanzar el mayor porcentaje de encapsulamiento en el fármaco. A continuación se describen los métodos utilizados en la preparación de liposomas:

La formulación se preparó con Epikuron<sup>®</sup> 200 (fosfatidilcolina), ya que las membranas biológicas están constituidas por fosfoglicéridos, los cuales son ésteres del glicerol (1, 2, 3-propanotriol) en los que dos de los grupos hidroxilo están

esterificados con ácidos grasos y el restante con un ácido fosfórico que contiene un aminoalcohol (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina o fosfatidilinositol) <sup>66</sup>

Método de hidratación de película. Se pesó Epikuron <sup>®</sup> 200 y Tween <sup>®</sup> 80 o colesterol (Ver cantidades en resultados), y se colocaron en un matraz bola de 250 mL. Los excipientes se disolvieron con 5 mL de etanol, el solvente se evaporó en el rotavapor a 40 °C. Después de este tiempo el matraz se quitó del rotavapor y se dejó a temperatura ambiente sin tapar una noche. La película se hidrató con solución hidroalcohólica al 7%, probando dos volúmenes diferentes para hidratar: 2 mL y 4 mL. La película se despegó del matraz utilizando el rotavapor a 100 rpm durante 30 min a 40 °C. Es importante mantenerlos a esta temperatura ya que 43 °C es la temperatura de transición de los lípidos; la suspensión obtenida se dejó reposar 2 h y después se sonicó durante 30 min. <sup>67, 68</sup>

Método de microencapsulación de vesícula. Se pesaron aproximadamente 60 mg de fosfatidilcolina y 40 mg de colesterol, se disolvieron en 10 mL de cloroformo, se agregaron 5 mL de agua destilada y se emulsificó con un homogenizador Ultra turrax a 7000 rpm por 10 minutos (emulsión agua/aceite), después se agregaron 150 mL de agua destilada (emulsión agua/aceite/agua) y se agitó mecánicamente a 45 °C. Se mantuvo en esas condiciones 120 minutos para evaporar el cloroformo. <sup>69, 70</sup>

Método de inyección de éter. Se pesaron 84.5 mg de PC y 15.5 mg de Tween <sup>®</sup> 80 en un matraz bola de 25 mL, se disolvieron en 5 mL de etanol, el solvente se evaporó para formar una película, después se hidrató la película con 5 mL de agua en el rotavapor a 100 rpm durante 15 min a 55 °C. Una vez suspendida la capa se agitó magnéticamente a 55 °C y se agregaron lentamente 4 mL de éter dietílico en la campana de extracción con una bomba de infusión. Se dejó evaporar el éter por 2 h con agitación magnética a 55 °C. <sup>25, 70</sup>

## **Método para determinar el porcentaje de encapsulamiento de fármaco en los sistemas**

### ***Microemulsiones***

Para calcular la cantidad máxima de ranitidina HCl que soporta la microemulsión (ME), se realizó un cálculo de acuerdo con su solubilidad en agua (660 mg/mL)<sup>50</sup> determinando la cantidad teórica de ranitidina HCl a disolver en la cantidad de agua que contiene la microemulsión. Se pesó la cantidad teórica de ranitidina HCl y se agregó a la microemulsión poco a poco hasta que se empezó a ver algunos cristales sin disolver, la cantidad de ranitidina HCl sobrante se pesó para calcular la cantidad que se disolvió.<sup>32</sup> En seguida se muestra la fórmula para calcular el porcentaje de encapsulamiento en las ME.

$$\begin{aligned} & \% \text{ ranitidina HCl encapsulada} \\ & = \frac{\text{Cantidad soluble en la ME} \times 100}{\text{Cantidad teórica soluble en los mL de agua de la ME}} \end{aligned}$$

### ***Liposomas***

Para calcular el porcentaje de encapsulamiento se probaron varios métodos, los cuales se describen a continuación.

Método de centrifugación de mini-columna. La finalidad de este método es retener el fármaco libre en la columna y que los liposomas salgan, para poder romperlos y cuantificar el fármaco encapsulado. Se realizó empacando jeringas de 5 mL con sephadex G-10 previamente hidratada; después de empacar las jeringas se almacenaron a 4 °C por 12 h antes de usarlas. Una vez pasado este tiempo se centrifugaron (a 1500, 1000 y 500 rpm) para quitar el exceso de agua y se agregó una solución de ranitidina en agua (se prepararon tres muestras) y un blanco de

agua; se centrifugó nuevamente, después se enjuagó con 200  $\mu$ L de agua cada muestra y se volvió a centrifugar.<sup>67</sup> Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro UV a 315 nm, esperando resultados de absorbancia de cero o cercanas a cero, pues lo que se busca en este método es retener la ranitidina en la columna (Ver condiciones probadas en resultados).

Método de ultracentrifugación. Con este método se pretende separar por ultracentrifugación los liposomas (sedimento) de la fase acuosa (sobrenadante), y cuantificar el fármaco libre que queda en el sobrenadante. Se probaron dos condiciones: dos ciclos de 23000 rpm a 5 °C por 1 h <sup>68</sup> y a 40000 rpm por 3 h a 4 °C, <sup>71</sup> pero no se logró separar los liposomas de la fase acuosa donde se encuentra el fármaco libre, así que este método se descartó.

Método de diálisis. En este método la muestra se coloca en una bolsa de diálisis dentro de un medio en la cual el fármaco sea soluble, por difusión el fármaco libre saldrá hacia el medio (donde no hay fármaco) y se podrá determinar la concentración de fármaco libre. <sup>72</sup> Se colocó 1 mL de la solución de ranitidina (referencia o liposomas) dentro de una membrana de celulosa para diálisis con un ancho de 10 mm marca Sigma-Aldrich, la bolsa de diálisis se sumergió en 40 mL de agua destilada con agitación mecánica, se tomaron muestras (1 mL) a diferentes tiempos y se diluyeron a 5 mL con agua destilada, las muestras se leyeron en el espectrofotómetro UV a 315 nm utilizando como blanco agua destilada hasta que la ranitidina difundió por completo.

### **Método de permeación del fármaco a través de la piel de cerdo**

La oreja de cerdo se utilizó como membrana para los estudios de permeación *in vitro*. La piel se cortó con el dermatoma a un grosor de 0.75 mm y se montó en celdas de Franz. Se utilizaron 1.75 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 como medio receptor; en el compartimento donador se colocaron los sistemas



preparados: microemulsión (500  $\mu$ l) y liposomas (250  $\mu$ L). En total se utilizaron 10 celdas con las siguientes muestras en el donador:

- Un blanco de la formulación (placebo)
- Una referencia del fármaco
- Ocho muestras con la formulación

Antes de colocar la formulación en la cámara donadora, se hidrató la piel con el medio receptor (la piel debe quedar en contacto con solución amortiguadora sin que haya burbujas de aire) en un baño a 37 °C con agitación constante durante 30 min, una vez pasado este tiempo se reemplazó la solución amortiguadora por medio nuevo y se agregó la formulación en la celda correspondiente. Se tomaron muestras a diferentes tiempos durante 24 h reemplazando por completo el medio receptor. La cuantificación se realizó por espectrofotometría UV a 315 nm.

### **Método de extracción del fármaco remanente en piel**

Una vez terminada la permeación se retiró la piel de las celdas, se eliminó el exceso de muestra y se cortó en trozos la piel humectada. Los trozos se colocaron en frascos con 5 mL de metanol se agitaron mecánicamente durante 24 h, pasado este tiempo la muestra se filtró manualmente a través de papel filtro, después por pre-filtro tipo AP y finalmente a través de membrana tipo HVMP de 0.45  $\mu$ m. La cuantificación se realizó por espectrofotometría UV a 315 nm.

### **Método para realizar los estudios de liberación *in vitro***

El estudio de liberación del fármaco se realizó colocando 1 mL de la formulación placebo y 1 mL de la formulación cargada con fármaco por sextuplicado

en bolsas de membrana de celulosa para diálisis con un ancho de 10 mm marca Sigma-Aldrich. Las bolsas de diálisis se colocaron en vasos de precipitados con 40 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en un baño a 37 °C y con agitación magnética, realizando muestreos a diferentes tiempos durante 24 h. Las muestras se cuantificaron por espectrometría UV a 315 nm.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Caracterización de ranitidina HCl

#### Solubilidad

Los resultados de la solubilidad de ranitidina HCl se muestran en la tabla 1, como se puede observar en las muestras con Tween<sup>®</sup> 80 y Tween<sup>®</sup> 20 no se disolvió el fármaco, debido a que este es hidrofílico, así que no se leyeron en el espectrofotómetro.

<b>Tabla 1.</b> Resultados de solubilidad de ranitidina HCl en diferentes excipientes y solventes.	
<b>Muestra</b>	<b>Solubilidad (mg/mL)</b>
Ranitidina HCl/ Tween <sup>®</sup> 20	Insoluble
Ranitidina HCl/ Tween <sup>®</sup> 80	Insoluble
Ranitidina HCl/ Propilenglicol	0.5067
Ranitidina HCl/ Etanol	1.2145
Ranitidina HCl/ Isopropanol	0.1907

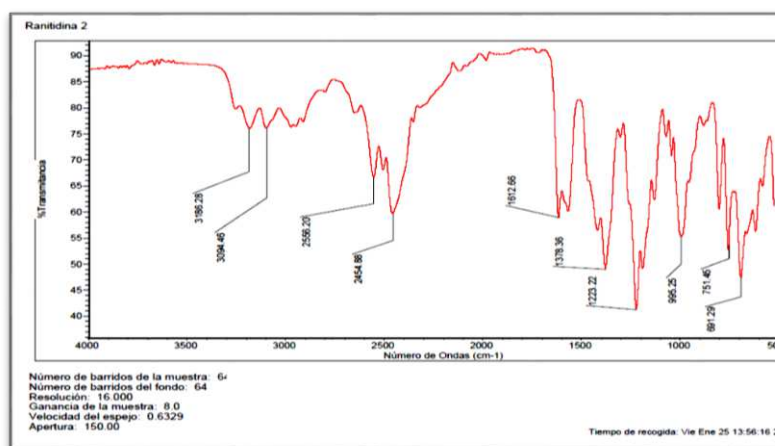
La solubilidad más alta se obtuvo en etanol; sin embargo, se quería contar con otros disolventes para utilizarlos como alternativa en el método de extracción, por lo que se realizó una investigación bibliográfica y se encontró que la solubilidad en metanol es: para Forma 1= 46.943 g/100g a 31 °C y Forma 2= 47.834 g/100g a

29.90 °C<sup>73</sup>, aunque se debía conocer con que polimorfo se estaba trabajando, para lo cual se realizaron pruebas de Infrarrojo (IR) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

## **Polimorfismo**

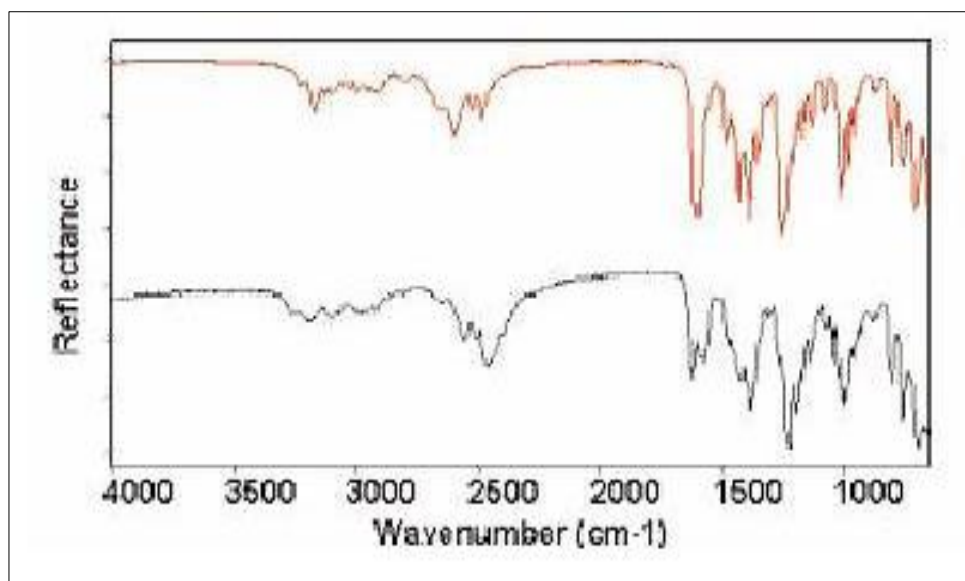
Como ya se mencionó la sal de ranitidina, clorhidrato de ranitidina, tiene dos polimorfos (Forma 1 y Forma 2). El polimorfismo se define como la capacidad de una sustancia de existir en dos o más fases cristalinas que tienen diferentes arreglos y/o conformación de las moléculas en el cristal, lo que repercute en sus propiedades fisicoquímicas, además de requerir diferentes condiciones y parámetros de formulación, proceso y estabilidad, tanto del fármaco como de los excipientes,<sup>74</sup> de ahí la importancia de determinarlo.

Primero se realizó el espectro IR el cual se muestra en la figura 15 y se comparó con los IR de la figura 16. En la figura 17 se muestran las formas tautoméricas de la ranitidina HCl donde se observa que la Forma 1 tiene un doble enlace C-C y la Forma 2 un doble enlace C-N.

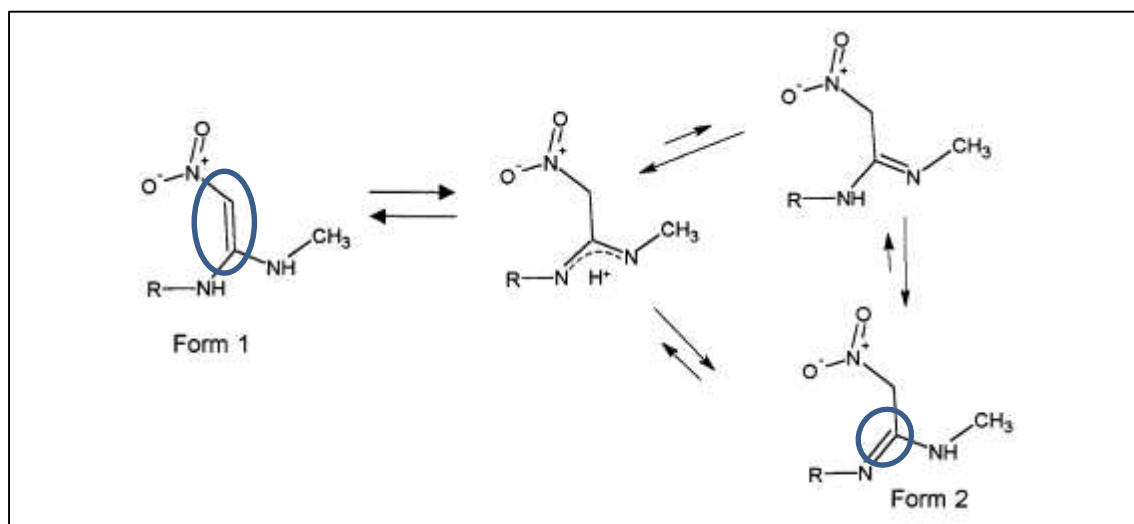


**Figura 15.** Espectro IR de la ranitidina HCl utilizada.

En la figura 16 se muestra el espectro Infrarrojo reportado en la literatura para ambos polimorfos.<sup>75</sup> El fármaco con el que se está trabajando presenta señales IR características de Forma 2 que corresponden a: Tensión C-H ( $3186.28\text{ cm}^{-1}$  y  $3094.46\text{ cm}^{-1}$ ), Tensión S-H ( $2556.20\text{ cm}^{-1}$ ), flexión C=N ( $1612.66\text{ cm}^{-1}$ ), Flexión – CH<sub>3</sub> ( $1378.36\text{ cm}^{-1}$ ). A diferencia de la Forma 2, la Forma 1 presenta un enlace C=C (Figura 17) a  $1600\text{ cm}^{-1}$  el cual produce una señal más intensa. <sup>75</sup>

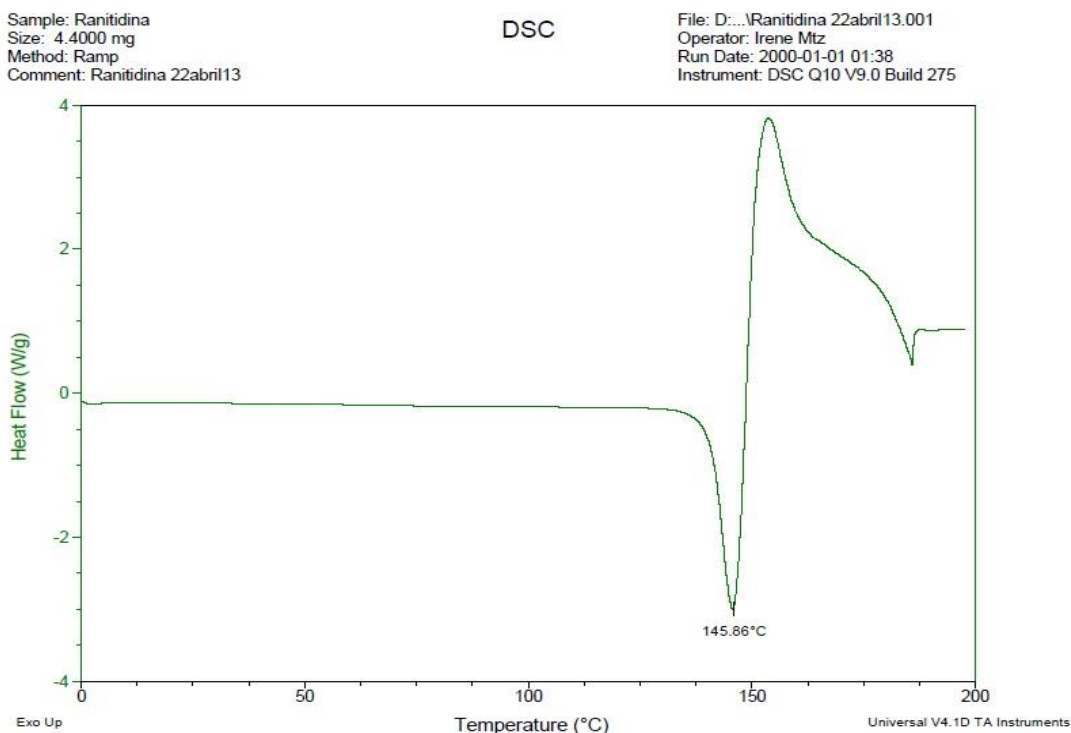


**Figura 16.** Espectro IR de ranitidina HCl. Forma 1 (arriba), Forma 2 (abajo). <sup>75</sup>



**Figura 17.** Formas tautoméricas de ranitidina HCl. <sup>51</sup>

Para corroborar este resultado se realizó un DSC (Figura 18), dando como resultado un punto de fusión de 145 °C, correspondiente al de Forma 2 (140-144 °C) <sup>76</sup>, es decir, que se trabajó con la forma más estable del fármaco al tener un punto de fusión mayor.

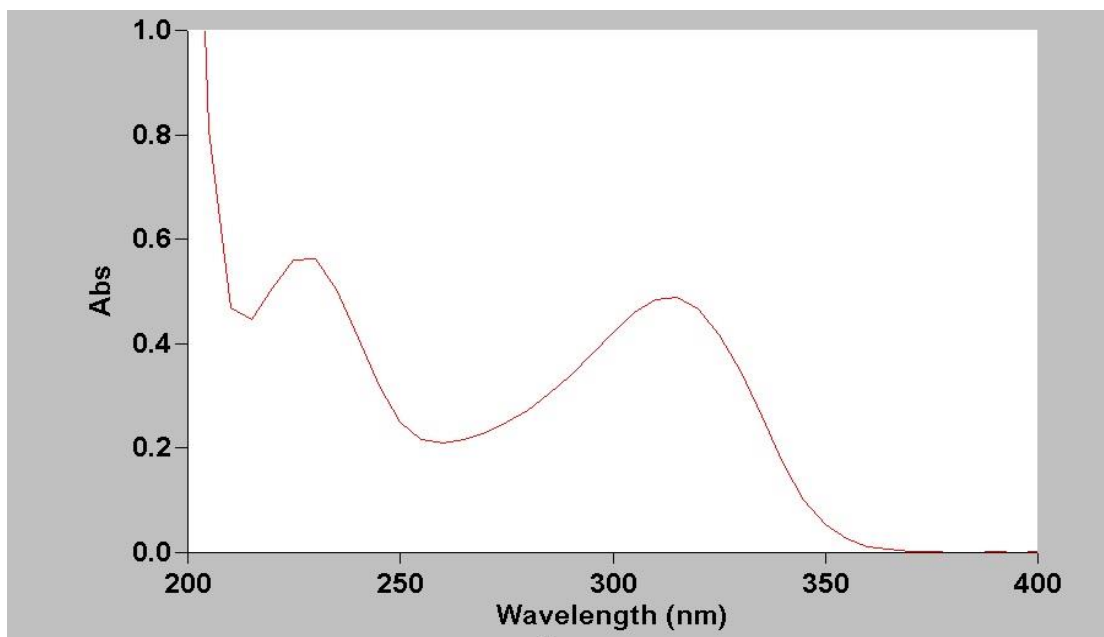


**Figura 18.** Termograma de ranitidina HCl. Punto de fusión 145.86 °C.

## Espectro UV

Se obtuvieron dos máximos de absorción (Figura 19) a 230 nm (absorbancia= 0.5624) y a 315 nm (absorbancia= 0.4877), se decidió utilizar 315 nm como longitud de onda para la cuantificación de ranitidina para evitar la interferencia de componentes de la piel, como las proteínas que absorben a 280 nm, <sup>77</sup> y de los disolventes como el metanol con un cut-off (límite de transparencia) de 205 nm y el etanol de 210 nm (en los cuales la solubilidad de ranitidina HCl es alta). Ya que al

trabajar con longitudes cercanas o por debajo del cut-off aumenta el ruido de base debido a la facilidad con la que el disolvente absorbe. <sup>78</sup>



**Figura 19.** Espectro UV de ranitidina HCl en buffer de fosfatos pH 7.4 a una concentración de 12.12 µg/mL.

## 6.2. Validación de los métodos para la cuantificación de ranitidina HCl

### 6.2.1. Ranitidina HCl en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4

Las concentraciones y los resultados se muestran en la Tabla 2. Se utilizó espectrofotometría UV para la cuantificación del activo a una longitud de onda de 315 nm, encontrando que a una concentración de 0.2539 µg/mL los datos no son precisos (C.V= 5.45%). Se decidió utilizar la curva de calibración en un rango de concentraciones entre 1.25 µg/mL a 20 µg/mL. Ecuación de la recta: Absorbancia = 0.046 \* (concentración µg/mL) + 0.001.

**Tabla 2.** Datos de la curva estándar de ranitidina HCl en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4.

Conc. (µg/mL)	ABS	Promedio	% C.V	Especificaciones	Resultado
0.2539	0.0276	0.0260	5.45	$r^2 > 0.98$ <sup>64</sup> C.V < 3%	$r^2 = 0.9981$
0.2539	0.0255				
0.2539	0.0249				
0.6094	0.0412	0.0406	1.75		
0.6094	0.0407				
0.6094	0.0398				
1.2696	0.0715	0.0702	1.67		
1.2696	0.0697				
1.2696	0.0693				
2.5393	0.1261	0.1262	1.98		
2.5393	0.1288				
2.5393	0.1238				
5.0786	0.2315	0.2332	0.92		
5.0786	0.2325				
5.0786	0.2356				
7.6179	0.346	0.3475	0.68		
7.6179	0.3502				
7.6179	0.3462				
10.1572	0.4549	0.4564	0.43		
10.1572	0.4586				
10.1572	0.4556				
12.6965	0.5764	0.5708	0.96		
12.6965	0.5655				
12.6965	0.5704				
15.2357	0.6915	0.6943	0.38		
15.2357	0.6947				
15.2357	0.6967				
20.3143	0.9486	0.9574	0.99		
20.3143	0.9675				
20.3143	0.9562				
25.3929	1.1843	1.1829	0.79		
25.3929	1.1914				
25.3929	1.1729				



### 6.2.2. Ranitidina HCl en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel de cerdo

En la tabla 3 se muestran los resultados de la validación, de acuerdo con las especificaciones del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México (CNQFBM) <sup>64</sup> todos los parámetros cumplen.

<b>Tabla 3.</b> Resultados de la validación de ranitidina HCl en solución amortiguadora de fosfatos en contacto con piel de cerdo.		
<b>Parámetro</b>	<b>Especificación</b>	<b>Resultado</b>
Linealidad	$r^2 > 0.98$ C.V $\leq 3\%$	$r^2 = 1$ C.V $\leq 1.07\%$
Exactitud	% de recobro: 97% al 103% C.V $\leq 3\%$	% de recobro: 98.44-100.98% C.V= 0.95%
Precisión	C.V $\leq 3\%$	C.V= 1.78%
Repetibilidad	$r^2 > 0.98$ C.V $\leq 3\%$	$r^2 = 0.9997$ C.V $\leq 1.04\%$

Para saber si la piel causa interferencia en las absorbancias, se realizó una prueba de t de student ( $\alpha=0.05$ ) comparando las pendientes de la curva de ranitidina HCl con solución amortiguadora de fosfatos y la curva de ranitidina HCl con solución amortiguadora en contacto con piel, de acuerdo con los resultados ( $t_{\text{valor crítico}}= 4.30$ ,  $t_{\text{estadístico}}= 0.34$ ), no hay diferencia significativa entre las pendientes; por lo tanto la piel no está causando interferencia en los resultados de absorbancia.

### 6.2.3. Método de extracción del fármaco remanente en la piel

El fármaco se extrajo de la piel primero con 5 mL de metanol y 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 respectivamente; encontrando rendimientos por debajo del 50 % así que se decidió variar el disolvente con el que se prepara la solución inicial, utilizando esta vez alcohol etílico e isopropanol, obteniendo mejores rendimientos (mayor a 60 %) utilizando alcohol para preparar la muestra inicial de ranitidina HCl y metanol como disolvente extractor (se prepararon seis muestras para calcular el % C.V), tal como se observa en la tabla 4; para calcular la concentración total extraída se utilizó la curva estándar de ranitidina HCl en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 en contacto con piel. Tomando como 100 % la concentración inicial:

$$Conc. final = \frac{10.2 mg}{10 mL} \times \frac{0.1 mL}{5 mL} \times \frac{99.58\%}{100\%} \times 1000 = 20.31 \mu g/mL$$

<b>Tabla 4.</b> Resultados de la extracción de ranitidina HCl en la piel.					
<b>Disolvente extractor</b>	<b>Muestras</b>	<b>Abs</b>	<b>Conc. (µg/mL)</b>	<b>% Extraído</b>	<b>%C.V</b>
Solución amortiguadora	1	0.6568	14.15	69.67	9.53%
	2	0.5697	12.28	60.45	
	3	0.5506	11.87	58.43	
Metanol	1	0.7105	15.31	75.36	10.66%
	2	0.6944	14.96	73.65	
	3	0.7673	16.53	81.37	
	4	0.6600	14.22	70.01	
	5	0.6163	13.28	65.38	
	6	0.5658	12.19	60.04	

De acuerdo a los datos anteriores se realizó la validación del método para cuantificar la ranitidina HCl remanente en la piel extraída en metanol. Los resultados de la validación se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5.** Resultados de la validación de ranitidina HCl en metanol en contacto con piel de cerdo.

<b>Parámetro</b>	<b>Especificación <sup>64</sup></b>	<b>Resultado</b>
Linealidad	$r^2 > 0.98$ C.V $\leq 3\%$	$r^2 = 0.9988$ C.V $\leq 1.48\%$
Exactitud	% de recobro: 97% al 103% C.V $\leq 3\%$	% de recobro: 97.54-102.96% C.V= 2.10%
Precisión	C.V $\leq 3\%$	C.V= 1.10%
Repetibilidad	$r^2 > 0.98$ C.V $\leq 3\%$	$r^2 = 0.9987$ C.V $\leq 1.30\%$

### 6.3. Microemulsiones con ranitidina HCl

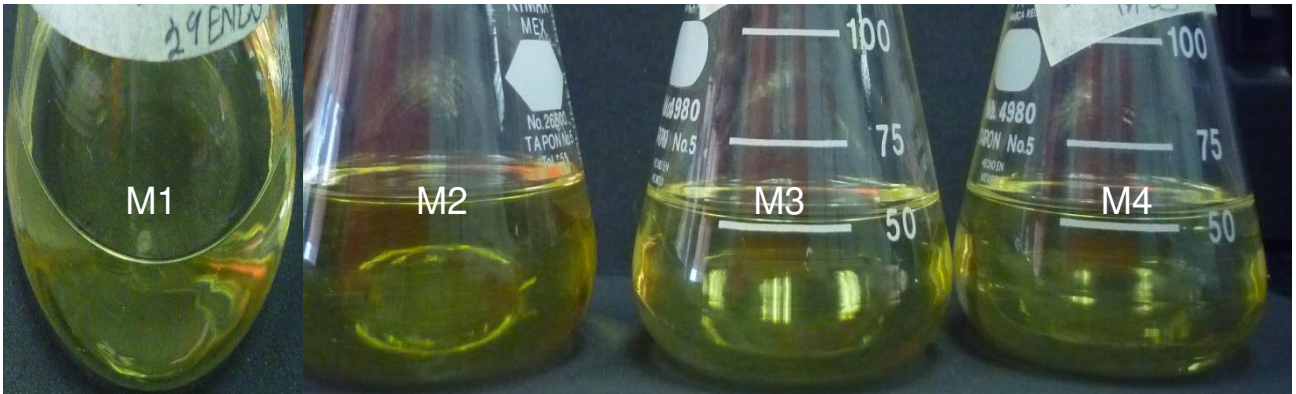
#### 6.3.1. Microemulsiones con miristato de isopropilo como fase oleosa

Se prepararon cinco microemulsiones agua/aceite partiendo de una microemulsión de la tesis: Liberación transdérmica de piroxicam empleando microagujas, <sup>79</sup> que utiliza miristato de isopropilo (IPM) como fase oleosa, Tween<sup>®</sup> 80 como tensoactivo (S), etanol como cotensoactivo (CoS) y agua. Es importante mencionar que las microemulsiones preparadas fueron de tipo agua/aceite debido a que la ranitidina HCl es muy soluble en agua y por lo tanto las micelas que se forman atrapan el agua y con ella al fármaco. En la tabla 6 se muestran los porcentajes de excipientes utilizados en cada formulación, con una relación S: CoS 5:1.

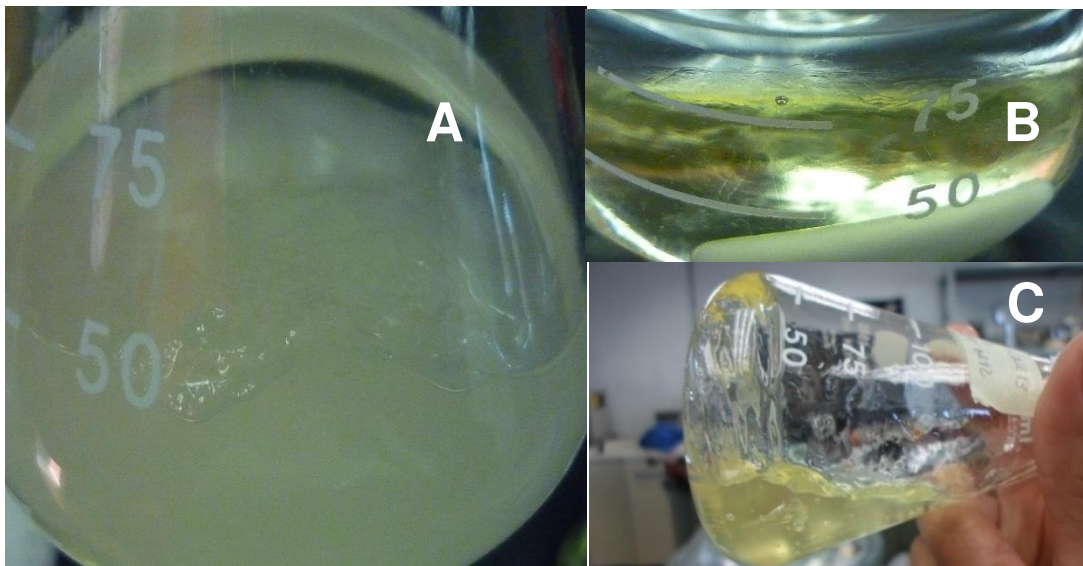
<b>Tabla 6. Microemulsiones elaboradas.</b>						
<b>Excipiente</b>	<b>Microemulsiones/ Porcentaje (p/p)</b>					
	M1*	M2	M3	M4	M5	M6
IPM	40	30	50	35	60	50
Tween <sup>®</sup> 80	41.65	50	33.33	41.67	20.8334	29.1666
Etanol	8.35	10	6.67	8.33	4.1666	5.8334
Agua	9.7	10	10	15	15	15

\* Basada en la tesis de García P. Liberación transdérmica de piroxicam empleando microagujas. <sup>79</sup>  
M= muestra

En la figura 20 se muestran las microemulsiones M1, M2, M3 y M4, las cuales tienen un aspecto transparente color amarillo claro. Sin embargo, en la figura 21 se puede observar que en la M5 se formó un precipitado blanco y la M6 se observa cristalina pero en realidad hay una separación de fases (una de las cuales es muy viscosa), en ambos casos esto se debe a la disminución de la concentración de la relación tensoactivo/cotensoactivo.

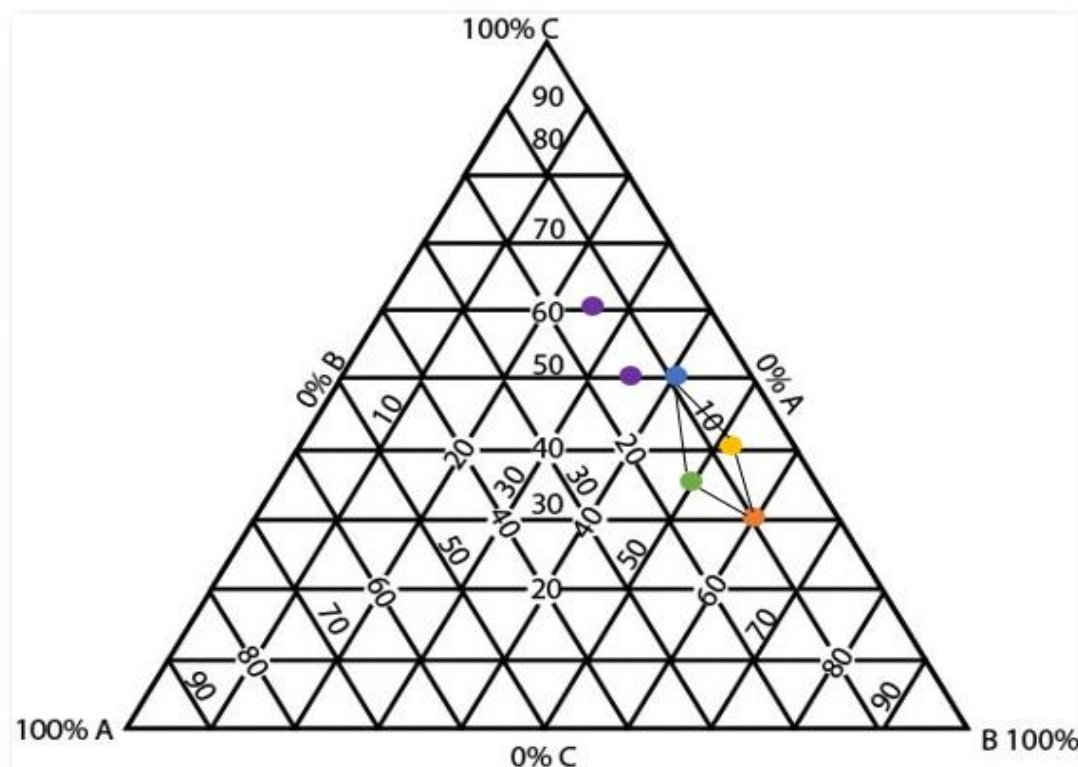


**Figura 20.** Microemulsiones preparadas con aspecto homogéneo, y transparente. De izquierda a derecha M1, M2, M3 y M4.



**Figura 21.** Formulaciones que no formaron microemulsiones. A) M5, se observa precipitado blanco. B) M6, se observa separación de fases, una de las cuales es muy viscosa tal como se observa en la figura C.

En la figura 22 se muestra el diagrama ternario con la zona de formación de las microemulsiones, las cuales corresponden a los porcentajes para las formulaciones M1, M2, M3 y M4.



**Figura 22.** Diagrama ternario de las microemulsiones elaboradas con IPM como fase oleosa. Los puntos de unidos por la línea negra representan los porcentajes de las microemulsiones formadas (M1, M2, M3 y M4). Los puntos morados representan las microemulsiones no formadas (M5 y M6). Los componentes están representados por las letras en donde A= % Agua, B= %Tween<sup>®</sup> 80/Etanol y C= % Miristato de isopropilo

Para formular con el principio activo se eligieron las formulaciones M1 porque fue la formulación referencia y M3 debido a que tiene la menor concentración de tensoactivo, como se sabe los tensoactivo en grandes cantidades pueden llegar a ser tóxicos pero los tensoactivos no iónicos tienen un importante uso en formulaciones tópicas<sup>80</sup>, son menos tóxicos y menos irritantes para las superficies celulares<sup>81</sup>. Las formulaciones se muestran en la tabla 7. Para estas microemulsiones la cantidad máxima que se disolvió de ranitidina fueron 5 g, los

cuales representan un porcentaje de encapsulamiento de 78.10 % para M1 y de 75.76 % para M3.

<b>Tabla 7. Formulaciones con principio activo.</b>		
<b>Excipiente</b>	<b>Porcentaje (p/p)</b>	
	M1	M3
IPM	40	50
Tween <sup>®</sup> 80	41.65	33.33
Etanol	8.35	6.67
Agua	9.7	10
Ranitidina HCl	5g	5g
IPM= miristato de isopropilo, M= muestra.		

Las microemulsiones anteriores tuvieron un aspecto transparente color amarillo claro (Figura 20), se mantuvieron a temperatura ambiente pero después de una semana su aspecto cambió a color anaranjado (Figura 23), lo que indica una interacción entre la ranitidina HCl y alguno de los excipientes, por esta razón se preparó una solución de ranitidina HCl (20 mg en 10 mL de una mezcla de etanol-agua 3:1), colocando 2 mL de esta solución en 3 mL de IPM y en 3 mL Tween<sup>®</sup> 80; después de una semana la coloración anaranjada se presentó en la mezcla de ranitidina-IPM. Existen diversos reportes previos sobre el cambio de coloración del principio activo en presencia de diversos excipientes. Esto parece atribuible a una oxidación.<sup>82</sup>



**Figura 23.** Microemulsiones con ranitidina HCl. Después de una semana se observó cambio de color de amarillo a anaranjado.

De acuerdo con Jim Jiao (2008), ha sido bien documentado que los tensoactivos no iónicos tienen generalmente ciertos residuos de peróxidos. Peróxidos ya sea tipo hidro u orgánicos, pueden actuar para iniciar procesos de cadenas de radicales y oxidar fármacos susceptibles, lo que resulta en un daño significativo a los fármacos. El daño de oxidación por efecto de estos peróxidos en fármacos ha sido reportado para el clorhidrato de benzocaína y penicilinas.<sup>83</sup> Además de que la ranitidina HCl tiende a degradarse en presencia de humedad, incremento de temperatura, la luz y gases atmosféricos (oxígeno).<sup>84</sup>

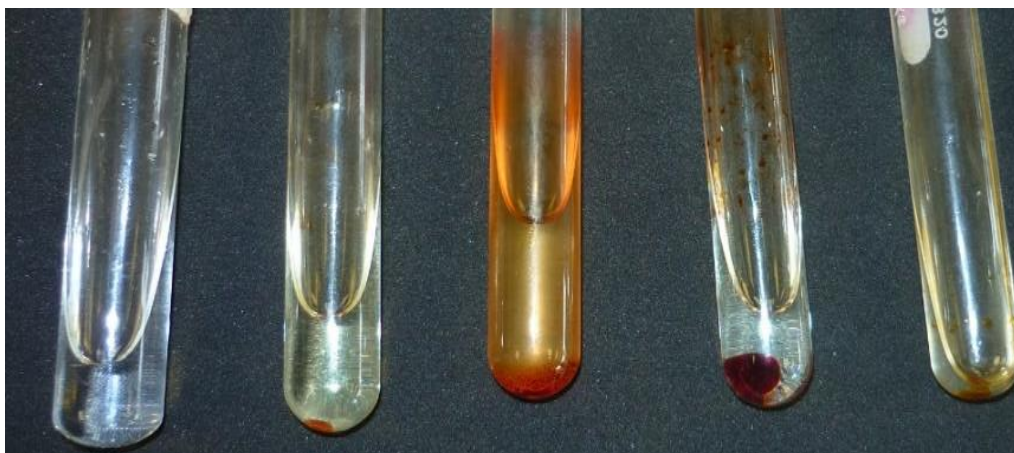
Por lo cual se decidió agregar un antioxidante, en este caso se utilizó vitamina E ya que además de ser un antioxidante, protege la piel disminuyendo la producción de peróxidos en los lípidos de la epidermis y protege contra la exposición UV.<sup>85</sup> Se agregó desde el 0.1 % (p/p) hasta el 100 % (p/p), disminuyendo la cantidad proporcional en el tensoactivo (Tween<sup>®</sup> 80), pues la vitamina E también se puede utilizar como un tensoactivo en la preparación de microemulsiones.<sup>86</sup> Con una proporción mayor al 30 % de vitamina E la microemulsión ya no se formaba. Se utilizaron además otros dos antioxidantes el Butil Hidroxitolueno (BHT) y el Butil Hidroxianisol (BHA) en porcentajes de 0.001 % a 0.1 %.<sup>87</sup>

Con los tres antioxidantes las microemulsiones se almacenaron en diferentes condiciones: frasco transparente (temperatura ambiente y refrigeración), frasco ámbar (temperatura ambiente y refrigeración). Pero el cambio de color se hizo presente nuevamente incluso con la vitamina E este cambio se dio en menor tiempo.

Así que se probaron otros aceites que pudieran ser utilizados como fase oleosa: ácido oleico, aceite de almendras, aceite de ricino, aceite vegetal y aceite mineral. Se mezclaron 2 mL de la solución de ranitidina HCl disuelta en una mezcla de agua-etanol 3:1 con 3 mL de aceite respectivamente; aunque la mezcla fue heterogénea se presentó un color anaranjado con ácido oleico, aceite de almendras, aceite de ricino y aceite vegetal; con aceite mineral no hubo ningún cambio de coloración (el aceite mineral se mantuvo transparente) tal como se observa en la figura 24. Ante estos resultados, se formularon las microemulsiones anteriores (M1-



M5) utilizando aceite mineral como base oleosa en lugar del IPM; no obstante ninguna microemulsión se formó.



**Figura 24.** Mezcla de ranitidina HCl con diferentes bases oleosas. De izquierda a derecha: ranitidina con aceite mineral, aceite de ricino, ácido oleico, aceite de almendras y miristato de isopropilo.

### 6.3.2. Microemulsiones con aceite mineral como fase oleosa

#### 6.3.2.1. Formulación de microemulsiones

Se formularon microemulsiones en diferentes proporciones basadas en la patente WO19955033807 <sup>88</sup> utilizando el cromophor y Tween <sup>®</sup> 20 como tensoactivos; propilenglicol, transcuto <sup>®</sup>, polietilenglicol <sup>®</sup> 200, 300 y 600 como cotensoactivos, aceite mineral como fase oleosa y agua; pero no se formó alguna microemulsión. Las microemulsiones se prepararon como se indica en las microemulsiones con IPM como fase oleosa.

En base a los resultados obtenidos, se decidió preparar microemulsiones basadas en formulaciones reportadas en la literatura. En la tabla 8 se muestran tres

de las formulaciones preparadas, en las observaciones se indican algunos cambios que se hicieron y los resultados obtenidos.

**Tabla 8.** Microemulsiones formuladas a partir de reportes encontrados en la literatura.

<b>Excipientes</b>	<b>% (p/p)</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referencia</b>
-Propilenglicol-agua (3:1) -Span <sup>®</sup> 80-Tween <sup>®</sup> 80 (3:1) -Aceite de canola	15.00 46.75 38.25	Se cambió el aceite de canola por aceite mineral.	No se formó	65
-Brij <sup>®</sup> 58 -Span <sup>®</sup> 80 -Alcohol isopropílico -Aceite de soya -Agua	5.2 45.9 10.2 32.5 6.3	Se cambió el aceite de soya por aceite mineral.	No se formó	89
-Brij <sup>®</sup> 58 -Span <sup>®</sup> 80 -Etanol -Aceite de soya -Agua	5.2 46.9 8.7 34.6 4.5	-Se cambió el aceite de soya por aceite mineral. -Aspecto: color amarillo.	Se formó	89

Nota: la mezcla de S-CoS y aceite se realizó a una temperatura de 60 °C.

Como se puede observar estas microemulsiones a diferencia de las preparadas anteriormente contienen una mezcla de tensoactivos.

Sin embargo, dos semanas después se presentó el mismo cambio de color que en las ME con IPM, a pesar de que en pruebas anteriores no se presentara este cambio utilizando aceite mineral. Se agregó BHT como antioxidante (0.1%) aunque sólo retrasó el cambio por una semana más. Por lo tanto la microemulsión quedó formulada de la siguiente forma (Tabla 9):

<b>Tabla 9.</b> Porcentajes p/p de la microemulsión con Brij <sup>®</sup> 58.	
<b>Excipiente</b>	<b>% p/p</b>
Brij <sup>®</sup> 58	5.2
Span <sup>®</sup> 80	46.9
Aceite mineral	34.6
Etanol	8.7
BHT	0.1
Agua	4.5
Ranitidina	1.5 g

Por otro lado en el artículo de los autores Kale y Allen (1989)<sup>90, 91</sup> se documentó la formación de microemulsiones (agua/aceite) con aceite mineral utilizando Brij<sup>®</sup> 96 como surfactante, se prepararon microemulsiones usando tres diferentes relaciones de peso Brij<sup>®</sup> 96: cotensoactivo (propilenglicol, glicerina) 9:1, 3:1 y 1:3; luego se realizaron mezclas de estas proporciones con el aceite mineral en relación de pesos: (Brij<sup>®</sup> 96+cotensoactivo):aceite mineral 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6 y 3:7.

De acuerdo con los resultados obtenidos las formulaciones que se acercaron más a una microemulsión corresponden a la relación (S-CoS 9:1): aceite mineral 9:1 y 7:3, así que se prepararon muestras intermedias, encontrando la formación de una microemulsión con una relación (S-CoS 9:1): aceite mineral 7.5:2.5 y 1.5 de agua. La tabla 10 muestra los porcentajes p/p de los excipientes así como la cantidad de fármaco incluida.

<b>Tabla 10.</b> Porcentajes p/p de la microemulsión con Brij <sup>®</sup> 96.		
<b>Excipiente</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>% p/p</b>
Aceite mineral	25	21.72
Brij <sup>®</sup> 96	67.5	58.64
Propilenglicol	7.5	6.52
Agua	15	13.03
BHT	0.1	0.09
Ranitidina HCl	2.5	2.5 g
Nota: preparación a 110 °C.		

Las microemulsiones que se eligieron para realizar las pruebas de permeación y liberación *in vitro* fueron la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58 y la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 96.

### 6.3.2.2. Caracterización de las microemulsiones

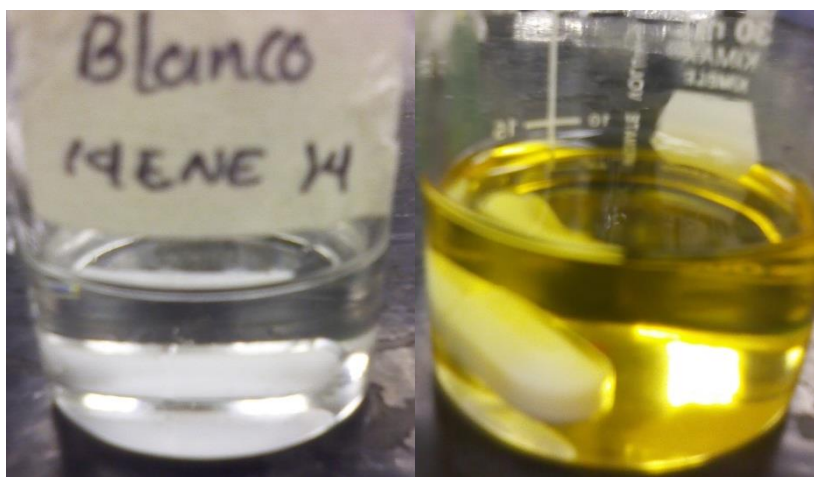
#### Aspecto

En la figura 25 se muestra la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58, como se puede observar tanto el placebo como la muestra son líquidos homogéneos, transparentes, con el color amarillo que le confiere el Span<sup>®</sup> 80.



**Figura 25.** Microemulsión placebo con Brij<sup>®</sup> 58 (Izquierda).  
Microemulsión de ranitidina HCl con Brij<sup>®</sup> 58 (Derecha).

En la figura 26 se muestra la microemulsión placebo y muestra con Brij<sup>®</sup> 96, como se puede observar en este caso el placebo es homogéneo y transparente a diferencia de la muestra, la cual es de color amarillo claro, en este caso el color es por el fármaco.



**Figura 26.** Microemulsión placebo con Brij<sup>®</sup> 96 (Izquierda).  
Microemulsión de ranitidina HCl con Brij<sup>®</sup> 96 (Derecha).

En ambas microemulsiones con ranitidina se observó un cambio de color, aunque en un mayor tiempo (15 días después de la preparación, a temperatura ambiente), comparadas con las microemulsiones que no contienen aceite mineral como base oleosa.

### **Viscosidad**

Los resultados de la viscosidad de 200 a 1000 rpm para la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58 fue de 1.55 poise para el placebo y para las muestras (ME con ranitidina) de M1=2.05 cps, M2= 1.94 poise, M3= 1.93 poise. Con un promedio de  $1.97 \pm 0.066$  poise.

Para la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 96 los resultados de la viscosidad de 100 a 400 rpm fueron de 3.48 poise para el placebo y para las muestras de M1= 4.71 poise, M2= 5.13 poise, M3= 5.75 poise. Con un promedio de  $5.20 \pm 0.52$  poise.

Se considera que las microemulsiones preparadas se comportan como fluidos newtonianos ya que las viscosidades se mantienen prácticamente estables ante el cambio de velocidad.<sup>92</sup>

### **Tamaño de glóbulo**

El tamaño de glóbulo se midió sin diluir la muestra ya que si se agrega agua, la microemulsión se rompe (se rompe el equilibrio en los excipientes). Se utilizó como medio dispersante el aceite mineral, se midió el tamaño en porcentaje de intensidad. Los resultados se muestran en la tabla 11, Si se compara el tamaño de las muestras con el placebo se puede observar que éste es mayor en las muestras, debido a que al encapsular el fármaco los glóbulos aumentan de tamaño.

<b>Tabla 11.</b> Tamaño de glóbulo de las microemulsiones.	
<b>Microemulsión</b>	<b>Resultado</b>
Microemulsión con Brij <sup>®</sup> 58	-ME placebo= 2.775 nm (pdi= 0.603) -ME con ranitidina HCl= 3.899 nm ± 0.710 nm (pdi ≤ 0.675).
Microemulsión con Brij <sup>®</sup> 96	-ME placebo= 268.400 nm (pdi= 1.000) -ME con ranitidina HCl= 294.900 nm ± 80.192 nm (pdi= 1.000)

### **Porcentaje de encapsulamiento**

Para la ME con Brij<sup>®</sup> 58 fue de 1.5 g de ranitidina HCl/100 g de ME (50.5 %), mientras que para la ME Brij<sup>®</sup> 96 fue de 2.5 g de ranitidina HCl/100 g de ME (25.25%).

### **6.3.2.3. Permeación *in vitro* y extracción del fármaco en la piel**

#### **Microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58**

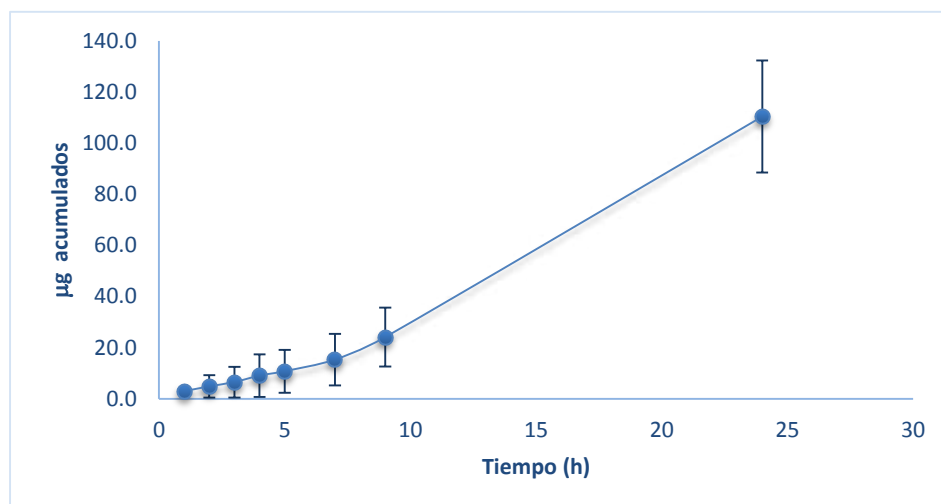
En la tabla 12 se muestran los resultados de la permeación *in vitro* de la microemulsión de ranitidina HCl con Brij<sup>®</sup> 58 y la gráfica se muestra en la figura 27.

**Tabla 12.** Resultados de los  $\mu\text{g}$  acumulados de ranitidina permeados de la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58.

Tiempo (h)	$\mu\text{g}$ de ranitidina HCl acumulados								Promedio ( $\mu\text{g}$ )	% CV
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8		
1	3.583	3.771	2.427	2.518	1.870	1.479	2.284	5.329	2.908	43.018
2	8.005	4.678	2.473	2.563	1.916	1.524	2.879	14.414	4.806	91.665
3	13.492	7.335	3.244	2.608	1.961	1.569	4.023	17.767	6.500	92.553
4	15.152	11.482	5.111	3.097	2.450	2.303	6.424	26.205	9.028	92.138
5	15.197	14.241	5.773	5.111	7.610	2.348	7.346	28.418	10.755	78.005
7	18.558	23.811	11.317	6.936	10.233	4.211	12.363	34.970	15.300	65.966
9	25.723	37.160	21.350	12.860	18.102	12.137	20.616	44.838	24.098	47.789
24	114.465	122.985	114.044	86.943	106.355	93.108	91.124	154.542	110.446	19.878

M= muestra

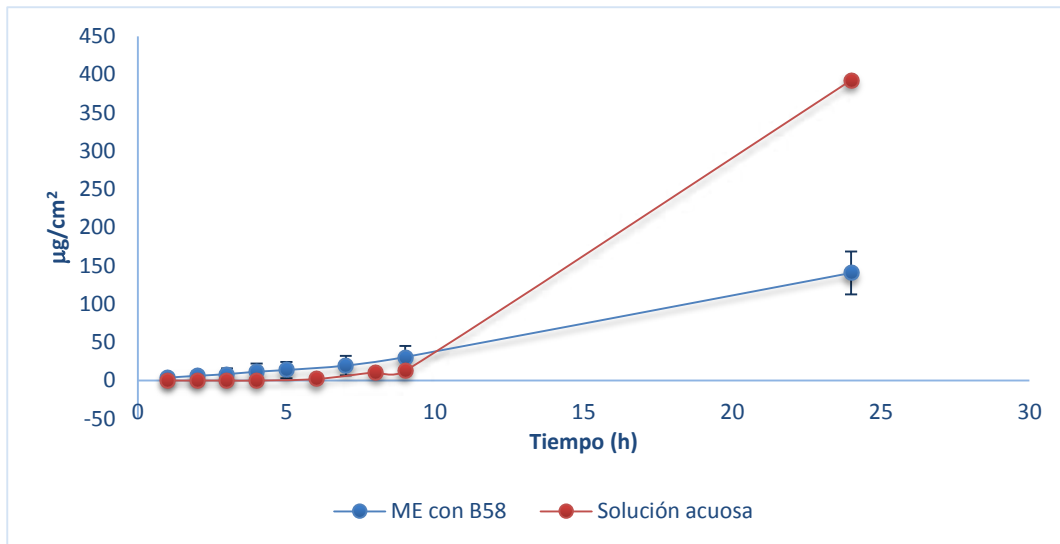
CV= coeficiente de variación



**Figura 27.** Gráfica de la permeación de ranitidina a partir de la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58 (n=8).

En la figura 28 se muestra la comparación de la permeación *in vitro* de ranitidina HCl entre una solución acuosa de ranitidina HCl y la microemulsión de ranitidina HCl con Brij<sup>®</sup> 58, como se puede observar la ranitidina HCl tiene una mayor permeación cuando se aplica en solución acuosa.





**Figura 28.** Comparación de la permeación *in vitro* de ranitidina HCl a partir de una microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58 (n=8) y a partir de una solución acuosa del fármaco (n=1).

Como se puede observar en la Figura 27 la pendiente para los resultados de la ME con ranitidina HCl de 1 h a 7 h es pequeña comparada de las 7 h hasta las 24 h, por lo cual se puede decir que las primeras horas fueron determinantes para que se diera una difusión de la formulación hacia la piel y luego el paso de la ranitidina al medio receptor; por otro lado la cantidad de ranitidina permeada a las 24 h representa sólo el 1.48 % (110.45 µg) de la ranitidina inicial (7450 µg). Si consideramos que se deben administrar 4 mg/Kg/día, a un neonato de aproximadamente 2.5 Kg<sup>93</sup> (tomando en cuenta que tiene una biodisponibilidad del 50% y el 15% se une a proteínas)<sup>94</sup>, se administran entonces 1.4 mg/Kg/día, es decir 3.5 mg para un neonato de 2.5 Kg. En el caso de la vía transdérmica para que se alcance la dosis terapéutica en 24 h, se tendría que colocar la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58 en un área superficial de 19.55 cm<sup>2</sup>.

Además en los µg permeados para cada muestra se observa un alto porcentaje de variación en las primeras horas y a las 24 h los µg permeados son similares para todas las muestras (C.V= 19.88%), con esto podemos decir que no importa si la ranitidina HCl se libera rápidamente en las primeras horas como en el caso de la M8, al final los µg permeados de ranitidina HCl son parecidos en todas las

réplicas, esto se pudo deber a que la formulación estaba totalmente sólida a las 24 h (último muestreo) y no líquida como en un principio, por lo cual la difusión de la ranitidina se vio afectada. Esto puede atribuirse a la difusión de algún componente de la formulación, lo que puede provocar el rompimiento de la ME. Esto dio como resultado que la solución de fármaco (referencia) presentara una mayor permeación (4.36%), además de que a pH's fisiológicos se encuentra escasamente ionizada <sup>94</sup> (pKa's 2.7 y 8.2) y por lo tanto puede atravesar la piel aunque se encuentre en solución.

En la tabla 13 se muestran los resultados del flujo y constante de permeación (Kp) para cada muestra; caracterizando la curva primero de 1h hasta 7 h y después de 7 h a 24 h. El tiempo de latencia fue de 0.0 h.

**Tabla 13.** Resultados de los flujos y Kp de la Microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58 que contiene ranitidina HCl.

Tiempo (h)	µg permeados/cm <sup>2</sup>								Unidades
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	
1	4.5617	4.8013	3.0907	3.2057	2.3815	1.8832	2.9086	6.7851	
2	10.1921	5.9561	3.1482	3.2632	2.4390	1.9407	3.6657	18.3524	
3	17.1784	9.3391	4.1305	3.3207	2.4965	1.9982	5.1224	22.6219	
4	19.2916	14.6196	6.5072	3.9436	3.1194	2.9326	8.1795	33.3650	
5	19.3491	18.1320	7.3505	6.5072	9.6889	2.9901	9.3535	36.1825	
7	23.6281	30.3174	14.4088	8.8312	13.0288	5.3620	15.7409	44.5249	
9	32.7516	47.3137	27.1836	16.3734	23.0483	15.4534	26.2492	57.0889	
24	145.7411	156.5896	145.2044	110.6990	135.4149	118.5479	116.0227	196.7684	
Flujo 1 (1-7h)	3.0165	4.3350	1.8753	0.9955	1.9418	0.5678	2.1594	6.1723	
Kp 1	2.02E-04	2.91E-04	1.26E-04	6.68E-05	1.30E-04	3.81E-05	1.45E-04	4.14E-04	cm/h
Flujo 2 (7-24h)	7.3147	7.3741	7.7594	6.1037	7.3091	6.7389	5.9313	9.0897	µg/cm <sup>2</sup> /h
Kp 2	4.91E-04	4.95E-04	5.21E-04	4.09E-04	4.90E-04	4.52E-04	3.98E-04	6.10E-04	cm/h

M= muestra

Gülten Kantarc y colaboradores (2007) <sup>89</sup> evaluaron la permeación *in vitro* del diclofenaco sódico formulado en una microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58, obteniendo un flujo para las primeras 8 horas de  $0.040 \pm 0.002$  mg/cm<sup>2</sup>/h (utilizaron celdas con un

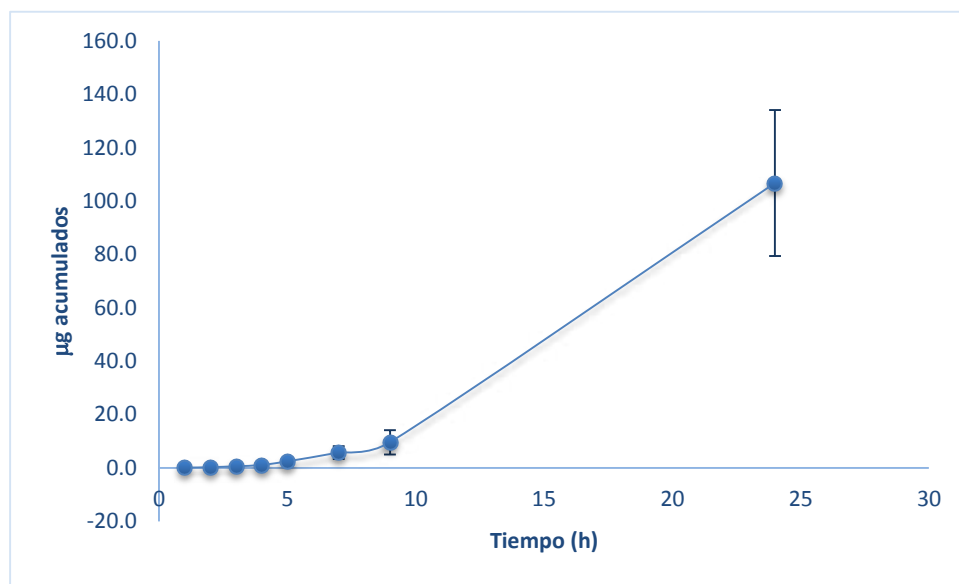
área de 6.15 cm<sup>2</sup>) si se comparan estos resultados con los obtenidos en este trabajo para la ranitidina HCl (Ver tabla 15) el flujo fue de 0.0026 ± 0.002 mg/cm<sup>2</sup>/h en celdas con un área de 0.7854 cm<sup>2</sup>, es decir, con ranitidina HCl se utilizó un área casi 10 veces menor. Hubo muestras como la 1, 2, 7 y 8 en las cuales se obtendrían flujos comparables al de diclofenaco sódico, haciendo la corrección pertinente por el área de exposición.

En la tabla 14 se muestran los resultados de la extracción del fármaco remanente en la piel después de concluida la permeación, como se puede observar, los µg de ranitidina que se retuvieron tanto en las muestras como en la referencia son bajos, el porcentaje de ranitidina es menor al 1 %, si se suma el % de ranitidina permeado (1.48%) más el % de ranitidina extraído (0.774%), se tiene que en total la ranitidina que podría penetrar la piel sería un 2.25%, es decir, 167.62 µg para el caso de la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58.

<b>Tabla 14.</b> Resultados de la extracción de ranitidina remanente en la piel.			
<b>Muestra</b>	<b>µg de ranitidina extraída</b>	<b>% de ranitidina extraída</b>	<b>Promedio del % de ranitidina extraída</b>
1	70.3514	0.944	0.774% ± 0.150 %
2	56.1546	0.754	
3	52.8112	0.709	
4	55.2510	0.742	
5	49.5884	0.666	
6	44.8092	0.601	
7	53.7149	0.721	
8	78.5743	1.055	
Solución	71.5863	0.961	No aplica

## Microemulsión con Brij® 96

En la tabla 15 se muestran los resultados de la permeación *in vitro* de ranitidina HCl formulada en una microemulsión con Brij® 96 y en la figura 29 se muestra la gráfica.



**Figura 29.** Gráfica de la permeación de ranitidina a partir de la microemulsión con Brij® 96 (n=8).

Como se puede observar, en las primeras 4 horas no hubo un incremento considerable en la permeación de la ranitidina, fue hasta las 9.5 h cuando se observa un pequeño cambio en los  $\mu\text{g}$  permeados, por esta razón para el cálculo de flujo y  $K_p$  se consideraron los datos de 1-9.5 h y de 9.5-24 h.

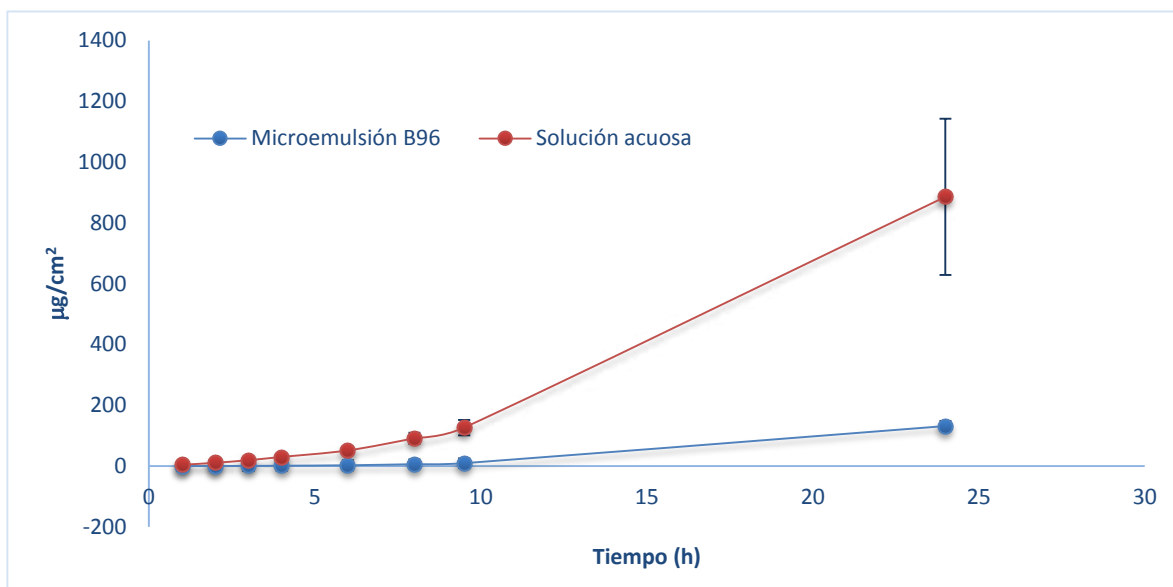
**Tabla 15.** Resultados de los  $\mu\text{g}$  acumulados de ranitidina HCl permeados a partir de la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 96.

Tiempo (h)	$\mu\text{g}$ acumulados de ranitidina HCl								Promedio ( $\mu\text{g}$ )	%C.V
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8		
1	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.045	0.286	0.075	113.137
2	0.090	0.135	0.422	0.090	0.135	0.226	0.301	0.478	0.235	64.391
3	0.260	0.395	1.178	0.286	0.422	0.373	0.798	1.012	0.590	60.138
4	0.519	0.915	2.284	0.549	0.971	0.587	1.280	1.475	1.073	55.987
6	1.667	2.582	4.588	2.021	2.992	1.208	2.465	1.863	2.423	42.884
8	4.110	6.691	9.977	5.322	8.313	2.476	4.941	4.177	5.751	42.614
9.5	6.635	13.326	14.282	8.351	16.665	3.970	7.128	6.345	9.588	47.382
24	102.904	116.230	142.503	120.069	136.733	70.847	95.324	69.910	106.815	25.605

M= muestra

En este caso el por ciento permeado a las 24 h es de 0.85% (106.815  $\mu\text{g}$ ) de 12495  $\mu\text{g}$  que se colocaron inicialmente.

En la figura 30 se muestra la comparación en la permeación *in vitro* de ranitidina HCl entre una solución acuosa de ranitidina HCl y la microemulsión de ranitidina HCl con Brij<sup>®</sup> 96, se encontró que cuando se aplica la ranitidina HCl en solución acuosa permeo un total de 885.96  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  mientras que la ranitidina HCl en la microemulsión permeo 131.97  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  a las 24 h. El aspecto de la ME a las 24 h fue el mismo que con la ME anterior, estaba completamente sólida; y por lo tanto la difusión se vió afectada.



**Figura 30.** Comparación de la permeación *in vitro* de ranitidina HCl a partir de una microemulsión con Brij<sup>®</sup> 96 (n=8) y a partir de una solución acuosa del fármaco (n=2).

Se realizó una prueba t de student ( $\alpha=0.05$ ) para saber si hubo alguna diferencia entre los flujos de la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 96 y la solución de 6-9.5 h y de de 9.5-24 h, los resultados se muestran en la tabla 16, como se puede observar las medias son diferentes, esto quiere decir que existe una diferencia entre los  $\mu\text{g}$  de fármaco permeados/ $\text{cm}^2/\text{h}$  entre la ME y la solución.

**Tabla 16.** Prueba t de student para saber si hay una diferencia entre las  $\mu\text{g}$  de fármaco permeados/ $\text{cm}^2/\text{h}$  entre la ME con Brij<sup>®</sup> 96 y la solución acuosa de ranitidina HCl.

Período evaluado	Resultado
6- 9.5 h	t valor crítico= 2.30 t estadístico= 16.26
9.5- 24 h	t valor crítico= 2.30 t estadístico= 9.35

En la tabla 17 se muestran los resultados de la cantidad permeada por unidad de área y constante de permeación (Kp) para cada muestra caracterizando la curva primero de 6- 9.5 h y después de 9.5- 24 h. El tiempo de latencia fue de 1.29 h. De acuerdo con estos resultados, para alcanzar una dosis terapéutica por vía transdérmica a las 24 h se necesitaría un área superficial de 20.83 cm<sup>2</sup>.

**Tabla 17.** Resultados de los flujos y Kp de la Microemulsión con Brij<sup>®</sup> 96 que contiene ranitidina HCl.

Tiempo (h)	µg permeados/cm <sup>2</sup>								Unidades
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	
1	0.0575	0.0575	0.0575	0.0575	0.0575	0.0575	0.0575	0.3642	
2	0.1150	0.2779	0.5367	0.1150	0.1246	0.2875	0.3833	0.6086	
3	0.3306	0.5175	1.4998	0.3642	0.4265	0.4744	1.0159	1.2890	
4	0.6613	0.9440	2.9086	0.6996	0.9344	0.7475	1.6292	1.8784	
6	2.1227	1.9838	5.8411	2.5732	2.5780	1.5382	3.1386	2.3719	
8	5.2326	5.3188	12.7029	6.7755	5.7070	3.1530	6.2916	5.3188	
9.5	8.4479	8.7545	18.1847	10.6329	8.5964	5.0553	9.0756	8.0789	
24	131.0208	153.8967	181.4396	152.8760	135.9132	90.2047	121.3702	89.0116	
Flujo 1 (6- 9.5 h)	1.7935	1.9201	3.5215	2.2919	1.7112	0.9942	1.6898	1.6221	
Kp 1	7.21E-05	7.72E-05	0.000142	9.21E-05	6.88E-05	4E-05	6.79E-05	6.52E-05	cm/h
Flujo 2 (9.5-24h)	8.4533	10.0098	11.2590	9.8099	8.7805	5.8724	7.7445	5.5816	µg/cm <sup>2</sup> /h
Kp 2	3.40E-04	4.02E-04	4.52E-04	3.94E-04	3.53E-04	2.36E-04	3.11E-04	2.24E-04	cm/h

M= muestra

En la tabla 18 se muestran los resultados de la extracción del fármaco remanente en la piel, como se puede observar, los µg de ranitidina que se retuvieron tanto en las muestras como en la referencia son bajos, el porcentaje de ranitidina es menor al 1 %, por lo tanto si se suma el % de ranitidina permeado (0.85%) más el % de ranitidina extraído (0.582%), se tiene que en total la ranitidina que podría penetrar la piel sería un 1.432 %, es decir, 178.17 µg para el caso de la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 96.

<b>Tabla 18.</b> Resultados de la ranitidina remanente en la piel.			
<b>Muestra</b>	<b>µg de ranitidina extraída</b>	<b>% de ranitidina extraída</b>	<b>Promedio del % de ranitidina extraída</b>
1	69.9598	0.562	0.582%
2	59.0562	0.475	
3	21.9277	0.176	
4	72.2791	0.581	
5	73.3635	0.590	
6	99.6084	0.801	
7	85.3514	0.686	
8	97.4598	0.783	
Solución 1	55.9036	0.449	0.518%
Solución 2	72.9116	0.586	

Tomando en cuenta el tamaño de glóbulo obtenido de la ME con Brij<sup>®</sup> 58 ( $3.899 \pm 0.710$  nm) con fármaco y el porcentaje de fármaco encapsulado, se esperaba una permeación mayor con respecto a la ME con Brij<sup>®</sup> 96 (tamaño de glóbulo con fármaco  $294.000 \text{ nm} \pm 80.192$  nm). Sin embargo, como muestran los resultados, esto no fue así, indicando que el tamaño de glóbulo no es el único factor que influye en el grado de permeación a través de la piel.

#### **6.3.2.4. Liberación *in vitro* del fármaco a partir de las microemulsiones**

##### **Microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58**

A continuación se presentan los resultados del porcentaje liberado de ranitidina (Tabla 19), tal como se puede observar a las 24 h no se liberó el 100% de la ranitidina, de hecho en promedio sólo se liberó el 28%. Cabe mencionar que la ME cambió de líquida a sólida a las 24 h, igual que en la permeación, lo cual pudo



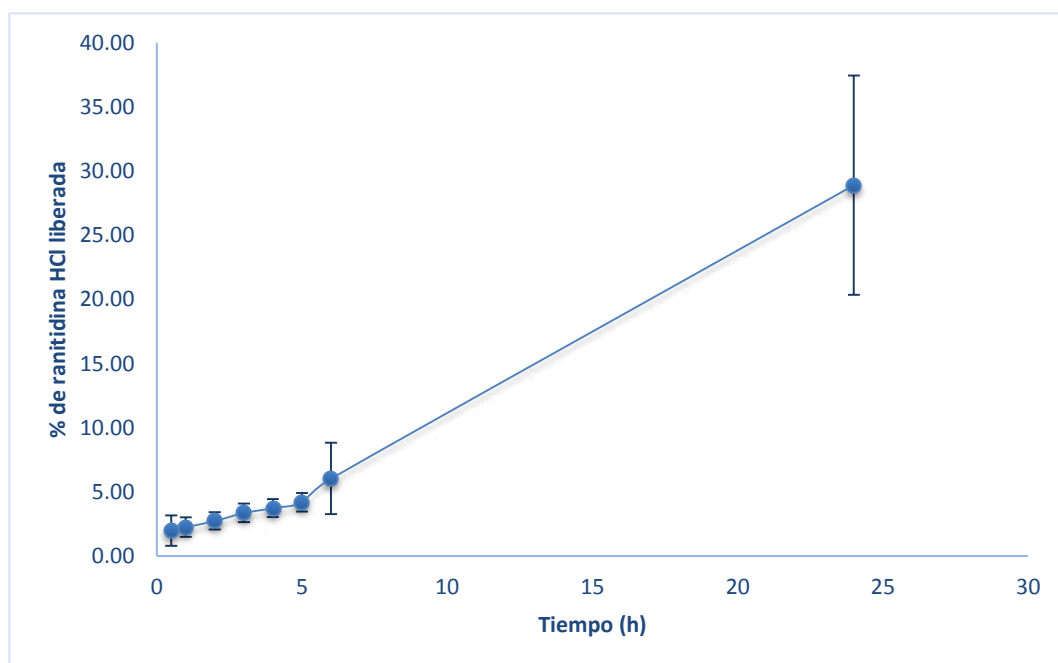
afectar la difusión de la ranitidina hacia el medio. Este cambio en la viscosidad de la ME puede deberse al efecto de la temperatura durante los estudios de liberación o permeación o bien a la difusión de alguno de los componentes en la formulación.

**Tabla 19.** Porcentaje de ranitidina HCl liberada a partir de la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58.

Tiempo (h)	% Liberado						Promedio	Desviación estándar
	M1	M2	M3	M4	M5	M6		
0.5	4.3142	2.0954	1.3524	1.3926	1.4546	1.3264	1.9893	1.1750
1	3.7486	2.3708	1.7324	1.9293	1.9913	1.7809	2.2589	0.7639
2	3.9832	2.9867	2.6285	2.1621	2.4872	2.2520	2.7500	0.6715
3	4.7026	3.5760	2.6722	3.1705	3.2343	2.8478	3.3672	0.7261
4	4.9881	3.9992	3.1138	3.5098	3.6912	3.1770	3.7465	0.6912
5	5.5519	4.4366	3.6830	3.9265	3.5346	4.0471	4.1966	0.7337
6	5.8711	4.8302	11.5628	5.4609	4.5365	4.0087	6.0450	2.7827
24	36.1736	21.9436	42.4242	27.5735	23.0961	22.1652	28.8960	8.5440

M= muestra

En la figura 31 se muestra la gráfica del porcentaje de ranitidina liberada respecto al tiempo como se puede observar a las 6 h sólo se había liberado prácticamente el 6%.



**Figura 31.** Porcentaje de ranitidina HCl liberada a partir de la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58, durante 24 h (n=6).

En seguida se muestran los resultados (tabla 20) de las cinéticas calculadas para la liberación.<sup>93</sup> De acuerdo con los resultados, aunque la correlación es superior a 0.99 para orden cero y para primer orden, para orden cero es más alta, pudiendo indicar que la liberación de la ranitidina HCl a partir de la ME con Brij<sup>®</sup> 58 sigue una cinética de orden cero, lo cual indica que la liberación es independiente de la concentración del fármaco.

**Tabla 20.** Resultados de la cinética de liberación para la ranitidina HCl a partir de la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 58.

<b>RESULTADOS</b>	<b>Orden Cero</b>		<b>Orden uno</b>		<b>Hixson- Crowell</b>		<b>Higuchi</b>	
	Tiempo (h)	%L	Tiempo (h)	ln %NL	Tiempo (h)	$\sqrt[3]{\%NL}$	Tiempo (h) <sup>1/2</sup>	%L
	0.5	1.99	0.5	4.59	0.5	1.26	0.5	1.99
	1	2.26	1	4.58	1	1.31	1	2.26
	2	2.75	2	4.58	2	1.40	2	2.75
	3	3.37	3	4.57	3	1.50	3	3.37
	4	3.75	4	4.57	4	1.55	4	3.75
	5	4.20	5	4.56	5	1.61	5	4.20
	6	6.05	6	4.54	6	1.82	6	6.05
	24	28.90	24	4.26	24	3.07	24	28.90
Pendiente	1.18		-0.01		-0.02		6.59	
r <sup>2</sup>	0.9926		0.9905		0.9912		0.9391	

## Microemulsión con Brij® 96

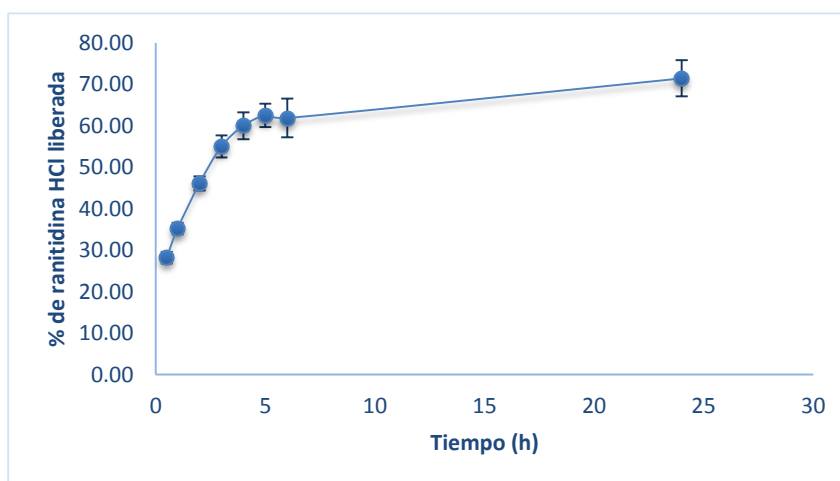
A continuación (Tabla 21) se presentan los resultados del porcentaje de ranitidina liberada a partir de la ME con Brij® 96, en este caso la liberación fue mayor con respecto a la ME con Brij® 58.

**Tabla 21.** Porcentaje de ranitidina HCl liberada a partir de la microemulsión con Brij® 96.

Tiempo (h)	% Liberado						Promedio (% Lib.)	Desviación estándar
	M1	M2	M3	M4	M5	M6		
0.5	28.7879	27.1421	30.4427	27.0252	26.5755	29.2736	28.2079	1.3944
1	35.3172	32.5921	37.1338	35.0024	34.9394	36.1356	35.1867	1.3866
2	48.0698	43.2853	48.3396	45.8934	45.6866	45.3088	46.0973	1.7155
3	57.2881	49.9315	57.9176	54.2753	56.4247	54.3562	55.0322	2.6584
4	63.9522	55.2466	63.2057	60.3548	60.7955	56.3348	59.9816	3.2322
5	63.1338	58.9878	67.7834	62.5043	62.6931	59.7613	62.4773	2.8339
6	65.0854	68.9615	64.0331	58.7990	59.6174	54.7249	61.8702	4.6702
24	77.3704	66.0117	77.0196	70.0317	70.6523	67.5406	71.4377	4.3508

M= muestra

En la figura 32 se muestran los resultados del porcentaje de ranitidina liberada a partir de la microemulsión con Brij® 96 a diferentes tiempos.



**Figura 32.** Porcentaje de ranitidina HCl liberada a partir de la microemulsión con Brij® 96, durante 24 h (n=6).

En la tabla 22 se observan los resultados de las cinéticas calculadas para la liberación de 1- 5 h, tiempo en el cual la liberación fue lineal.<sup>95</sup>

**Tabla 22.** Resultados de la cinética de liberación para la ranitidina HCl a partir de la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 96.

RESULTADOS	Orden Cero		Orden uno		Hixson- Crowell		Higuchi	
	Tiempo (h)	%L	Tiempo (h)	In %NL	Tiempo (h)	$\sqrt[3]{\%NL}$	Tiempo (h) <sup>1/2</sup>	%L
	0.5	28.21	0.5	4.27	0.5	4.16	0.5	28.21
	1	35.19	1	4.17	1	4.02	1	35.19
	2	46.10	2	3.99	2	3.78	2	46.10
	3	55.03	3	3.81	3	3.56	3	55.03
	4	59.98	4	3.69	4	3.42	4	59.98
	5	62.48	5	3.62	5	3.35		
Pendiente	7.73		-0.15		-0.18		25.20	
r <sup>2</sup>	0.9716		0.9860		0.9818		0.9987	

De acuerdo con los resultados la liberación se ajusta al modelo de Higuchi, lo cual significa que la liberación del fármaco esta dada por la difusión y depende de la raíz cuadrada del tiempo.<sup>95</sup>

Considerando los resultados mostrados para las microemulsiones con Brij<sup>®</sup> 58 y con Brij<sup>®</sup> 96, se puede decir lo siguiente: De acuerdo al perfil de liberación, la ME con Brij<sup>®</sup> 96 libera aproximadamente un 60% del fármaco, porcentaje que se alcanza desde las 6 horas, mostrando prácticamente una meseta a partir de este tiempo. El perfil para la ME con Brij<sup>®</sup> 58 es completamente distinto y aunque se tiene aproximadamente un 28 % de fármaco liberado a las 24 h, no se alcanza la cantidad máxima liberada. La diferencia en el comportamiento para estas dos microemulsiones puede atribuirse a la viscosidad, la cual es menor para la ME con Brij<sup>®</sup> 58. En cuanto a la permeación, con ambas microemulsiones la cantidad

permeada a las 24 horas es prácticamente la misma (aproximadamente 130-140  $\mu\text{g}$ ). Esto implicaría que a pesar de que la velocidad y cinética de liberación difiere para ambas microemulsiones, el paso a través de la piel es el paso limitante, controlando la cantidad de fármaco capaz de alcanzar el medio receptor.

## 6.4. Liposomas preparados con ranitidina HCl

### 6.4.1. Efecto del método para determinar tasa de encapsulamiento para los liposomas

Método de diálisis. Este método se probó primero con dos soluciones de ranitidina de concentración conocida para saber en qué tiempo la ranitidina sale de la bolsa de diálisis y con esto determinar en qué tiempo difundiría el fármaco libre de los liposomas, los resultados del porcentaje cuantificado se muestra en la tabla 23, donde se puede observar que a las 2 h había difundido el 100% del fármaco en ambas soluciones.

**Tabla 23.** Porcentaje de ranitidina HCl cuantificada por el método de diálisis a partir de una solución conocida en agua en diferentes tiempos.

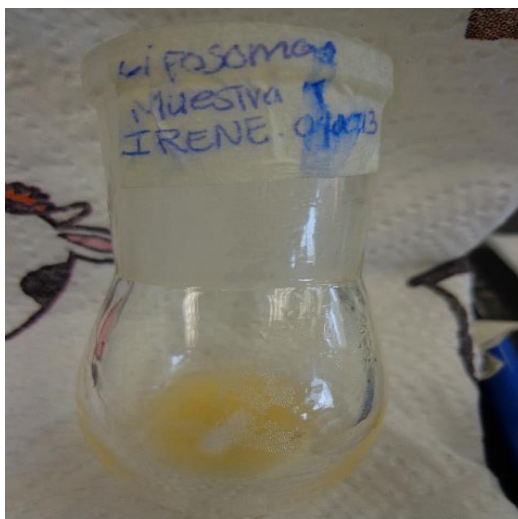
Tiempo	Solución 1 (2.5 mg/mL)	Solución 2 (12.5 mg/mL)
	% Cuantificado	
10 min	28.91%	32.03%
20 min	37.37%	49.59%
30 min	56.81%	66.63%
40 min	59.49%	68.58%
50 min	68.20%	80.79%
60 min	73.98%	84.33%
75 min	83.37%	86.80%
90 min	89.90%	91.60%
120 min	99.71%	102.03%

#### 6.4.2. Influencia del tamaño de vesícula de las formulaciones preparadas

En la tabla 24 se muestran las diferentes proporciones, condiciones, excipientes y tamaños de partícula obtenidos de las formulaciones preparadas. Para la primera formulación el tamaño de vesícula fue de 560 nm por lo que se realizaron liposomas con otras proporciones con la finalidad de tener tamaños más pequeños; sin utilizar la extrusión ya que no se quería perder fármaco encapsulado. Por lo tanto las formulaciones que se eligieron fueron la defosfatidilcolina (PC): Tween<sup>®</sup> 80 (84.5:15.5) y la de PC: Colesterol (40:10).

<b>Tabla 24.</b> Condiciones y resultados del tamaño de vesícula de los liposomas preparados con diferentes métodos.				
<b>Excipientes</b>	<b>Proporción</b>	<b>Método de preparación</b>	<b>Tamaño de vesícula</b>	<b>Referencia del método utilizado</b>
PC:Tween <sup>®</sup> 80	86:14	Hidratación de película.	560 nm	67
PC:Tween <sup>®</sup> 80	84.5:15.5	Hidratación de película.	<200 nm	68
PC:Tween <sup>®</sup> 80	84.5:15.5	Inyección de éter.	No se midió	25, 70
PC: Colesterol	15 µmol de lípidos, en relación molar 10:5	Hidratación de película.	566.2 nm	96
PC: Colesterol	60:40	Microencapsulación de vesícula.	>1000 nm	69
PC: colesterol	40:10	Hidratación de película.	<300 nm	97
PC: fosfatidilcolina				

Los liposomas preparados por inyección de éter cambiaron de color blanco a amarillo (probablemente a causa de la degradación de la ranitidina) durante las dos horas de evaporación del éter, tal como se observa en la figura 33 por lo cual este método se descartó y no se midió tamaño de vesícula.



**Figura 33.** Cambio de color de los liposomas a amarillo por el método de inyección de éter.

#### **6.4.3. Caracterización de liposomas**

##### **Resultados de encapsulamiento**

La formulación PC: Tween<sup>®</sup> 80 tuvo un porcentaje de encapsulamiento menor al 10%; mientras que la formulación de PC: Colesterol (40:10) tuvo un porcentaje de encapsulamiento de 26.17 %  $\pm$  4.35%. Por lo cual se eligió como la formulación a caracterizar (tamaño de vesícula y potencial zeta) para realizar los estudios de permeación y liberación *in vitro*.



## **Tamaño de vesícula**

El tamaño de vesícula se midió haciendo una dilución 1:3 con agua. Se utilizó como medio dispersante agua. El tamaño de vesícula de los liposomas sin ranitidina HCl (liposomas placebo) fue de 165.4 nm (pdi= 0.273). El promedio del tamaño de vesícula de los liposomas con ranitidina HCl fue de 231.2 nm  $\pm$  3.84 nm (pdi= <0.4).

Si se compara el tamaño de las muestras con el placebo se puede observar que éste es mayor en las muestras, debido a que al encapsular el fármaco las vesículas aumentan de tamaño.

El índice de polidispersión (pdi) mostró que los liposomas estaban constituidos por poblaciones homogéneas.

## **Potencial zeta**

El potencial zeta de los liposomas placebos, fue de -2.03 mV y para los liposomas con ranitidina HCl fue de -2.50 mV.

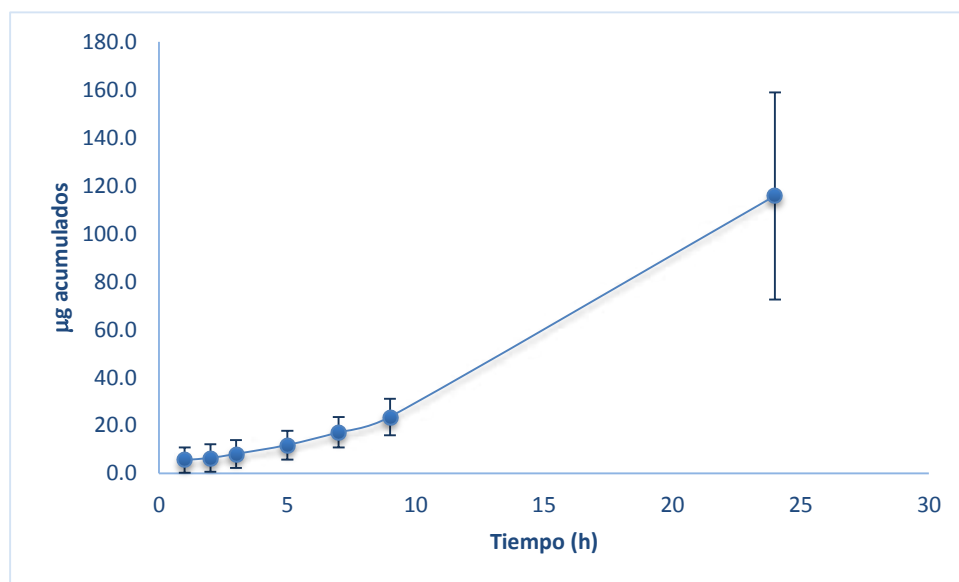
Un potencial zeta bajo podría deberse a que los componentes del sistema no tengan carga, <sup>65</sup> como es el caso del colesterol utilizado en la preparación de los liposomas. Esto puede implicar que el sistema sea físicamente inestable, en otras palabras no se producirá una máxima repulsión entre las partículas adyacentes y el sistema (en este caso los liposomas) pueden con el tiempo, coalescer o fusionarse.

#### 6.4.4. Permeación *in vitro* y extracción del fármaco en la piel.

En la tabla 25 se muestran los resultados de la permeación *in vitro* de ranitidina HCl formulada en los liposomas de ranitidina HCl y en la figura 34 la gráfica.

**Tabla 25.** Resultados de los  $\mu\text{g}$  acumulados de ranitidina permeados a partir de los liposomas.

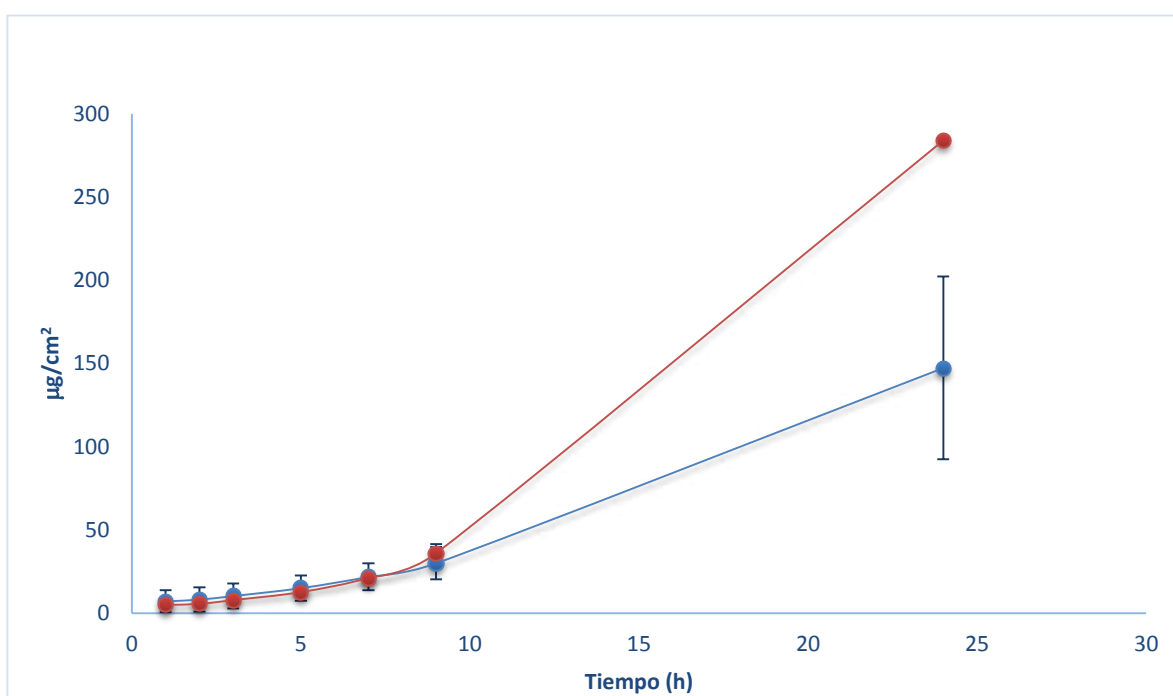
Tiempo (h)	$\mu\text{g}$ de ranitidina HCl acumulados								Promedio ( $\mu\text{g}$ )	% CV
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8		
1	2.111	3.003	5.442	4.177	2.747	18.302	4.475	4.482	5.592	93.878
2	2.156	3.538	7.406	4.998	3.052	19.965	5.013	5.254	6.423	88.786
3	3.293	4.926	10.553	6.913	4.561	21.613	6.101	6.932	8.112	72.350
5	5.999	10.334	17.139	10.835	7.440	24.165	7.772	10.869	11.819	50.989
7	11.802	16.943	25.652	16.179	12.092	27.631	10.470	16.341	17.139	37.071
9	16.751	22.637	35.350	26.212	18.445	33.047	13.883	22.069	23.549	32.311
24	111.665	94.820	151.941	205.879	99.509	86.036	72.668	103.434	115.744	37.293



**Figura 34.** Permeación *in vitro* de ranitidina HCl a partir de los liposomas (n=8).

En este caso el porcentaje permeado a las 24 h (% total) es de 8.98% (115.74  $\mu\text{g}$ ) de 1288.3  $\mu\text{g}$  que se colocaron inicialmente.

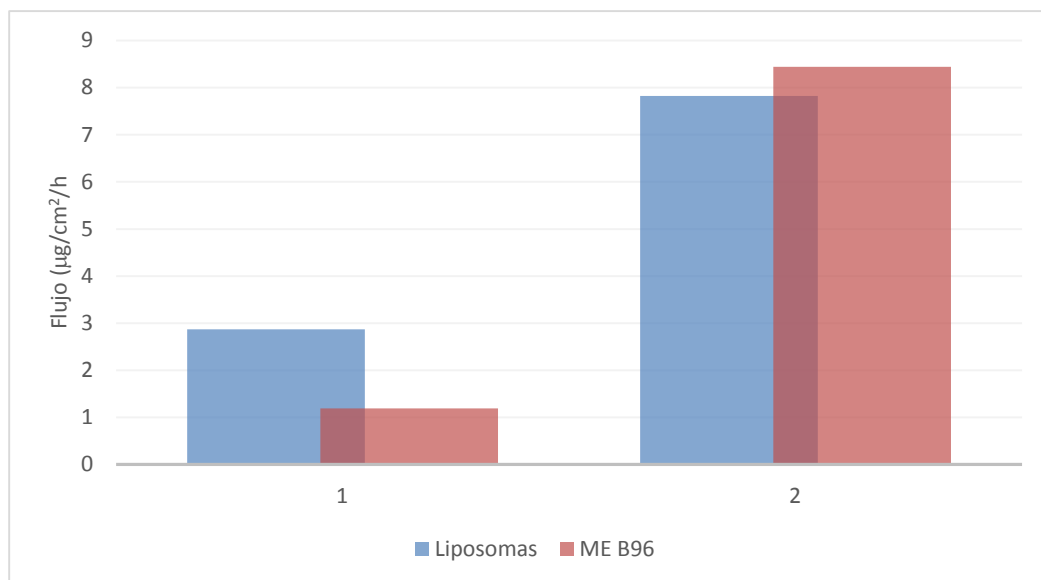
A continuación se presenta la gráfica (Figura 35) comparando la permeación *in vitro* de la ranitidina HCl a partir de los liposomas y de una solución acuosa de ranitidina HCl, como se puede observar la permeación es mayor cuando se aplica la solución.



**Figura 35.** Comparación de los resultados de la permeación *in vitro* de la ranitidina HCl formulada en una solución acuosa (n=2) y en liposomas (n=8) con ranitidina HCl.

Se realizó una prueba t de student ( $\alpha=0.05$ ) para saber si hay una diferencia de las medias de los flujos entre la ME con Brij<sup>®</sup> 96 y los liposomas (Figura 36), como se puede observar para el primer tiempo de 1-9 h hay una diferencia entre las medias (Tabla 26) lo cual indica que la cantidad de  $\mu\text{g}$  de ranitidina HCl permeados/ $\text{cm}^2/\text{h}$  a partir de las formulaciones es distinta. De acuerdo con los

resultados para el tiempo de 9-24 h, las medias no son diferentes, por lo tanto no hay diferencia entre los  $\mu\text{g}$  de ranitidina HCl permeados/ $\text{cm}^2/\text{h}$  a partir de la ME con Brij<sup>®</sup> 96 y los liposomas.



**Figura 36.** Comparación entre los flujos de la ranitidina HCl a partir de la microemulsión con Brij<sup>®</sup> 96 y a partir de los liposomas. 1: flujos de 1-9 h, 2: flujos de 9-24 h.

<b>Tabla 26.</b> Prueba t de student para saber si hay una diferencia entre las $\mu\text{g}$ de fármaco permeados/ $\text{cm}^2/\text{h}$ a partir de la ME con Brij <sup>®</sup> 96 y los liposomas.	
<b>Período evaluado</b>	<b>Resultado</b>
1- 9 h	t valor crítico= 2.14 t estadístico= 4.25
9- 24 h	t valor crítico= 2.14 t estadístico= -0.44

En la tabla 27 se muestran los resultados del flujo y constante de permeación (Kp) para cada muestra y en general de la permeación; caracterizando la curva primero de 1 h a 9 h y después de 9 h a 24 h. Con un tiempo de latencia de 0.0 h.

<b>Tabla 27. Resultados de los flujos y Kp para los liposomas con ranitidina HCl.</b>										
Tiempo (h)	$\mu\text{g permeados}/\text{cm}^2$								Unidades	
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8		
1	2.688	3.824	6.929	5.319	3.498	23.302	5.697	5.707		
2	2.746	4.504	9.430	6.363	3.886	25.420	6.383	6.689		
3	4.193	6.272	13.436	8.802	5.808	27.519	7.767	8.826		
5	7.638	13.158	21.822	13.795	9.473	30.768	9.895	13.839		
7	15.027	21.572	32.661	20.600	15.396	35.181	13.331	20.806		
9	21.328	28.822	45.009	33.375	23.484	42.076	17.677	28.099		
24	142.176	120.728	193.457	262.133	126.699	109.544	92.524	131.696		
Flujo 1 (1-9 h)	2.4169	3.2875	4.7815	3.3864	2.4892	2.2377	1.4794	2.8514		$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$
Kp 1	4.69E-04	6.38E-04	9.28E-04	6.57E-04	4.83E-04	4.34E-04	2.87E-04	5.53E-04		cm/h
Flujo 2 (9-24h)	8.0565	6.1271	9.8966	15.2505	6.8810	4.4979	4.9898	6.9065	$\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$	
Kp 2	1.56E-03	1.19E-03	1.92E-03	2.96E-03	1.34E-03	8.73E-04	9.68E-04	1.34E-03	cm/h	

En la tabla 28 se muestran los resultados de la extracción del fármaco remanente en la piel, como se puede observar, los  $\mu\text{g}$  de ranitidina que se retuvieron en el caso de los liposomas no varían mucho con respecto a los de las microemulsiones; sin embargo, si lo vemos en porcentaje se extrajo en promedio 5.704% de ranitidina lo cual sumando el porcentaje de ranitidina permeada (8.98%) se tiene que en total la ranitidina que podría penetrar la piel sería un 14.684%, es decir, 189.17  $\mu\text{g}$ . En el caso de los liposomas (147.37  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), para alcanzar la dosis terapéutica en un niño de 2.5 Kg en 24 h se necesitaría colocar los liposomas en un área de 18.65  $\text{cm}^2$ .

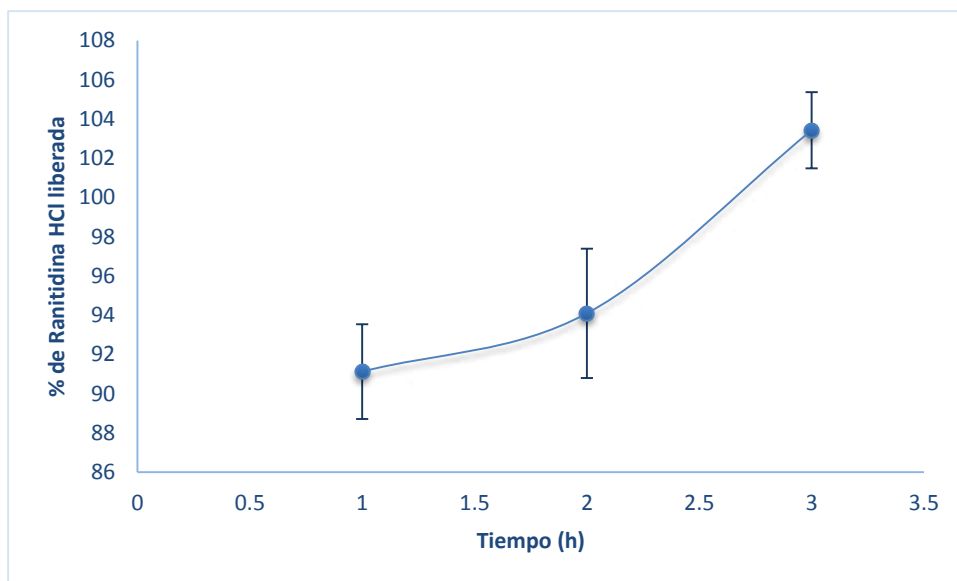
<b>Tabla 28.</b> Resultados de la extracción de ranitidina remanente en piel.			
<b>Muestra</b>	<b>µg de ranitidina extraída</b>	<b>% de ranitidina extraída</b>	<b>Promedio del % de ranitidina extraída</b>
1	72.7610	5.648	5.704%
2	91.8876	7.132	
3	82.3293	6.391	
4	25.1707	1.954	
5	86.0442	6.679	
6	69.3876	5.386	
7	74.5582	5.787	
8	85.8133	6.661	
Referencia 1	73.7450	5.724	6.624%
Referencia 2	91.7871	7.125	

#### 6.4.5. Liberación in vitro del fármaco a partir de los liposomas

A continuación se presentan los resultados en % liberado de ranitidina (Tabla 29), tal como se puede observar en muy poco tiempo (3 h) se liberó la ranitidina de los liposomas, en promedio se liberó el 101.7551%; en la figura 37 se muestra la gráfica del % de ranitidina liberada.

<b>Tabla 29.</b> Resultados de la liberación de ranitidina de los liposomas.								
<b>Tiempo (h)</b>	<b>% Liberado</b>						<b>Promedio (%)</b>	<b>Desviación estándar</b>
	M1	M2	M3	M4	M5	M6		
1	95.0385	91.9018	90.2311	88.5094	92.0893	88.9867	91.1261	2.4109
2	99.4196	93.2656	95.4476	89.6515	94.5611	92.2427	94.0980	3.2943
3	102.0790	105.7953	102.9654	105.6419	103.1871	100.9198	103.4314	1.9436

M= muestra



**Figura 37.** Porcentaje de ranitidina HCl liberada de los liposomas (n=6).

En el caso de los liposomas, aunque la liberación es muy rápida en relación a los resultados mostrados para las microemulsiones con Brij<sup>®</sup> 58 y Brij<sup>®</sup> 96, una vez más la cantidad total de ranitidina (para todos la cantidad permeada a este tiempo es de alrededor de 130-140  $\mu\text{g}$ ). Confirmando una vez más que a pesar de que el sistema module la liberación del fármaco, el paso limitante para el fármaco alcance el medio receptor es la barrera impuesta por la piel.

Es importante mencionar que se encontró sólo un reporte sobre la permeación transdérmica de ranitidina incluida en geles de Pluronic<sup>®</sup> F-127 y empleando iontoforesis como promotor físico. En este trabajo, los autores encuentran flujos mucho menores a los calculados en la presente tesis, tanto por difusión pasiva (p. ej., 0.005474  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  para geles con 20 % de Pluronic F-127), como aplicando iontoforesis (0.3333  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Se puede decir entonces que los resultados encontrados con los sistemas preparados son alentadores y permiten pensar en la factibilidad de administrar ranitidina por vía transdérmica.<sup>58</sup>

## 7. CONCLUSIONES

- Se validaron los métodos analíticos requeridos para la cuantificación de ranitidina HCl durante los estudios de liberación y permeación *in vitro* a partir de microemulsiones y liposomas.
- Se consiguió la formulación de dos tipos de sistemas submicrónicos para la administración transdérmica de ranitidina HCl: Microemulsiones y liposomas.
- La microemulsión con las mejores características físicas mostró un tamaño de glóbulo de  $3.899 \text{ nm} \pm 0.710 \text{ nm}$ , con un contenido de fármaco de 1.5 g/100 g de ME y una viscosidad de 1.97 poise.
- Los liposomas con las mejores características físicas mostraron un tamaño de vesícula de  $231.2 \text{ nm} \pm 3.84 \text{ nm}$ , con un contenido de fármaco de 5.15 mg/mL y un potencial zeta de -2.50 mV.
- Tanto los liposomas como las microemulsiones retardan el paso de la ranitidina a través de la piel, en relación a una solución del fármaco, lo cual puede contribuir a prolongar el efecto del mismo, una vez que se establece un flujo constante de fármaco.
- Se estima que un sistema con un área de  $18.65 \text{ cm}^2$  (liposomas),  $19.55 \text{ cm}^2$  (ME con Brij<sup>®</sup> 58),  $20.83 \text{ cm}^2$  (ME con Brij<sup>®</sup> 96) sería suficiente para alcanzar concentraciones terapéuticas en un lapso de 24 h.
- Los tres sistemas evaluados (microemulsiones con Brij<sup>®</sup> 58 y con Brij 96 y liposomas) presentan una cantidad total permeada, así como flujos y coeficientes de permeabilidad similares, lo que indica que aunque cada uno de los sistemas presenta cinéticas de liberación diferentes, el paso limitante en la permeación está impuesto por la barrera de permeabilidad de la piel.



## 8. PERSPECTIVAS

- Estudiar el efecto de distintos promotores de absorción en la permeación transdérmica de ranitidina, que mejoren su paso a través de la piel.
- Evaluar el grado de irritación de las formulaciones preparadas.
- Proponer sistemas como los desarrollados (microemulsiones y liposomas) para mejorar la absorción oral de ranitidina, buscando reducir la variabilidad en la biodisponibilidad.
- Probar con otro tipo de tensoactivos, para ver si se mejora la permeación de ranitidina.
- Realizar pruebas de permeación *in vitro*, aumentando el área expuesta.
- Realizar las pruebas de permeación *in vitro*, con los liposomas que contienen fosfatidilcolina y Tween<sup>®</sup> 80.

## 9. REFERENCIAS

1. Sousa Silva C. Skin structure and drug permeation (tesis doctoral). Portugal: Facultad de farmacia de la Universidad de Coimbra; 2008.
2. Crouch J. Principios de anatomía humana. 1ª Ed. México: Limusa; 1984.
3. Stanley W, Ashworth C, Lossom W. Anatomía y fisiología humana. 4ª Ed. México: Interamericana; 1987.
4. Allevato M. Sistemas terapéuticos transdérmicos. Act Terap Dermatol. 2007; 30: 154-166.
5. Wolf K. Dermatología en medicina general. 7a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
6. Haftek M. Queratización epidérmica. Dermatología. 2011: 1-13.
7. Palastanga N, Field D, Soames R. Anatomía y movimiento humano, estructura y funcionamiento. Barcelona: Paidotribo; 2000.
8. Navarrete G. Histología de la piel. Rev Fac Med UNAM. 2003; 46 (4): 130-133.
9. Rassner G. Manual y atlas de dermatología. 5ª Ed. España: Harcourt; 1999.
10. Allevato M. Sistemas terapéuticos transdérmicos. Act Terap Dermatol. 2007; 30: 154-166.
11. Sanya K, Nirajan S, Irchhaiya R, Kumar N, Akhtar A. A novel transdermal drug delivery system. Int R J Pharm. 2012; 3 (8): 39-44.
12. Neely B, Madihally S, Robinson R, Gasem K. Nonlinear quantitative structure-property relationship modeling of skin permeation coefficient. J Pham Sci. 2009; 98 (11): 4069-4084.
13. Betlloch I, Silvestre J. Aspectos cutáneos de los sistemas terapéuticos transdérmicos. Piel. 2002; 17 (1): 18-26.
14. Chang H, Wu S, Wang Y, Wang H. Quantification of porcine skin permeability in transdermal diffusion with a numerical model. J Tai Ins Che Eng. 2010; 41: 136-142.
15. Ganem A. ¿Qué sabe Ud. Acerca de... la vía de administración transdérmica?. Rev Mex Cien Farm. 2011; 42 (1): 65-68.

16. Kumar H. Transdermal drug delivery system: An overview. *Int J Res Pharm Sci.* 2012; 3 (3): 451-457.
17. Prasanthi D, Lakshmi P. Vesicles-mechanism of transdermal permeation: A review. *Asian J Pharm Clin Res.* 2012; 5 (1): 18-25.
18. Trommer H, Neubert R. Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration. *Skin Pharmacol Physiol.* 2006; 19: 106-121.
19. Nino M, Calabrò G, Santoianni P. Topical delivery of active principles: The field of dermatological. [Artículo en internet]. eScholarship, 2010 [acceso 07 de febrero de 2014]. Disponible en: <http://escholarship.org/uc/item/9sh763nc>
20. Zhang S, Qiu Y, Gao Y. Enhanced delivery of hydrophilic peptides in vitro by transdermal microneedle pretreatment. *Act Pharm Sin B.* 2014; 4 (1): 100-104.
21. Bolzinger M, Briançon S, Pelletier J, Chevalier Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Curr Opin in Colloid In.* 2012; 17: 156-165.
22. Lane M, Skin penetration enhancers. *Int J Pharm.* 2013; 447: 12-21.
23. Palma S, Montefuscoli A, Krieger A, Allemandi D. Promotores de la permeación transdermal. *Farmacotecnia.* 2007; 49: 16-22.
24. Allen T. Liposomal drug formulation, rationale for development and what we can expect for the future. *Drugs.* 1998; 56 (5): 747-756.
25. Dua J, Rana A, Bhandari A. Liposome: Methods of preparation and applications. *Int J Pharm Stu Res.* 2012; III (II): 14-20.
26. Elsayed M, Abdallah O, Naggar V, Khalafallah N. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. *Int J Pharm.* 2007; 332: 1-16.
27. Sharma A, Sharma U. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *Int J Pharm.* 1997; 154: 123-140.
28. Talsma H, Jousma H, Nicolay K, Crommelin D. Multilamellar or multivesicular vesicles?. *Int J Pharm.* 1987; 37: 171-173.
29. El Maghraby G, Barry B, Williams A. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci.* 2008; 34: 203-222.
30. Vermuri S, Rhodes C. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv.* 1995; 70: 95-111.

31. Zhao J, Ji L, Wang H, Chen Z, Liu Y, Feng N. Microemulsion-based novel transdermal delivery system of tetramethylpyrazine: preparation and evaluation in vitro and in vivo. *Int J Nano*. 2011; 6: 1611-1619.
32. Brime Beteta B. Desarrollo y caracterización farmacotécnica y farmacológica de nuevas formulaciones parenterales de anfotericina B [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2002.
33. Ma J, Wu B. Effect of surfactants on preparation of nanoscale  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  powders by oil-in-water microemulsion. *Adv Powder Technol*. 2013; 24: 354-358.
34. Djekic L, Primorac M. The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsion based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. *Int J Pharm*; 352: 231-239.
35. Alexander A, Dwivedi S, Giri T, Saraf S, Saraf S, Krishna D. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J Control Rel*. 2012; 164: 26-40.
36. Lawrence M, Rees G. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Del Rev*. 2012; 64: 175-193.
37. PermeGear. Diffusion testing fundamentals. [Monografía en internet]. Estados Unidos; 2012 [acceso el 27 de Febrero de 2014]. Disponible en: <http://www.permegear.com/primer.pdf>
38. Colin R. Gastroesophageal reflux disease (GERD) and congenital esophageal obstructive lesions, pediatric. Elsevier. 2004.
39. Molkhou P. Reflujo gastroesofágico en el niño. *Pediatría*. 2005: 2-11.
40. Secretaría de Salud. Diagnóstico y tratamiento del reflujo gastroesofágico en pediatría en el primer nivel de atención. México; 2008. [Acceso el 03 de marzo de 2014]. Disponible en: [www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html](http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html)
41. Rudolph C, Mazur L, Liptak G, Baker R, Boyle J, Colletti R, Gerson W, Werlin S. Guidelines for evaluation and treatment of gastroesophageal reflux in infants and children: recommendations of north American Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition. *J Pediatr Gastr Nutr*. [Artículo en internet]. 2001 [Acceso el 13 de febrero de 2014], 32: S1-S31. Disponible en:

[http://journals.lww.com/jpgn/Abstract/2001/00002/Guidelines\\_for\\_Evaluation\\_and\\_Treatment\\_of.1.aspx](http://journals.lww.com/jpgn/Abstract/2001/00002/Guidelines_for_Evaluation_and_Treatment_of.1.aspx)

42. Campanozzi A, Boccia G, Pensabene L, Panetta F, Marseglia A, Strisciuglio P, Barbera C, Magazzù G, Pettoello M, Staiano A. Prevalence and nature history of gastroesophageal reflux: Pediatric prospective survey. *J Ame Acad Ped.* 2009; 123 (3): 779-783.
43. Jung C, Bellaiche M. Reflujo gastroesofágico en el niño. *Pediatría.* 2012; 47 (4): 1-9.
44. Pérez J, Martínez C, Tolín M, Álvarez G. Diagnóstico y tratamiento del reflujo gastroesofágico. *An Pediatr Conti.* 2013 [Acceso el 13 de febrero de 2014]; 11: 1-10. Disponible en: <http://www.elsevier.pt/es/revistas/-/artigo/diagnostico-tratamiento-del-reflujo-gastroesofagico-90185723>
45. Targa C, Carvalho E, Sdepanian V, Batista M, Vieira M, Rodrigues L. Gastroesophageal reflux disease: exaggerations, evidende and clinical practice. *J pediatr.* 2013; 30 (20): 1-14.
46. Marzo M, Carrillo R, Mascort J, Alonso P, Mearin F, Ponce J, Ferrándiz J, Fernández M, Martínez G, Sáez M, Bonfill X, Piqué J. Manejo del paciente con ERGE. Guía práctica clínica. *Gastroenterol Hepatol.* 2009; 32 (6): 431-464.
47. Beltrán B, Catalán L, Calderón J, Blank C, Blerzowlnski A, Reynoso D. El reflujo gastroesofágico en los niños. Fisiopatología, clínica, diagnóstico y tratamiento. *Rev Mex Pedia.* 1999; 66 (4): 161-168.
48. Velasco A. *Farmacología fundamental.* 1ª Ed. España: McGraw Hill; 2003, p. 551-555.
49. Dove S, Elz S, Seifert R, Buschauer A. Structure-activity of histamine H<sub>2</sub> receptor ligands. *Med Che.* 2004; 4: 941-954.
50. Kortejärvi H, Yliperttula M, Dressman J, Junginber H, Midha K. Biowaiver Monographs for immediate reléase solid oral dosage forms: Ranitidine hydrochloride. *J Pharm Sci.* 2005; 94 (8): 1617-1625.
51. Agatonovic S, Rades T, Wu V, Saville D, Tucker I. Determination of polymorphic forms of ranitidine-HCl by DRIFTS and XRPD. *J Pharm Biomed Anal.* 2001; 25: 741-750.

52. Chieng N, Rades T, Saville D. Formation and physical stability of the amorphous phase of ranitidine hydrochloride polymorphs prepared by cryo-milling. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; 68: 771-780.
53. Mirmehrabi M, Rohani S, Murthy K, Radatus B. Solubility, dissolution rate and phase transition studies of ranitidine hydrochloride tautomeric forms. *Int J Pharm.* 2004; 282: 73-85.
54. Moffat A, Osselton D, Widdop B. *Clarke's analysis of drug and poisons in pharmaceuticals, body, fluids and post mortem material.* 3<sup>a</sup> Ed. Estados Unidos: Pharmaceutical press; 2004.
55. U. S. Food and Drug Administration (FDA). Exención de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo para formas posológicas orales sólidas de liberación inmediata en base a un sistema de clasificación de biofarmacéuticas. 2008 [Acceso el 02 de marzo de 2014]. Disponible en: <http://www.fisterra.com/herramientas/recursos/vancouver/#electronico>
56. Ichikawa T, Hotta K, Ishihara K. Second-Generation histamine H<sub>2</sub>-receptor antagonists with gastric mucosal defensive properties. *J Med Chem.* 2009; 9: 581-589.
57. Velázquez L. *Farmacología básica y clínica.* 18<sup>a</sup> Ed. Buenos Aires: panamericana; 2004, p. 570-574.
58. Djabri A, Guy R, Delgado B. Transdermal iontophoresis of ranitidine: An opportunity in paediatric drug therapy. *Int J Pharm.* 2012; 435: 27-32.
59. Beltrán B, Catalán L, Menéndez J, Calderón J, Blank C, Bierzowinski A, Reynoso D. El reflujo gastroesofágico en los niños. *Fisiopatología, clínica, diagnóstico y tratamiento.* *Rev Mex de pediatría.* 1999; 66 (4): pp. 161-168.
60. Moffat A, Osselton M, Widdop B. *Clarke's analysis of drug and poisons in pharmaceuticals, body, fluids and post mortem material.* 3<sup>a</sup> Ed. USA: Pharmaceutical Press; 2004.
61. The United States Pharmacopeial. *United States Pharmacopeia.* Ed. 24; 1999. P. 2231-2232.

62. U. S Food and Drug Administration (FDA). Guideline for industry, Q2A text on validation of analytical procedures. 1995 [Acceso el 25 de enero de 2013]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm073381.pdf>
63. U. S Food and Drug Administration (FDA). Guidance for industry, Q2B Validation of analytical procedures: Methodology. 1996 [Acceso el 25 de enero de 2013]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073384.pdf>
64. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México. Métodos analíticos: guía de validación; 2002. Pp. 122.
65. Vicentini F, Vaz M, Fomseca Y, Bentley V, Fonseca M. Characterization and stability study of a water-in-oil microemulsion incorporating quercetin. *Drug Dev Ind Pharm.* 2011; 37 (1): 47-55.
66. Delgado A, Minguillón C, Joglar J. Introducción a la química terapéutica. 1ª Ed. Barcelona: PPU; 2000.
67. Nava G, Piñón E, Mendoza L, Mendoza N, Quintanar D, Ganem A. Formulation and in vitro, ex vivo evaluation of elastic liposomes for transdermal delivery of ketorolac tromethamine. *Pharmaceutics.* 2011; 3: 954-970.
68. Elsayed M, Abdallah O, Naggar V, Khalafallah N Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery. *Int J Pharm.* 2006; 322: 60-66.
69. Makhmalzadeh B, Azh Z, Azarpanah A. Preparation and evaluation of mafenide acetate liposomal formulation as eschar delivery system. *Int J Drug Dev Res.* 2011; 3 (4): 129-140.
70. Meure L, Foster N, Dehghani F. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review. *Pharm Sci Tech.* 2008; 9 (3): 798- 809.
71. Touitou E, Dayan N, Bergelson L, Godin B, Eliaz M. Ethosomes novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J Control Rel.* 2000; 3(65): 403-418.
72. Tavano L, Muzzalupo R, Cassano R, Trombino S, Ferrarelli T, Picci N. New sucrose cocate based vesicles: Preparation, characterization and skin permeation studies. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010; 75 (1): 319-322.

73. Jouyban A. Handbook of solubility data for pharmaceuticals. 1<sup>a</sup> Ed. USA: CRC Press; 2010.
74. Sánchez E, Jung H, Yépez L, Hernández V. Relevancia del polimorfismo en el área farmacéutica. Rev Mex Ciencias Farm. 2007; 38 (2): 57-76.
75. Gutiérrez V, Torrado G, García J. Desarrollo de una formulación estable de ranitidina HCl forma II. [Acceso el 07 de febrero de 2013] .Disponible en: [http://ragalab.net/images/articulo\\_ranitidina.pdf](http://ragalab.net/images/articulo_ranitidina.pdf)
76. Khanna, Jag Mohan; Kumar, Naresh; Khera, Brij; Khanna Mahavir Singh. Procedimiento para la preparación de la forma 1 del clorhidrato de ranitidina. España; 2 122 387. (C07D 307/52; A61K 31/34), 16 Dic 1998. 0 694 540, 31 Ene 1996. 8 p.
77. Noble J. Quantification of protein concentration using UV absorbance and coomassie dyes. Methods Enzymol. 2014; 536: 17-26.
78. Cienytech. UV cutoffs para disolventes comunes. [Acceso el 25 Jul 2013]. Disponible en: <http://www.cienytech.com/tablas/tabla-UV-Cutoffs-disolventes-comunes.pdf>
79. García P. Liberación transdérmica de piroxicam empleando microagujas. Tesis (Maestría en Ciencias Químicas). México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México, FES Cuautitlán, 2012.
80. Kogan A, Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. Adv Colloid Interface Sci. 2006; 123-126: 369-385.
81. Kumar G, Rajeshwarrao P. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery-an overview. Act Pharm Sin B. 2011; 1(4): 208-219.
82. Salud.es. Ranitidina normon 50 mg. [Acceso el 12 Feb 2013] Disponible en: <http://www.salud.es/medicamento/ranitidina-normon-50-mg-5-ampollas-5-ml>
83. Jiao J. Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery. Adv Drug Deliver Rev. 2008; 60: 1663-1673.
84. Vehabovic M, Hadzovic S, Stambolic F, Hadzic A, Vranjes E, Haracic E. Stability of ranitidine in injectable solutions. Int J Pharm. 2003; 256: 109-115.
85. Gallarate M, Chirio D, Trotta M, Carlotti M. Deformable liposomes as topical formulation containing a-tocopherol. J Dis Sci Tech. 2006; 27: 703-713.



86. Allen L, Popovich G, Ansel H. Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. 8<sup>a</sup> Ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
87. Lachman L, Lieberman H. The theory and practice of industrial pharmacy. 3<sup>a</sup> Ed. USA: Lea & Febiger; 1986.
88. Abraham Aserin, Achmaryahu Ezrahi, Nissim Garti. Water in oil microemulsion. Jerusalem, WO/1995/033807. 14 Dic 1995. PCT/GB1995/001251, 31 May 1995.
89. Kantarc G, Özgüney I, Karasulu Y, Arzik S, Güneri T. Comparison of different water/oil microemulsions containing diclofenac sodium: preparation, characterization, release rate and skin irritation studies. *Pharm Sci Tech*. 2007; 8 (4): E1-E7.
90. Taha M, Al-Ghazawi M, Abu-Amara H, Khalil E. Development of quantitative structure-property relationship models for pseudoternary microemulsions formulated with nonionic surfactants and cosurfactants: application of data mining and molecular modeling. *Eur J Pharm Sci*. 2002; 15: 461-478.
91. Kale N, Allen L. Studies on microemulsions using Brij 96 as surfactant and glycerin, ethylene glycol and propylene glycol as cosurfactant. *Int J Pharm*. 1989; 57: 87-93.
92. Molt R. *Mecánica de fluidos*. 6<sup>a</sup> Ed. México: Pearson educación; 2006.
93. Gómez M, Danglot C, Aceves M. Clasificación de los niños recién nacidos. *Rev Mex Ped*. 2012; 79 (1): 32-39.
94. Trejo S, Uriarte V. *Fundamentos de farmacología*. México: Trillas; 2010.
95. Andreetta H. Fármacos de acción prolongada: mecanismos de liberación. Usos de distintos modelos. *Lat Am J Pharm*. 2003; 2 (4): 355-364.
96. Oh Y, Yonug M, Shin J, Woon T, Yun M, Joon S, Sook S, Jung W, Kim J, Choi H. Skin permeation of retinol in Tween 20-based deformable liposomes: in vitro evaluation in human skin and keratinocyte models. *J Pharm Pharmacol*. 2006; 58: 161-166.
97. Fang J, Hwang T, Huang Y, Fang C. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol. *Int J Pharm*. 2006; 310: 131-138.