



CASA ABIERTA AL TIEMPO  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN  
DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS

**“PENETRACIÓN TRANSDÉRMICA DE METOTREXATO EMPLEANDO  
MICROAGUJAS.”**

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

Q.F.B ERIKA ALINNE SANTANDER GARCÍA  
MATRÍCULA 210384652

COMITÉ TUTORAL

TUTORA: DRA. ADRIANA GANEM RONDERO  
ASESOR: DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS  
ASESOR: M.C. MARÍA GUADALUPE NAVA ARZALUZ

FEBRERO, 2013

PENETRACIÓN TRANSDÉRMICA DE METOTREXATO EMPLEANDO


MICROAGUJAS

**COMITÉ TUTORAL:**

TUTORA

  
DRA. ADRIANA GANEM RONDERO

ASESORES

 *María Melgoza C.*

DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS

  
M.C. MARÍA GUADALUPE NAVA ARZALUZ

ALUMNA


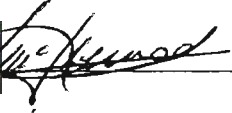
  
ERIKA ALINNE SANTANDER GARCÍA

MATRICULA 210384652


PENETRACIÓN TRANSDÉRMICA DE METOTREXATO EMPLEANDO  
MICROAGUJAS

**JURADO:**


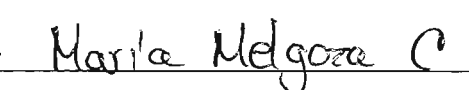
**PRESIDENTE**

   
\_\_\_\_\_  
DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

**VOCAL**

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ELIZABETH PIÑÓN SEGUNDO

**SECRETARIO**

   
\_\_\_\_\_  
DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la **Universidad Autónoma Metropolitana** por haberme permitido concluir mis estudios de maestría y por proporcionarme todos los medios, para que mi estancia en esta casa de estudios fuera lo más provechosa y agradable.

Este proyecto se realizó en la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** en el Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica L-323, con el apoyo de CONACyT (Ref.: 129320) Y PAPIIT (Ref.: IN209709).

Se agradece de manera personal a CONACyT por haberme proporcionado beca para sustentar los estudios de maestría (Ref: 250681)

Le agradezco a la Doctora Adriana Ganem por permitir trabajar en su laboratorio y por su disponibilidad para llevar a cabo el proyecto pero sobre todo por el apoyo y confianza que me ha brindado.

A la Doctora Luz María Melgoza por la paciencia, disponibilidad para resolver dudas y el apoyo para concluir este trabajo.

A la Maestra Guadalupe Nava por la gran ayuda que me ha brindado para realizar y terminar este trabajo transmitiéndome sus conocimientos.

A mis sinodales por dedicar tiempo para la revisión de este trabajo y dar sugerencias y comentarios, los cuales fueron de gran importancia para que este trabajo mejorara.

## DEDICATORIAS

*Este trabajo está dedicado a la personita que me acompaño en mis clases, desvelos y en el viaje que recorría hacia la escuela. Mi hija ALINNE que durante nueve meses estuvo de testigo del esfuerzo y dedicación que tuve en mis estudios. Eres el motor de mi vida TE AMO.*

*A mi esposo JULIO CESAR por estar conmigo apoyándome a seguir creciendo profesionalmente y darme una familia por quien esforzarme todos los días TE AMO.*

*A mis padres SOCO Y ANDRES que por su apoyo y palabras de aliento, lo que he logrado hasta hoy en gran parte es por ustedes que son y serán siempre el ejemplo de vida, fuerza y amor. Les agradezco infinitamente que estén cerca de mí LOS AMO.*

*A mis hermanos ILE, FABY, FER Y GER por su amor y apoyo incondicional, por estar cerca en momentos importante. Gracias por contar con ustedes, LOS AMO.*

## RESUMEN

El metotrexato (MTX) es un fármaco con actividad antineoplásica que provoca efectos hepatotóxicos por el uso sistémico. Para reducir tal efecto, se ha buscado administrarlo por vías alternas, entre ellas la transdérmica, no obstante, el fármaco presenta diversos inconvenientes como su alta hidrofilia, elevado peso molecular y que se encuentra ionizado a pH fisiológico, por lo que su capacidad de difusión a través de la piel se ve limitada. Hoy en día el uso de promotores de absorción transdérmicos se ha enfocado a la combinación de estos mismos; no sólo para favorecer el paso de las moléculas a través de la piel, sino también para proteger al principio activo de la degradación como es el caso de los liposomas. En los últimos años las microagujas han demostrado tener un alto impacto en la permeación de diferentes compuestos e incluso partículas a través de la piel de forma mínimamente invasiva; mientras que los liposomas han sido empleados como modelos de membrana y vehículos de una gran diversidad de moléculas, con propósitos bioquímicos, biotecnológicos y biomédicos. Cuando se combinan ambas tecnologías se obtienen mejores resultados como: una liberación controlada, dispositivos prácticos para una fácil administración, reducción de dosis y promoción de la penetración en piel.

El objetivo de este trabajo fue formular liposomas flexibles conteniendo MTX y estudiar su penetración a través de piel *in vitro*, comparando su transporte en piel intacta y piel pretratada con microagujas metálicas.

Los liposomas con MTX preparados mediante el método de hidratación para producir MLV (Vesículas multilaminares) modificadas (Katsumi, 1987), permitieron obtener un porcentaje de encapsulamiento mayor a lo reportado en la literatura. Los resultados mostraron que la inclusión del MTX en liposomas elásticos, permite que tanto la cantidad permeada como la retenida en piel, aumenten de manera importante, y si se pretratar la piel con las microagujas se produce un efecto mayor. Esto último puede ser indicativo de un efecto sinérgico entre la inclusión del fármaco en un acarreador afín a la piel y la formación de canales con las microagujas.

---

## ÍNDICE GENERAL

Índice de Tablas.....	i
Índice de Figuras.....	ii
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico	
2.1. Metotrexato.....	2
2.1.1. Farmacocinética.....	5
2.1.2. Reacciones adversas y toxicidad.....	8
2.1.3. Metotrexato por vía transdérmica.....	9
2.2. Piel	
2.2.1. Generalidades.....	12
2.2.2. Estructura de la piel.....	13
2.2.3. Función del estrato córneo.....	19
2.2.4. Penetración cutánea.....	20
2.3. Aplicación transdérmica de fármacos.....	22
2.3.1. Fundamento de la absorción transdérmica.....	24
2.3.2. Mecanismos de la absorción.....	25
2.3.3. Factores que afectan la permeabilidad transdérmica.....	31
2.4. Promotores de administración transdérmica.....	35
2.4.1. Acarreadores.....	37
2.4.1.1. Liposomas.....	37
2.4.1.2. Transfersomas.....	45
2.4.2. Microagujas.....	48

3. Hipótesis.....	54
4. Objetivos.....	54
5. Materiales.....	54
6. Métodos.....	56
7. Resultados y discusión.....	67
8. Conclusiones.....	85
9. Referencias.....	86
10. Anexos.....	93



---

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de Absorción UV del MXT.....	3
Tabla 2. Regímenes de dosificación para algunas enfermedades.....	6
Tabla 3. Características deseables del fármaco para la liberación transdérmica.....	23
Tabla 4. Capacidad de penetración transdérmica.....	24
Tabla 5. Clasificación y nomenclatura de liposomas en función del tamaño y laminalidad.....	40
Tabla 6. Clasificación y nomenclatura de liposomas en función del método de preparación.....	41
Tabla 7. Resultados de la validación para cuantificar MTX encapsulado.....	70
Tabla 8. Resultados de la validación para cuantificar MTX en una matriz biológica	71
Tabla 9. Resultados de la validación del método todo para cuantificar MTX extraído en piel. al final de los estudios de permeación.....	73
Tabla 10 Resultados de la validación del método para determinar MTX en SAF.....	74
Tabla 11. Métodos de preparación probados para elaborar liposomas de MTX.....	75
Tabla 12 Caracterización de los liposomas elaborados por el método de hidratación modificado .....	77
Tabla 13. Porcentaje de MTX permeado después de 24 h para los cuatro tratamientos .....	79
Tabla 14. Parámetros de la cinética de permeación.....	82

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de metotrexato.....	2
Figura 2. Sitios de acción del metotrexato y sus poliglumatos.....	4
Figura 3. Partes que constituye la piel .....	13
Figura 4. Diagrama de la epidermis .....	14
Figura 5. Estructura de la dermis. ....	16
Figura 6. Representación esquemática de los procesos de liberación del fármaco.....	25
Figura 7. Representación de las principales vías de absorción percutánea.....	27
Figura 8. Algunos métodos para la optimización de la penetración transdermal.....	36
Figura 9. Esquema de liposomas.....	38
Figura 10. Mecanismo de Interacción .....	45
Figura 11. Esquema de liposomas elásticos (transfersomas).....	46
Figura.12. Gradiente de Hidratación y movimiento impulsado por deformabilidad de Transfersomas a través de pequeños poros.....	47
Figura 13. Los posibles mecanismos de acción de los liposomas .....	48
Figura 14. Esquema de administración de fármacos utilizando diferentes diseños de microagujas.....	53
Figura 15. Direcciones utilizadas con el rodillo de microagujas para obtener las microperforaciones en la piel.....	65
Figura 16. Celdas verticales tipo Franz empleadas en los estudios de permeación.....	65
Figura 17. Espectros de absorción de MTX.....	67
Figura 18. Cromatogramas de MTX, Fase Móvil y diluyente.....	68
Figura 19. Cromatograma de MXT en Placa de C18 a la longitud de onda de 302 nm.....	69
Figura20. Recta de Calibración de MTX empleada para determinar la tasa de encapsulación en los liposomas.....	70
Figura 21. Curva de calibración de MXT en SAF pH 7.4 en contacto con piel.....	71
Figura 22. Curva de calibración de MXT en SAF: Etanol (1:1). ....	72
Figura 23. Curva de calibración de MTX en SAF pH 7.4 empleada para los estudios de liberación a través de una membrana de diálisis.....	73
Figura 24. Curvas de liberación de MXT en solución y con liposomas (n=6).....	78
Figura 25. Cantidad de MTX permeado a través de piel de oreja de cerdo in vitro, bajo diferentes condiciones: (n=5).....	79
Figura 26. Liberación de MTX graficando cantidad permeada vs tiempo.....	81
Figura 27. Cantidad de MTX retenido en piel después de 24 h permeación.....	83

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Antiguamente se pensaba, que la vía transdérmica no era factible como ruta de administración de fármacos. Sin embargo, hoy día se sabe que es una buena alternativa frente a las rutas de administración convencionales y que constituye un importante avance terapéutico frente a ellas (Guy, 1996).

Empleando la administración transdérmica se evita el paso del fármaco a través del tracto gastrointestinal, por lo que fármacos que provocan irritación gástrica o que sufran un importante efecto de primer paso hepático, son buenos candidatos para incorporarse en formulaciones de uso tópico (Chien, 1991).

El principal inconveniente de la administración transdérmica de principios activos es la barrera que opone la piel al paso de cualquier sustancia externa, debido a esto, la vía transdérmica no puede emplearse si se requiere un efecto terapéutico inmediato ni si se requieren altas concentraciones de fármaco en la circulación sistémica. Además, son sistemas algo costosos ya que sólo un pequeño porcentaje del fármaco incluido en la forma farmacéutica es absorbido por el organismo y además, porque algunos de los sistemas que se emplean por esta vía, requieren de una forma de dosificación específica asociada a un cierto grado de tecnología para su elaboración (Chien, 1991).

Entre los agentes terapéuticos estudiados para ser administrados a través de la piel se encuentra el metotrexato (MTX), el cual es un fármaco que actúa como inhibidor de la síntesis de DNA por inhibición competitiva de la enzima dihidrofolato reductasa. Se ha utilizado como agente inmunosupresor en el tratamiento de dermatomiositis, artritis reumatoide, granulomatosis de Wegener, (Vemulapalli *et al.*, 2008). También se ha caracterizado por ser útil en tratamientos no neoplásicos de la piel, caracterizados por la proliferación anormal rápida de células epidérmicas (Chabner *et al.*, 2006). El MTX es administrado por vía oral o parenteral y su uso prolongado induce efectos adversos como hepatotoxicidad, supresión de función de

la médula ósea, náuseas, vómito, anemia, fatiga, dolor de cabeza y trombocitopenia, anemia y pérdida del cabello (Chandak y Verma, 2008). Es por ello, que para evitar los efectos secundarios se ha recurrido a sistemas transdérmicos para su administración, evitando así los efectos adversos (Chabner *et al.*, 2006). Con el fin de facilitar el transporte de MTX a través de la piel, en este trabajo se incluye el MTX en acarreadores submicrónicos (liposomas flexibles) y se estudia su permeación transdérmica *in vitro*, empleando microagujas metálicas como promotores de absorción físico-mecánicos.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 METOTREXATO

El metotrexato (MTX, Figura.1) es un compuesto sólido de color amarillo anaranjado con punto de fusión de 182°- 189°C. Es una molécula de carácter ácido que presenta tres valores de pKa: 5.6, 4.8 y 3.8, por lo que a pH fisiológico se encuentra mayoritariamente ionizado. El MTX generalmente está hidratado y contiene de 8 a 10 % de agua.

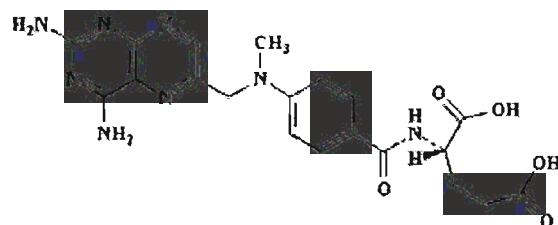


Figura 1. Estructura química de Metotrexato

Es poco soluble en bases lipofílicas, prácticamente insoluble en agua, etanol, cloroformo, éter; y muy soluble en soluciones diluidas de álcalis o carbonatos (Florey, 1976; Merck, 1996). La longitud de onda de máxima absorción en UV es se presentan en la tabla 1 dependiendo en el medio que en que se encuentre el MTX.

La tabla 1 resume los datos de absorción al UV para MTX y sus correspondientes valores de coeficiente de absorción (Florey, 1976).

Tabla 1. Datos de Absorción UV del MTX (Florey, 1976).

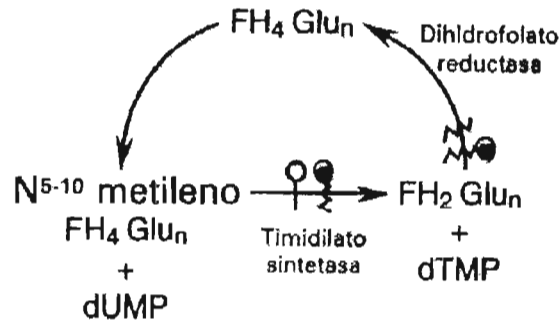
Solvente	$\lambda_{\max}$ nm ( $\epsilon_{\max} \times 10^{-4}$ )		
0.1N HCl		307 (21.6)	243 (18.1)
0.1 M pH 3.7 Buffer Tris	370 (7.45)	302 (24.8)	257 (23.3)
0.1N NaOH	372 (8.05)	303 (24.8)	258 (24.7)

Es un compuesto que se degrada con la luz por lo que es importante protegerlo adecuadamente frente a ella. Los productos de degradación corresponden a 2,4-diamino-6-pteridinecarbaldehído, ácido 2,4-diamino-6-pteridina carboxílico y ácido p-aminobenzolglutámico.

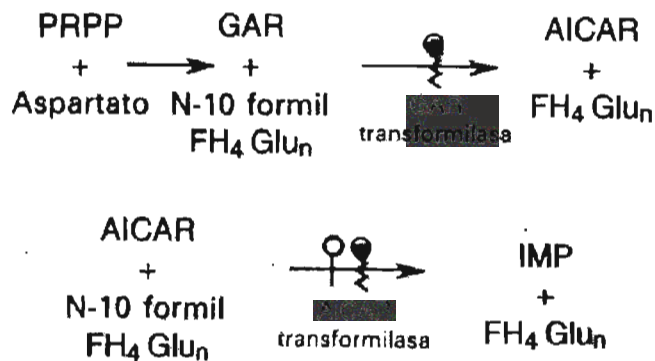
Este compuesto tiene propiedades farmacológicas, siendo considerado como un agente antineoplásico de la familia de los antagonistas del ácido fólico ya que inhibe en forma competitiva a la enzima dihidrofolato reductasa que depende de folato en la síntesis *de novo* de purina y timidilato. Esta enzima tiene por función reducir los dihidrofolatos a tetrahydrofolatos. El tetrahydrofolato (FH4) actúa como factor de transferencia de grupos metilo ( $\text{CH}_3$ ) en diversos procesos implicados en la síntesis de aminoácidos, así como también en la síntesis de bases nucleicas. Por consiguiente, el ácido fólico es indispensable para la síntesis de DNA (Chabner *et al.*, 2006).

En condiciones normales, el ácido fólico se encuentra almacenado en el citoplasma bajo la forma de poliglutamato. La forma biológicamente activa del ácido fólico (F) es el tetrahydrofolato (FH4). El proceso de activación se realiza en dos pasos mediante una única enzima, la dihidrofolato reductasa pasa primero de F a dihidrofolato (FH2) y posteriormente a FH4. El MTX inhibe selectivamente la dihidrofolato reductasa, al competir con el FH2; de hecho, el MTX tiene más afinidad por la enzima que el propio sustrato natural. El resultado es la formación de un complejo ternario estable entre el MTX, la enzima y el NADPH que actúa como cofactor de la reacción (Figura 2) (Chabner *et al.*, 2006).

## A Síntesis de timidilato



## B Síntesis de novo de purinas



Reacción inhibida por:  
 Metotrexato, Poliglutamato, de metotrexato, -H-GU-

Figura 2. Sitios de acción del metotrexato y sus poliglutamatos. (Chabner *et al.*, 2006).

El MTX ha sido utilizado como agente anticanceroso durante un cierto número de años, presentando un reciente resurgimiento de su uso al introducirse regímenes de dosificación moderados. Actualmente se utiliza para tratar un cierto número de neoplasias, incluyendo la leucemia, el sarcoma osteogénico, el tumor de Wilm y los linfomas distintos al de Hodgkins (Winter, 1994). También este fármaco ha mostrado tener efecto inmunosupresor e inhibidor de la proliferación celular, resultando útil en el tratamiento de psoriasis, un trastorno no neoplásico de la piel que se caracteriza por proliferación anormalmente rápida de células epidérmicas. Además, los antagonistas de folato son inhibidores potentes de las reacciones inmunitarias

mediadas por células y se han utilizado como agentes inmunosupresores (ejemplo en el trasplante de médula ósea alógena y de órganos), y en tratamiento de dermatomiositis, artritis reumatoide, de la vasculitis, de la sarcoidosis, granulomatosis de Wegener y en el tratamiento de la enfermedad de Crohn (Chabner, 2006).

### 2.1.1 Farmacocinética

#### *Absorción*

El MTX es utilizado normalmente por vía oral o parenteral, aunque últimamente se están estudiando formas farmacéuticas de uso tópico. Este fármaco se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal a las dosis que se emplean comúnmente en la práctica clínica (0,1 mg/kg de peso), pero a dosis mayores se absorbe en forma incompleta (Chabner *et al.*, 2006). Este hecho sugiere la existencia de un mecanismo saturable de absorción intestinal. La presencia de alimentos, especialmente leche, disminuyen su biodisponibilidad (Tung y Maibach, 1990). El MTX se administra siempre por vía intravenosa cuando la dosis supera los 30 mg/m<sup>2</sup> sc (área de superficie corporal) debido a que la absorción oral es limitada (Winter, 1994). Los regímenes de dosificación pueden oscilar entre 20-50 mg o más (ver tabla 2). Estas dosis son administradas en períodos cortos entre 3 hasta 6 horas, y períodos largos como 40 h (Winter, 1994).

Tabla 2. Regímenes de dosificación del MTX para algunas enfermedades

Enfermedad	Vía de administración	Dosis
Tratamiento del linfoma de células T cutáneo (micosis fungoides)	Administración oral	Adultos: 2.5 -10 mg al día en una dosis única.
	Administración parenteral	Adultos: 50 mg i.m. /i.v una vez a la semana o 25 mg i.m. /i.v dos veces a la semana.
Tratamiento de la psoriasis	Administración oral y parenteral	Adultos: 10-25 mg por vía oral, intramuscular o intravenosa en una dosis única a la semana.
Tratamiento de la artritis reumática	Administración oral	Adultos: 7.5 mg una vez a la semana o 3 dosis de 2.5 mg a intervalos de 12 horas una vez a la semana.
Tratamiento de la polimiositis o dermatomiositis	Administración parenteral	Adultos: 5-10 mg i.v./i.m. una vez a la semana
Tratamiento de la sarcoidosis	Administración oral	Adultos: 10 mg por vía oral una vez a la semana (rango de dosis entre 7.5-15 mg/semana) durante una media de 30 meses.

### Distribución

En equilibrio, las mayores concentraciones del fármaco se encuentran en los riñones, la vesícula biliar, el bazo, el hígado y la piel (Tung y Maibach 1990). Se transporta escasamente a través de la barrera hematoencefálica, por lo que las células neoplásicas que han entrado al sistema nervioso central no están afectadas por las concentraciones plasmáticas habituales de este fármaco (Chabner *et al.*, 2006).



Entre el 50 % - 70 % del MTX se une a proteínas plasmáticas, en su mayoría a la albúmina. Los fármacos que desplazan al MTX en su unión a proteínas incrementan considerablemente la concentración plasmática de este principio activo (Chabner *et al.*, 2006).

Debido a que existe una relación compleja entre el volumen de distribución y el aclaramiento que experimenta el MTX, las vidas medias aparentes que presenta este fármaco no se calculan aplicando un método farmacocinético lineal tradicional. Se aplica un modelo bicompartimental, con una vida media inicial  $\alpha$  de 2 – 3 horas y una vida media terminal,  $\beta$ , de aproximadamente 10 horas, parecen representar razonablemente la fase de eliminación de este fármaco (Winter, 1988).

### *Metabolismo*

Este fármaco no parece metabolizarse de manera significativa; sin embargo, se han encontrado metabolitos del MTX en el plasma y en la orina cuando este fármaco se administra en dosis elevadas. La cantidad de metabolitos formados es aproximadamente 3 veces mayor cuando se administra por vía oral comparada con la parenteral, esto sugiere que el metabolismo del MTX ocurre principalmente en el tracto gastrointestinal o bien en el hígado por causa de la recirculación enterohepática (Chabner, 1996).

El metabolismo es hepático y mediante dos vías: (Lennard, 1999)

- 7-hidroxilación por aldehído oxidasa, produciendo el 7-hidroximetotrexato, responsable de la nefrotoxicidad.
- La poliglutamación es responsable de la retención antifolato dentro de la célula por ser potentes inhibidores de la enzima dihidrofolato reductasa ya que forman un complejo de lenta disociación con ella (Tung y Maibach, 1990). El metabolito más ampliamente estudiado es el compuesto 7-hidroximetotrexato que se considera un compuesto potencialmente nefrotóxico, debido a su baja solubilidad en el agua (Winter, 1994).

## Excreción

El MTX se excreta principalmente por el riñón vía filtración glomerular y transporte activo (95 %). Entre 1-2 % de la dosis excretada es eliminada por las heces ya sea como compuesto original o como alguno de sus metabolitos. La reabsorción tubular de MTX es un proceso saturable por lo que una concentración plasmática de más de 1 mg/mL produce un incremento en el aclaramiento de este fármaco (Tung y Maibach, 1990).

### 2.1.3 Reacciones adversas y toxicidad

Se han observado numerosos efectos adversos asociados al empleo de MTX. Algunas de estas reacciones son: náuseas, vómitos, dolor abdominal, complicaciones gástricas, úlcera gástrica, fatigas, dolor de cabeza, disnea, leucopenia, trombocitopenia, anemia y pérdida de cabello (Said *et al.*, 1997). Estas reacciones están relacionadas con la dosis y son reversibles. Además, como el MTX es introducido en el citoplasma mediante el mismo sistema de transporte activo que el ácido fólico y este sistema no está presente en los microorganismos, su acción citotóxica es exclusiva de las células de los mamíferos.

Según un estudio realizado en humanos que emplean MTX en forma prolongada (por más de 20 años), se ha observado que este fármaco es relativamente seguro y que no existe una aparente relación entre la cantidad acumulada de MTX (o duración de la terapia) y la frecuencia de reacciones adversas. Estas reacciones pueden presentarse en cualquier fase del tratamiento, y puede suceder que los pacientes que han ingerido por muchos años MTX sin presentar problemas aparentes por este fármaco, si los presenten en el futuro.

El metabolismo de MTX produce metabolitos activos, de los cuales el más significativo es el compuesto 7-hidroxiderivado. Aunque este metabolito tiene sólo aproximadamente 1/200 partes de la actividad clínica del MTX, su solubilidad es de un tercio a un quinto de la del MTX. Como resultado, se puede precipitar en los túbulos renales produciendo nefrotoxicidad. Debido a este problema de solubilidad los pacientes a los que se les administran grandes dosis de MTX deberán ser

hidratados adecuadamente y habrá que administrarles bicarbonato sódico para mantener el pH de la orina por encima de 7 (Winter, 1994).

Uno de los principales problemas observados luego del uso de MTX es la toxicidad hepática. Sin embargo, el desarrollo de fibrosis y la cirrosis por la acumulación de MTX en el hígado aún no ha sido demostrado. El monitoreo sérico de los niveles de MTX es esencial para detectar el desarrollo de toxicidad y para poder actuar adecuadamente y de forma rápida.

Cuando existe intoxicación con MTX o cuando se desarrolla toxicidad renal debido al uso de este fármaco, se debe administrar folato cálcico, ya sea por vía intramuscular, intravenosa u oral. Se requieren de al menos 6 horas para que las concentraciones séricas de MTX bajen a niveles terapéuticos (Tung y Maibach, 1990).

### *Contraindicaciones*

El MTX es conocido como un fármaco teratogénico por lo que su uso está contraindicado en pacientes embarazadas y se debe emplear conjuntamente con fármacos anticonceptivos en mujeres de edad fértil. También debe evitarse su uso en caso de enfermedad del hígado o de los riñones, infecciones activas (tuberculosis, pielonefritis), hipoplasia de la médula ósea, úlcera péptica, colitis ulcerosa, diabetes mellitus, obesidad y en pacientes inmunosuprimidos y consumidores frecuentes de alcohol. Además, es importante que los pacientes que utilicen este fármaco, tengan un aclaramiento renal adecuado (Tung y Maibach, 1990).

#### **2.1.4 Metotrexato por vía transdérmica**

Por las características químicas del MTX (solubilidad, peso molecular), este fármaco penetra escasamente a través de la piel. Se ha observado que cuando se administra el MTX en forma tópica y por cortos períodos de tiempo, no se alcanzan niveles sanguíneos adecuados. Se ha reportado un importante aclaramiento de este principio activo en su paso desde la epidermis a la dermis (Hwang *et al.*, 1995). Además, se han encontrado grandes valores en el tiempo de respuesta o tiempo de latencia de este fármaco en estas condiciones. Sin embargo, la efectividad de este

principio activo parece aumentar cuando se administra por períodos de tiempo prolongados.

El estrato córneo es probablemente la principal barrera que se opone al paso de MTX a través de la piel humana y el mecanismo predominante de su penetración parece ser la difusión pasiva. Debido a esto último se espera que cambios de pH en el vehículo influyan en la penetración de este fármaco ya que la difusión pasiva es máxima cuando la molécula está en su forma no ionizada (Lu y Jun, 1998).

El MTX se encuentra mayoritariamente no ionizado en el rango pH 4 – 5, por lo que en este rango de pH, el paso de MTX por medio de difusión pasiva debería ser máximo. En un estudio a pH 1 – 3, se observó que la proporción y la extensión de la penetración de MTX fueron bajas, probablemente debido a la pequeña cantidad de fármaco no disociado en este rango de pH; sin embargo, la cantidad de fármaco retenido en el estrato córneo fue bastante alta. (Vaidyanathan *et al.*, 1985).

Para aumentar la penetración de este fármaco a través de la piel, se han estudiado formas farmacéuticas no convencionales para su administración. Es así como se han investigado diferentes vehículos para su incorporación en formas farmacéuticas de uso tópico (pomadas, cremas, hidrogeles, geles), conteniendo sustancias promotoras de la absorción como es el caso de dimetilsulfóxido, y ácido retinoico, propilenglicol o alcohol isopropílico en su formulación, las cuales han mostrado un incremento en la permeación del MTX a través de la piel de ratones y de la piel de humanos (Lu *et al.*, 1997).

También se ha intentado el uso de ciertas técnicas, como por ejemplo la iontoforesis, que facilita la penetración de la molécula, debido a que MTX está cargado negativamente a pH fisiológico (7.4) y permite que el fármaco se pueda mover en el campo y penetrar (Blanco *et al.*, 2001). De igual forma se ha administrado empleando electroporación. Este método aplica pequeños pulsos eléctricos de suficiente voltaje para que la membrana celular sea temporalmente permeable permitiendo el paso de moléculas (Wong *et al.*, 2005). Se ha observado que la iontoforesis y el uso de promotores de la absorción provocan un incremento de la

descamación de la superficie de la epidermis y un aumento del espacio intercelular y por lo tanto un mayor paso de este fármaco a través de la piel.

Existen otras investigaciones que se han enfocado al uso de modificadores de la permeabilidad de la piel de forma reversible con agentes surfactantes ejemplo de ellos son: lauril sulfato de sodio (LSS), alquil bencil cloruro de dimetil (ABDMC), transcitol, y ácido salicílico (Javadzadeh y Hamishehkar, 2011).

Los acarreadores como liposomas etanólicos (etosomas), han sido usados para la penetración transdérmica de MTX para el tratamiento de psoriasis, estas investigaciones se han realizado en piel de cadáver humano, donde se encontró que estos sistemas pueden acarrear el MTX (Dubey *et al.*, 2007).

Las formas farmacéuticas convencionales de MTX que se encuentran en el mercado son: inyectable liofilizado, solución inyectable y comprimidos recubiertos.

## **2.2 PIEL**

### **2.2.1 Generalidades**

La piel está constituida por diferentes tejidos integrados para realizar funciones específicas. Es el órgano más grande del cuerpo humano en área superficial y peso. En adultos la piel cubre un área de casi 2 m<sup>2</sup> y pesa 4.5 a 5 kg, su grosor varía desde 0.5 mm, en los párpados hasta 4 mm, en los talones, sin embargo en gran parte del cuerpo es de 1 a 2 mm. La piel recibe un tercio de la circulación sanguínea del cuerpo; este órgano es elástico, duro, y se regenera en condiciones fisiológicas normales (Tortora y Derrickson, 2002).

Antiguamente se pensaba que la piel constituía una barrera impermeable a todas las sustancias excepto los gases. Hoy día se sabe que la piel es permeable a sustancias lipofílicas y a sustancias no cargadas, y que constituye una barrera, tanto física como química, que protege al cuerpo frente a la invasión de microorganismos.

La piel tiene múltiples funciones. Cumple una importante función en la regulación de la temperatura corporal ya que por medio de sus terminaciones nerviosas y por medio de sus vasos sanguíneos, glándulas y tejido adiposo, está en constante comunicación con el ambiente externo (Junquera & Carneiro, 1996). Protege al organismo frente a la pérdida de agua por evaporación, así como también lo protege contra las fricciones. Es la responsable, en conjunto con la luz solar, de sintetizar la vitamina D3, la cual es fundamental para la absorción de calcio por parte del hueso (Junquera y Carneiro, 1996). Además, debido a la melanina que contiene, cumple funciones de protección del organismo frente a la radiación de los rayos UV (Guy, 1996; Junquera y Carneiro, 1996).

Desde el punto de vista estructural la piel consta de dos partes principales: la superficial y más delgada, está compuesta de tejido epitelial y se denomina epidermis (Figura 3). La profunda y más gruesa, de tejido conectivo es la dermis. Debajo de esta se encuentra el tejido subcutáneo, aunque no forma parte de ella, también denominado hipodermis, la cual consiste en tejidos areolar y adiposo. Las fibras que provienen de la dermis fijan la piel al tejido subcutáneo, el cual a su vez se une a los tejidos y los órganos subcutáneos. La hipodermis sirve como área de almacenamiento de grasa y contiene vasos sanguíneos de gran calibre que irrigan la piel. Esta capa (y a veces la dermis) tienen terminaciones nerviosas denominadas corpúsculos de Vater-Pacini (luminares) que son sensibles a la presión (Tortora, 2006).

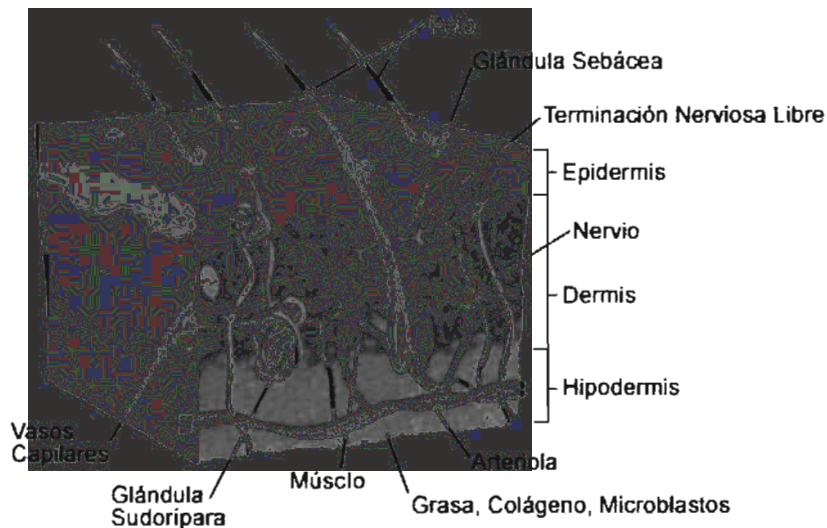


Figura 3. Partes que constituyen la piel (imagen tomada <http://www.yalemedicalgroup.org>)

## 2.2.2 Estructura de la piel

### *Epidermis*

La epidermis tiene un espesor medio de alrededor de 100  $\mu\text{m}$ , y en algunas superficies, es aún más delgada, 0.02 mm en los párpados; en los pies, es considerablemente más gruesa, 1 a 5 mm. Está formada principalmente por células vivas: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. Casi el 90 % de las células son los queratinocitos que tienen la particularidad de transformarse sucesivamente en el transcurso del proceso de queratinización, para formar diferentes capas, cada una de las cuales tienen características específicas. Los queratinocitos producen queratina, la cual es una proteína fibrosa y resistente que protege tanto la piel como los tejidos subyacentes del calor, de los microbios, y de los compuestos químicos.

La epidermis está formada por distintas capas de células y muchas partes del cuerpo tienen cuatro estratos: basal, espinoso, granuloso y córneo; en áreas donde hay mayor fricción como las palmas de las manos y la planta de los pies posee cinco estratos, donde se adiciona el estrato lúcido (Tortora, 2002). (Figura 4)



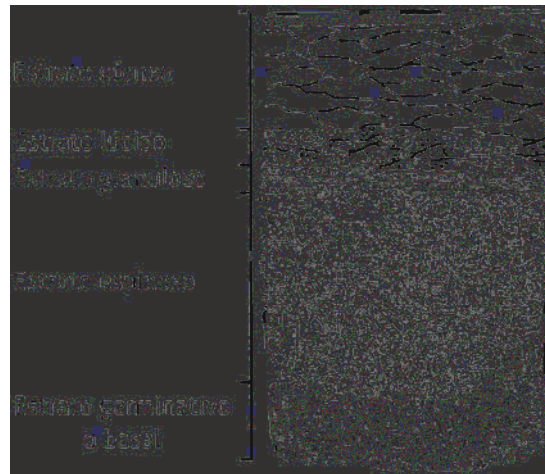


Figura 4. Diagrama de la epidermis. Las células basales se transforman, por diferenciación, en células cutáneas córneas planas, las cuales no tienen núcleo (imagen tomada de <http://commons.wikimedia.org>).

1. *Estrato basal*

Es la capa más profunda de la epidermis y está constituida de una sola capa de células. Cerca del 50 % se encuentra en mitosis y producen las células de la capa inmediatamente superior, el estrato espinoso. Estas células son una sola hilera de queratinocitos cúbicos o cilíndricos que producen continuamente queratinocitos. Los melanocitos, células de Langerhans y las células de Merkel se hallan dispersos entre los queratinocitos del estrato basal (Tortota, 2002).

2. *Estrato espinoso*

Encima del estrato basal se encuentra el estrato espinoso, en el cual 8 a 10 capas de queratinocitos poliédricos están estrechamente unidos por los desmosomas de naturaleza proteica. Su citoplasma contiene tonofilamentos, de naturaleza protéica, que se agrupan en paquetes, las tonofibrillas.

3. *Estrato granuloso*

Se localiza en la parte central de la epidermis, consta de tres a cinco capas de queratinocitos aplanados en los que ocurre apoptosis. Los núcleos y otros organelos



de estas células se encuentran en proceso de degeneración y los filamentos intermedios son más evidentes.

En este nivel se producen moléculas responsables de las características fisicoquímicas de las capas superiores, con la formación de los gránulos de queratohialina y la aparición de cuerpos de Odland.

En el estrato granuloso encontramos todavía células vivas con núcleo. En el transcurso de la queratinización se aplanan y pierden el núcleo para transformarse en corneocitos, que forman el estrato córneo.

#### 4. Estrato córneo

Está formado por tres capas:

- Estrato lúcido (presente solamente en las palmas de las manos y en las plantas de los pies), consta de tres o cinco capas de queratinocitos transparentes, planos y muertos, que contienen filamentos intermedios muy apiñados y poseen una membrana plasmática engrosada.
- Estrato compactum, que constituye la capa cornea propiamente dicha.
- Estrato disjonctum (capa más externa descamante) (Tortora, 2006).

El conjunto de estas tres capas tiene un espesor de unas 10  $\mu\text{m}$ .

La capa córnea tiene propiedades y composición bioquímica totalmente diferente de las capas subyacentes de la epidermis. Está constituido de 25 a 30 capas de queratinocitos muertos y planos. Las células que la componen (corneocitos) representan la última fase de la queratinización. Estas células están desprovistas de núcleo y están formadas casi exclusivamente por queratina. Contienen sin embargo, un cierto número de enzimas que participan en los fenómenos de metabolización. Además, son ricas en una mezcla de sustancias higroscópicas que aseguran la fijación del agua.

Los corneocitos se organizan de modo que asemejan una pared de ladrillos. El cemento que los une es de tipo lipídico y está constituido por una mezcla de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), de colesterol y de ceramidas. A este nivel los desmosomas se transforman en corneosomas.

## *Dermis*

La dermis tiene un espesor variable de 500  $\mu\text{m}$  a 1 mm. Se distingue la dermis papilar, la más próxima a la unión dermo-epidérmica y a la dermis reticular, más profunda, que representa cerca del 80 % del espesor total de la dermis (Martini, 2005). La dermis está compuesta sobre todo de tejido conectivo que contiene colágena y fibras elásticas. Las pocas células que hay son fibroblastos, macrófagos y adipocitos. La dermis posee vasos sanguíneos, nervios, glándulas y folículos pilosos. De acuerdo a su estructura tisular la dermis se divide en capas papilar superficial y reticular profunda. El estrato reticular constituye la parte inferior de la dermis y muestra una transición continua con el subcutis subyacente. El stratum papillare (del latín papillae = protuberancia) es la capa superior. Constituye una frontera abrupta y ondulada con la epidermis. Su estructura ondulada aumenta la superficie de contacto con la epidermis, garantizando así un suministro óptimo de nutrientes de la capa epitelial más profunda (las células basales) por medio de los vasos sanguíneos que atraviesan los corpúsculos papilares (Figura 5) (Deutschland, 2009).

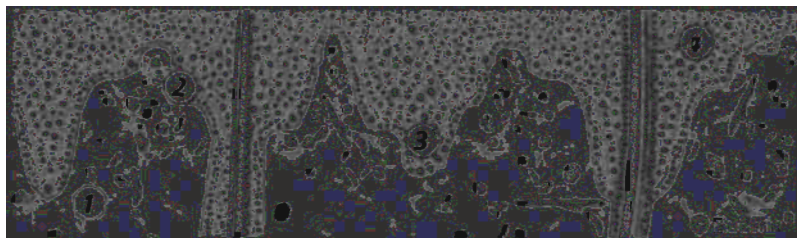


Figura 5. Estructura de la dermis: 1 Stratum papillare, 2 Membrana basal, 3 Células basales, 4 Epidermis (<http://www.eucerin-la.com/mx>)

Está formada por: La capa papilar, porción superficial de la dermis, que consiste en tejido conectivo areolar que contiene fibras elásticas finas. Su área superficial aumenta considerablemente gracias a pequeñas protuberancias digitiformes llamadas papilas dérmicas. Estas estructuras penetran en la epidermis y contienen asas capilares. Algunas papilas dérmicas también incluyen receptores táctiles, denominados corpúsculos táctiles de Meissner que son terminaciones nerviosas



sensibles al tacto. En las papilas dérmicas también existen terminaciones nerviosas libres o sea dendritas que carecen de especialización estructural apreciable (Tortora y Derrickson, 2002). La elastina es responsable de la elasticidad de la piel. Las fibras oxitalámicas son fibras de elastina frágiles y son las primeras en desaparecer a lo largo del envejecimiento, se localizan principalmente en la dermis papilar (Martini, 2005).

La parte profunda de la dermis es la capa reticular que consiste en tejido conectivo denso e irregular con asas de fibras de colágena y proteoglicano y algunas fibras elásticas gruesas. Las asas de fibras de colágeno de esta región se entrelazan a manera de red. Los espacios entre las fibras están ocupados por unos cuantos adipocitos, folículos pilosos, nervios, así como glándulas sebáceas y sudoríparas (Tortora y Derrickson, 2002).

Además del tejido conjuntivo, la capa dérmica contiene otros varios tipos de células, por ejemplo, los fibroblastos y los mastocitos, así como numerosos vasos sanguíneos y linfáticos, terminales nerviosas, receptores nerviosos del calor y frío, así como órganos del sentido del tacto. Las raíces de los cabellos (la terminal bulbosa del tallo del cabello donde se desarrolla este último), glándulas sebáceas (que están casi siempre adheridas a los tallos del cabello) y glándulas sudoríparas están ubicadas también en la dermis. El cabello producido en la raíz alcanza la superficie de la piel a través de una abertura con revestimiento llamada folículo. Los lípidos producidos en las glándulas sebáceas también viajan a la superficie de la piel a través de los folículos pilosos. El sudor producido en las glándulas sudoríparas alcanza la superficie de la piel a través de aberturas llamadas poros que se extiende desde la raíz o glándula hacia arriba a través de la epidermis hasta la superficie de la piel. La humedad y lípidos secretados desde las glándulas sudoríparas o glándulas sebáceas constituye una película hidrolipídica que cubre la superficie de la piel (Martini, 2005).

## *Unión dermoepidérmica*

La adherencia entre la dermis y la epidermis se consigue gracias a la unión dermoepidérmica. Esta capa fina situada bajo la capa basal está formada por la membrana basal y varias capas de sustancias tales como glicoproteínas, colágeno de tipo IV y fibronectina. El conjunto capa basal-unión dermoepidérmica tiene una estructura ondulada característica de las pieles jóvenes. Con el envejecimiento esta estructura se aplanan y la piel se distiende (Martini, 2005). Sus funciones son soporte mecánico, regulación de permeabilidad, fijación de células, morfogénesis de las células epiteliales. Esta capa principalmente consta de las siguientes zonas: membrana plasmática de la célula basal, lámina lúcida, lámina densa y la zona fibrosa (Sherwood, 2001).

## *Hipodermis*

Es un tejido conjuntivo laxo, que posee la misma estructura que la dermis, pero en la que encontramos sobre todo colágeno y un gel proteoglicano. Además, está cargada de adipocitos (células grasas) en forma de aglomerados que almacenan triglicéridos. Los adipocitos se forman a partir de los pre-adipocitos, células semejantes en su forma a los fibroblastos, pero programadas para cargarse de triglicéridos. Las células adiposas confieren a la hipodermis su poder aislante y constituyen una reserva de energía (Martini, 2005).

La hipodermis o subcutis tiene tres funciones principales:

1. Las aglomeraciones de células de grasa proveen una almohadilla que actúa como un amortiguador de impactos de protección para la fascia y tejido muscular que yacen debajo.
2. Esta almohadilla también aísla al cuerpo del frío y calor.
3. Las células de grasa sirven como importantes unidades de almacenamiento para nutrientes. Cuando el cuerpo las necesita, son transportadas desde las células de grasa en los vasos sanguíneos circundantes, los cuales transportan los nutrientes hacia áreas que los necesitan.

### 2.2.3 Función del estrato córneo

Es responsable en particular de lo que se denomina "efecto barrera", representa un lugar de almacenamiento de sustancias lipídicas, participa de manera muy activa en el fenómeno de hidratación de la piel y por lo tanto, tiene un papel estético preponderante.

#### *Efecto Barrera*

La capa córnea es el elemento protector principal de la piel, aunque su espesor sea mínimo (10 y 20  $\mu\text{m}$ ) en relación al espesor total de la piel. A pesar de su delgadez constituye una barrera casi impermeable, gracias a su estructura química.

Los corneocitos son células aplanadas de unos 4  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0.1  $\mu\text{m}$  de espesor. Están compuestos de queratina, una proteína extremadamente resistente. El estrato córneo contiene 13 % de agua. Las células están unidas por una mezcla de ácidos grasos poliinsaturados, colesterol y ceramidas. La cohesión se mantiene gracias a las uniones proteicas representadas por los corneosomas.

El conjunto de queratina más lípidos es la estructura responsable del efecto barrera. Este efecto se pone de manifiesto al impedir la penetración a través de la piel de sustancias exógenas, pero igualmente al ralentizar la difusión del agua procedente de las capas más profundas de la dermis.

#### *El efecto barrera puede modificarse de diferente forma:*

Si con un adhesivo arrancamos sucesivamente las capas del estrato córneo (stripping) la permeabilidad de la piel total aumenta.

Si hidratamos la piel de manera excesiva (parche oclusivo), las células córneas hiperhidratadas pierden su capacidad de barrera y se vuelven permeables en los dos sentidos. El grado de barrera se ve así considerablemente afectado por el grado de hidratación cutánea.

Si, por el contrario, la piel está excesivamente deshidratada, pierde su flexibilidad y se cuarteja, ya que el agua actúa como un plastificante de la queratina. El efecto barrera se ve entonces considerablemente disminuido, debido a que hay una lesión en el estrato córneo.

### *Función de reserva*

Se puede producir un almacenamiento de sustancias liposolubles a nivel del cemento lipídico intercelular. Las ceramidas, componente principal de este cemento, son esfingolípidos (ácidos grasos + esfingosina) con mayor o menor polaridad, que se organizan en una estructura laminar capaz de integrar otras moléculas liposolubles en el interior de la bicapa o en las bicapas. Estas moléculas difunden lentamente hacia las capas inferiores del estrato córneo y después en la epidermis.

### *Función estética*

El estrato córneo es la capa más externa y por lo tanto, la más visible, y su estética está en relación con el estado de la superficie que depende en primer lugar del agua fijada y de la capacidad de descamación del estrato disjunctum.

### *El pH cutáneo*

El pH de la dermis, es cercano a 7, se transforma en un pH ácido cercano a 5 en la superficie de la piel. Este aumento considerable de la actividad de los iones  $H^+$  se debe a las hidrolasas de la epidermis que generan varios ácidos hidrosolubles, en particular el ácido urocánico, el ácido pirrolidincarboxílico y el ácido láctico. El pH cutáneo es variable según los individuos y las zonas corporales. Se sitúa generalmente entre 4 y 7. El pH cutáneo está regulado por el sudor, la secreción de las glándulas ecrinas. Esta secreción está compuesta de ciertos ácidos los cuales son un medio de defensa de la piel frente a los microorganismos

#### **2.2.4 Penetración cutánea**

El término de penetración cutánea o "permeación" describe el paso de una molécula a través de las diferentes capas de la piel, desde su fijación en las primeras capas de células del estrato córneo hasta su absorción transcutánea (Martini, 2005).

Aunque la piel tiene la función de barrera, algunos productos químicos son capaces de penetrar en ella. La resistencia para el transporte transdérmico entre el estrato córneo y las capas de la epidermis fue establecido por primera vez por Rein en 1924. Schuplein estableció más tarde que la penetración transdérmica se ve limitada por el estrato córneo en sí mismo, y que la permeación molecular es un proceso pasivo. Posteriormente, Michaels mostró que varios fármacos tenían una permeabilidad significativa y determinó sus coeficientes de difusión en el estrato córneo (Martini, 2005).

La absorción percutánea de las moléculas del fármaco es de particular importancia en el caso de los sistemas transdérmicos, ya que el principio activo tiene que ser absorbido en una tasa adecuada manteniendo un nivel constante. En general, una vez que las moléculas de los fármacos cruzan la barrera del estrato córneo, el paso a capas más profundas de la epidermis y la dermis y la subsecuente absorción sistémica se produce con relativa rapidez y facilidad (Mehta, 2004).

En los últimos 30 años, la liberación de los agentes terapéuticos a través de la piel se ha convertido en una realidad clínica. A partir de la primera aprobación de los parches de escopolamina en 1979, la administración transdérmica de fármacos es ahora una forma viable. El diseño racional de nuevos sistemas transdérmicos o formulaciones (y determinación de las evaluaciones de riesgo de las exposiciones transdérmicas) también requiere una comprensión del proceso de penetración y los factores que la determinan a nivel molecular. Cuando una formulación tópica se coloca en la piel, el fármaco tiene que penetrar en el estrato córneo para alcanzar los tejidos viables. El principal factor limitante para este proceso es la lenta difusión a través del estrato córneo, que como ya se mencionó, es conocido por ser una capa de células muertas. Los lípidos del estrato córneo son importantes para la función de barrera de la piel. Hay suficiente evidencia de que las ceramidas desempeñan un papel importante en la estructuración y el mantenimiento de la barrera de la piel. Además, funcionan como emolientes, lo que hace la piel suave y le confieren propiedades de retención de agua en el estrato córneo (Degim, 2006).

## 2.3 APLICACIÓN TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS

Una de las principales ventajas que ofrece la administración transdérmica respecto de la vía oral, es que permite obtener niveles constantes del fármaco en la sangre, evitando así las reacciones adversas asociadas a las fluctuaciones en las concentraciones sanguíneas. En ciertas ocasiones, la terapia transdérmica puede reemplazar a una perfusión continua, evitándose así las incomodidades inherentes a esta vía de administración como son las hospitalizaciones y el dolor en el sitio de aplicación (Kneep *et al.*, 1987).

Empleando esta vía de administración se evita el paso del fármaco a través del tracto gastrointestinal, por lo que fármacos que provocan irritación gástrica o que sufren un importante efecto de primer paso hepático, son buenos candidatos para incorporarse en formulaciones de uso tópico.

La vía transdérmica proporciona un régimen terapéutico simple y sin mayores incomodidades para los pacientes ya que puede emplearse a intervalos espaciados de dosificación (de 24 horas hasta incluso semanas). Además, la terapia puede ser rápidamente suprimida con la simple remoción del vehículo que contiene al fármaco (Chien 1991; Kneep *et al.*, 1987).

El principal inconveniente de la administración transdérmica de principios activos es la barrera que opone la piel al paso de cualquier sustancia externa, debido a esto, la vía transdérmica no puede emplearse si se requiere un efecto terapéutico inmediato ni si se requieren altas concentraciones de fármaco en la circulación sistémica (Chien, 1991). Además, son sistemas algo costosos ya que sólo un pequeño porcentaje del fármaco incluido en la forma farmacéutica es absorbido por el organismo y además, porque algunos de los sistemas que se emplean por esta vía, requieren de una forma de dosificación específica asociada a un cierto grado de tecnología para su elaboración.

Otro inconveniente que presenta esta vía, es la susceptibilidad que tienen algunos pacientes al uso de parches transdérmicos, observándose alergias en el sitio de



aplicación. Para evitar o minimizar este problema, en ciertos casos se recomienda ir cambiando el sitio de aplicación de estos sistemas. En la práctica, los sistemas de liberación transdérmica poseen dos potenciales dificultades. En primer lugar la cantidad de fármaco que llegará a la circulación sistémica dependerá del grado de permeabilidad de la piel en el sitio de aplicación del sistema, por lo que es importante que el fabricante especifique en qué zonas del cuerpo puede ser utilizado. Y en segundo lugar, si estos sistemas se rompen al ser aplicados, se liberarán grandes cantidades de fármaco pudiendo provocarse algún daño si el fármaco incluido es muy potente o si produce algún tipo de irritación (Guy, 1996).

Se ha planteado que el éxito de todo sistema terapéutico transdérmico (STT) depende de la capacidad de la sustancia para difundir a través de la piel en cantidades suficientes para lograr el efecto terapéutico deseado, por lo que el grado de penetración depende de las características fisicoquímicas del fármaco y de la formulación (Naik *et al.*, 2000). En la tabla 3 se presenta una lista de las características del fármaco ideal para una buena absorción transdérmica y en la tabla 4 se presenta la capacidad de penetración de algunas sustancias que pueden estar incluidas dentro de una formulación para administración transdérmica.

Tabla 3. Características de fármaco para la liberación transdermal (Naik *et al.*, 2000).

LÍMITES IDEALES	
Coefficiente de partición	$10 < K_{ow} < 1000$
Peso molecular	$< 400 \text{ Da}$
Punto de fusión	$< 200^\circ\text{C}$
Dosis terapéutica	$< 10 \text{ mg dia}^{-1}$
pH de saturación de la solución acuosa	pH 5-9
Solubilidad acuosa	$> 1 \text{ mg/ml}$

Ko/w: Coeficiente de partición aceite-agua.

Tabla 4. Capacidad de penetración transdérmica (Kligman, 1984).

Compuestos	Grado de penetración
Polímeros de alto peso molecular y macromoléculas (proteínas y polisacáridos)	Pobre
Electrolitos solubles en agua (sodio, cloro)	Pobre
Sustancias solubles en agua (glucosa, urea)	Pobre
Sustancias liposolubles	Buena
Sustancias liposolubles, no polares, bajo peso molecular	Excelente

### 2.3.1 Fundamento de la absorción transdérmica

Para que ocurra la absorción o permeación percutánea de un fármaco, éste debe absorberse primeramente en el estrato córneo, luego debe difundir a través de la epidermis viable para poder acceder finalmente a la circulación sistémica ver figura 6. Por lo que la liberación de agentes terapéuticos desde una formulación aplicada en la superficie de la piel y transportados al sistema circulatorio, es un proceso de múltiples pasos el cual involucra:

- a) Disolución y liberación del fármaco desde la formulación
- b) Partición del fármaco dentro de la capa más externa del estrato córneo
- c) Difusión del fármaco a través del estrato córneo, principalmente a través de una vía intercelular lipídica (paso limitante en la mayoría de compuestos)
- d) Partición del fármaco desde el estrato córneo hacia epidermis viable acuosa
- e) Difusión del fármaco a través de la epidermis viable y dentro de dermis superior
- f) Recepción dentro de la red capilar y eventualmente dentro de circulación sistémica (Kalia y Guy, 2001).

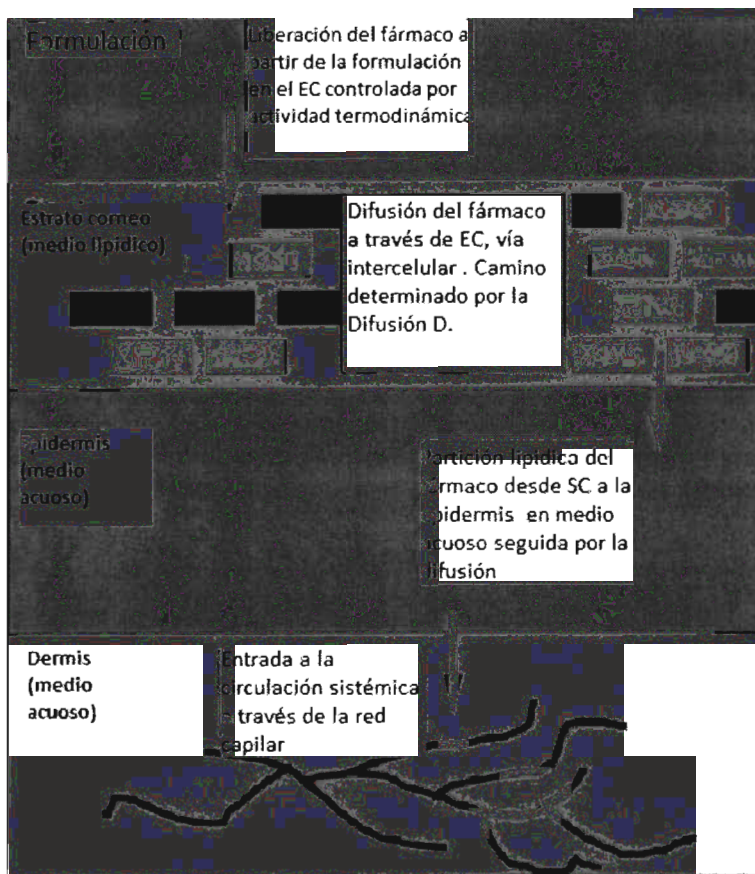


Figura 6. Representación esquemática de los procesos de transporte involucrados a partir de la liberación del fármaco desde la formulación hasta su absorción en la red capilar. (Kalia y Guy, 2001).

Por ser los capilares sanguíneos relativamente permeables y la circulación sistémica suficientemente rápida, para la mayoría de las sustancias la etapa limitante del proceso es la difusión del fármaco a través de la epidermis la cual se lleva a cabo por diferentes mecanismos:

### 2.3.2 Mecanismos de la absorción

En un principio, cuando un medicamento se deposita sobre la piel, entra en contacto con una capa epidérmica constituida por una mezcla de secreciones lipídicas (sebo) y acuosas (sudor). Una vez incorporado a esta capa superficial, el fármaco dispone de dos caminos generales para su penetración hacia los capilares sanguíneos, ya

sea difundiendo a través del estrato córneo (vía transepidérmica) o a través de los folículos pilosebáceos y glándulas sudoríparas (vía transapendicular) (Figura 7). La vía transepidérmica es la más importante, ya que la vía poros es de escaso volumen, representa menos del 0,1 % de la superficie cutánea y admite la difusión de pocos tipos de sustancias aunque recientemente se demostró que la vía folicular también constituye una importante ruta para la administración de fármacos. El aparato folicular del cabello, las glándulas sudoríparas y microlesiones se han introducido como vías de penetración percutánea (Trommer y Neubert, 2006). El paso transfolicular es capaz de conducir a las moléculas activas hasta la dermis reticular. Se ha demostrado que esta vía es mucho más frecuente de lo que se suponía con anterioridad. Sin embargo, cuenta con numerosas dificultades, en particular las glándulas sebáceas, que tienen tendencia a captar las sustancias lipofílicas y el flujo de sebo que va del interior al exterior, lo que evita la introducción de sustancias exógenas.

Aunque el paso a través del canal sudoríparo de las glándulas eccrinas es teóricamente posible, raramente se pone de manifiesto (Trommer y Neubert, 2006).

La ruta transepidérmica se divide en las rutas transcelular e intercelular. La vía intracelular o transcelular se da a través de los queratinocitos y la vía intercelular a través de los intersticios celulares (Degim, 2006).

Un paso transcelular directo, puede ser emprendido sobre todo por las moléculas de pequeño tamaño. Es la ruta más directa donde el fármaco tiene que atravesar la piel directamente pasando a través de las estructuras de los lípidos del estrato córneo y los corneocitos compuestos por una matriz densa de queratina. Esta es la ruta más corta para el fármaco, pero presenta una importante resistencia a la penetración, por la necesidad de cruzar ambas estructuras: lipofílicas e hidrofílicas.

La vía intercelular puede ser una alternativa importante para la penetración; para las moléculas polares, la vía dominante residiría en la fase acuosa de los espacios intercelulares, y para moléculas no polares, en las regiones hidrofóbicas de las cadenas lipídicas intercelulares (Figura 7). Para la mayoría de compuestos de polaridad intermedia en el proceso global de penetración pueden participar las



diferentes vías y el carácter predominante de alguna de ellas estará regido por diversos factores. A fin de que una sustancia penetre a través de las capas profundas de la epidermis para alcanzar los capilares dérmicos y ser absorbida sistémicamente debe tener una polaridad y un tamaño adecuados, no debería unirse a las proteínas cutáneas y ser relativamente estable (Barry, 2001).

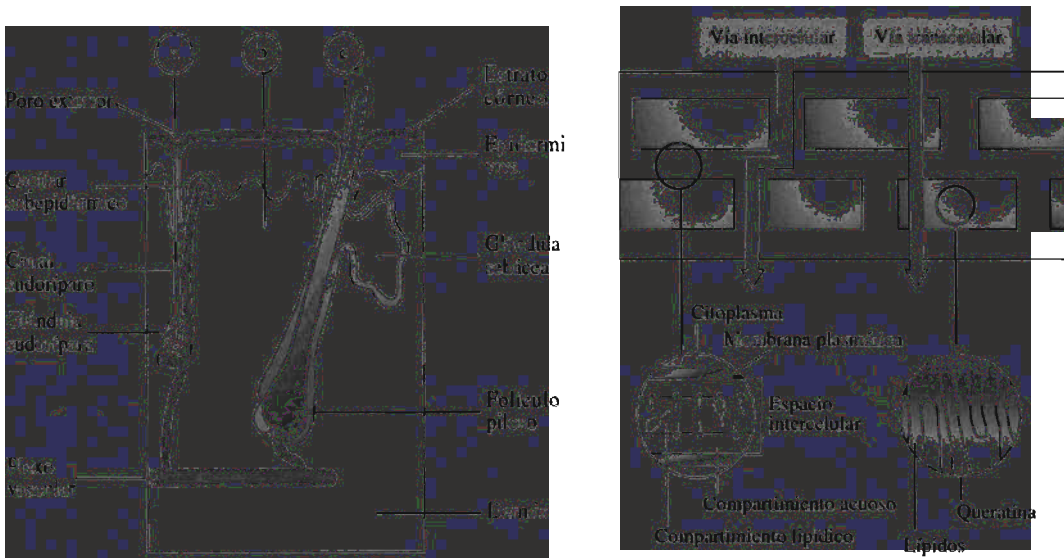


Figura 7. Representación de las principales vías de absorción percutánea: a) sudorípara; b) transepidérmica, y c) pilo sebácea (Diez y Domínguez, 1990).

Durante mucho tiempo se pensó que esta vía estaba reservada para las moléculas de tipo hidrofílico, porque el estrato córneo estaba suficientemente hidratado, aunque casi siempre de forma artificial a través de formulaciones oclusivas (p. ej., parches oclusivos, capas impermeables, vaselina). Los corneosomas también pueden intervenir en esta vía, ya que funcionan como puentes entre células y pueden por su naturaleza proteica volverse insuficientemente anfifílicas, abriendo la posibilidad de que por esta vía penetren moléculas de tipo lipófilo en mayor o menor grado.

La absorción transdérmica es un fenómeno de difusión pasiva. Las moléculas deben atravesar primero la barrera cutánea de naturaleza lipídica, después difundir en las diferentes capas de la epidermis totalmente hidratadas, y seguidamente continuar

con la difusión en la dermis igualmente hidrófila. Es a este nivel cuando entran en contacto con el sistema vascular capilar que se encarga de reabsorber una parte, que pasa a circulación general, para llevar una acción sistémica.

El estudio de la cinética de difusión de una molécula a través de la piel muestra que el flujo de difusión solo es constante después de un tiempo de latencia, variable de una sustancia a otra. La curva se vuelve lineal hasta alcanzar un estado de equilibrio. La difusión de una sustancia a través de una membrana semi-permeable es proporcional a la diferencia de concentración a ambos lados de la membrana.

Cuando se administra un fármaco a través de la piel utilizando sistemas de liberación transdérmicos, existe una gran diferencia entre la concentración de éste en el preparado farmacéutico y en el organismo; y como el sistema busca llegar al equilibrio, se produce un flujo de fármaco hacia el interior del cuerpo. Este flujo también está influenciado por otros parámetros dependientes del fármaco, como por ejemplo, el peso molecular, a mayor peso molecular menor difusión y el coeficiente de partición, que nos permite conocer la afinidad de una sustancia por el tejido epidérmico (Kneep *et al.*, 1987).

La tasa de transporte de fármacos a través del estrato córneo sigue la ley de difusión de Fick:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{D \cdot \Delta C \cdot K}{h}$$

Donde  $dM/dt$  es la cantidad permeada por unidad de tiempo a través del estrato córneo,  $D$  es el coeficiente de difusión,  $\Delta C$  es el gradiente de concentración a través del estrato córneo,  $K$  es el coeficiente de partición del fármaco entre la piel y la formulación,  $h$  es el espesor de la capa córnea

Si existen condiciones sink, entonces de la formula anterior se puede deducir

$$Kp = \frac{DK}{h}$$

Donde  $Kp$  es el coeficiente de permeabilidad.

Se deduce que:

- Cuando más concentrada esté la formulación que se aplica sobre la piel mayor es la difusión. Cuando se consigue la saturación del vehículo la actividad termodinámica es máxima.
- El coeficiente de permeabilidad  $K_p$  expresa la velocidad de difusión la cual está dada por el cociente de la cantidad de soluto transferido por unidad de área entre tiempo y concentración. La  $K_p$  no depende de la concentración sino únicamente de las características del soluto y de la membrana. Es inversamente proporcional al espesor de la membrana cuando más gruesa sea la membrana menor es el valor de  $K_p$ .
- El coeficiente de partición  $K$  corresponde al coeficiente de solubilidad de la sustancia en el estrato córneo y en la formulación. Un valor elevado de  $K_m$  indica una afinidad importante por la capa cornea. Puesto que no es posible determinar el valor real, se obtiene un valor aproximado utilizando el coeficiente de partición octanol/agua.
- El coeficiente de difusión  $D$  indica la movilidad de la sustancia que difunde a través del estrato córneo. Cuando mayor es la complejidad de la sustancia (gran tamaño, peso molecular elevado), menor difusión. Su valor generalmente se encuentra cercano a  $10^{-9}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  en el estrato córneo  $10^{-6}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ , en la epidermis y en la dermis, lo que indica que la capa cornea es 1000 veces más impermeable que las capas subyacentes (Martini, 2005)

La tasa de transporte del fármaco no sólo depende de su solubilidad en agua, pero también es directamente proporcional a su coeficiente de partición aceite / agua, su concentración en la formulación, y la superficie de la piel a la que se expone; es inversamente proporcional al espesor del estrato córneo (Mehta, 2004).

La velocidad de absorción transdérmica se relaciona con varios procesos que pueden ocurrir simultáneamente:

- Difusión de la molécula activa en el vehículo
- Liberación de la molécula del vehículo
- Cambio de la actividad termodinámica en la superficie de la piel

- Cambio de la tasa de hidratación de la piel
- Difusión de la molécula en el estrato córneo
- Difusión de la molécula en las otras capas de la piel

Por ser el estrato córneo una barrera predominantemente lipofílica, es particularmente impermeable a fármacos hidrofílicos y permite la liberación de un pequeño número de compuestos (Guy, 1996).

El transporte de moléculas de fármacos lipofílicos se ve facilitado por su disolución en los lípidos intercelulares alrededor de las células del estrato córneo. La absorción de moléculas hidrofílicas en la piel puede ocurrir a través de "poros" o aberturas de los folículos pilosos y glándulas sebáceas, pero la superficie relativa de estas aberturas es apenas el 1% de la superficie total de la piel. Esta pequeña superficie limita la cantidad de fármaco absorbido por esta vía (Mehta, 2004).

La estructura intracelular de la queratina que contiene el estrato córneo y el grado de hidratación que posee, tienen una importante función en el proceso de absorción percutánea. Una baja absorción percutánea puede explicarse cuando existen altos contenidos de queratina y bajas proporciones de agua. Un estrato córneo totalmente hidratado es capaz de absorber entre 5 y 6 veces de su peso en agua.

Si un fármaco quiere ser administrado incluido en una formulación de uso transdérmico convencional, debe ser muy potente, ya que el flujo de fármaco hacia la circulación sistémica suele ser bajo y es necesario que éste ejerza un efecto terapéutico a bajas dosis. Son buenos candidatos para esta vía de administración, fármacos que tienen una ventana terapéutica estrecha, que son extensamente metabolizados por mecanismos de primer paso hepático, que son degradados en el tracto gastrointestinal y/o que poseen una vida media corta (Naik *et al.*, 2000).

Por otro lado, es importante considerar las razones prácticas, cosméticas y económicas, a la hora de formular un principio activo por vía transdérmica. Se ha demostrado que el dispositivo transdérmico que contiene el fármaco, no debe sobrepasar los 50 cm<sup>2</sup>, lo que limita la cantidad de principio activo que puede



incluirse en el parche. Se reporta que no pueden liberarse más de 50 mg de fármaco por día en forma transdérmica (Guy, 1996).

### **2.3.3 Factores que afectan la permeabilidad de la piel**

Para lograr una acción terapéutica se busca aumentar la absorción transcutánea, mientras que en el caso de las acciones cosméticas se busca disminuirla o anularla. En cualquier caso, para poder predecir la permeación de una sustancia a través de la piel, se deben considerar varios factores. Es necesario saber que la absorción percutánea depende de:

- Factores dependientes de las condiciones fisiológicas y patológicas de la piel.
- La naturaleza fisicoquímica de la molécula aplicada.
- El vehículo.

#### *Factores dependientes de las condiciones fisiológicas y patológicas de la piel*

- Composición lipídica de la superficie de la piel:

La capa lipídica que existe en la superficie de la piel, que está formada por los productos de excreción de las glándulas sebáceas, contiene agentes emulsificantes que impiden la entrada de sustancias exógenas a través del estrato córneo.

- Hidratación de la piel:

La permeabilidad de una sustancia, aumenta con el grado de hidratación de la piel. La concentración acuosa crítica se considera del 10 %, encontrándose aumentada en las pieles jóvenes a un 13 % y disminuida en las pieles envejecidas, a un 7 %. La disminución de la humectación de la piel puede deberse a factores extrínsecos, como son los factores ambientales y climáticos (rayos UV, temperatura, humedad, viento) y al uso de jabones y detergentes sintéticos; o bien, a factores intrínsecos como son las alteraciones del metabolismo (estados carenciales, anemias, uso de medicamentos diuréticos, etc.).

- Temperatura de la piel:

Un aumento en la temperatura produce un incremento en la permeabilidad de la piel ya que disminuye la energía requerida para la difusión y aumenta la solubilidad del fármaco. Un aumento de este parámetro también provoca un incremento en la vasodilatación lo que también contribuye a un aumento en la absorción percutánea.

- Variación regional en la composición de la piel:

La permeabilidad al agua, y por lo tanto a otras sustancias, no es constante en todo el organismo, siendo específica para cada zona cutánea.

Para facilitar la penetración hay que disminuir o anular la eficacia de la barrera cutánea:

- Eliminado la capa hidrolipídica por decapaje con ayuda de detergentes o de disolventes.
- Hidratando la piel con la ayuda de los parches oclusivos (utilización de fragmentos de tejido adhesivo de forma generalmente circular que incluyen en su centro un fragmento de un material poroso, que tienen una solución).
- Empleando promotores de la absorción en particular los alcoholes o los glicerolés que aseguran una disociación de las células córneas y una cierta disolución del cemento lipídico intercelular.
- Aumentar la circulación cutánea mediante el empleo de vasodilatadores (i.e nicotinato de metilo). Esta práctica tiende a aumentar la resorción por el sistema capilar de la dermis y, en consecuencia, tiene riesgo de provocar más fácilmente una acción sistémica.

La penetración cutánea puede estar involuntariamente aumentada en el caso de estados patológicos que incrementan la permeabilidad cutánea:

- Los fenómenos inflamatorios
- La psoriasis
- Las lesiones cutáneas por raspaduras
- Las dermatosis en general

Las heridas producen una discontinuidad en el estrato córneo lo que lleva a un incremento de la permeabilidad de las zonas afectadas. Las heridas químicas, producidas por ácidos fuertes, bases fuertes o gases, provocan el mismo efecto.

#### *Factores dependientes de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias*

- El tamaño de la molécula es uno de los principales factores que influyen en la penetración cutánea, la penetración es tanto más difícil cuanto más elevado sea el peso molecular (500-1000 Da).
- La forma de la molécula también influye. Las moléculas largas lineales ramificadas en mayor o menor medida tienen menos facilidad para introducirse entre las células corneas que las moléculas de forma redondeada.
- La naturaleza química es muy importante. Las sustancias lipofílicas se acumulan en el cemento intercelular y se separan con dificultad de un vehículo lipídico. Las sustancias hidrófilas solo pueden atravesar la piel cuando está hidratada al máximo. Además, tienen tendencia a permanecer en los vehículos acuosos, salvo si estos últimos se evaporan.

Las moléculas más aptas para penetrar son, por tanto, las anfifílicas. Por ello los tensoactivos tendrán una gran influencia en la penetración cutánea, no sólo porque desestructuran de alguna manera el cemento intercelular, sino porque la absorción de las propias moléculas tensoactivas no es despreciable.

- Coeficiente de partición: El coeficiente de partición aceite/agua del fármaco determina su permeabilidad específica ya que existe una dependencia lineal entre este coeficiente y la permeabilidad transdérmica. Se espera un aumento del coeficiente de permeabilidad del fármaco con un aumento de la lipofilia de éste. Un coeficiente de partición lípido/agua 1 o mayor que 1 generalmente se considera óptimo. Sin embargo, un determinado valor de coeficiente de partición puede ser modificado por medio de cambios en un grupo funcional de la molécula, sin que esto afecte la actividad terapéutica del fármaco; o por medio de modificaciones en el vehículo en que éste se administre.

- Condiciones de pH: El pH de la superficie de la piel y del sistema de liberación del fármaco afectan la extensión de la disociación del fármaco y por lo tanto, su grado de permeabilidad transdérmica.
- Concentración de la sustancia: Como el proceso de permeabilidad a través de la piel ocurre principalmente por difusión pasiva, depende de la concentración de la sustancia en la superficie de la piel.

### *Factores dependientes de las propiedades fisicoquímicas de los sistemas de liberación (Vehículo)*

Los vehículos por si mismos tienen pocas posibilidades de penetración pero pueden facilitar la penetración de las sustancias activas. Por ello es difícil determinar de forma absoluta el porcentaje de absorción de una molécula, ya que depende inevitablemente de la naturaleza del vehículo en el que está incluida (Martini, 2005).

Composición del vehículo: El vehículo tiene el objetivo principal de modificar la capacidad de penetración de los principios activos a través de la barrera cutánea. Los excipientes también pueden ser de naturaleza hidrófila como en el caso de los geles que tienen un efecto filmógeno en la piel tras la evaporación del agua. Estos geles se acompañan con frecuencia de polímeros de naturaleza catiónica. Se fijan sobre las cargas negativas de la queratina, constituyendo así una barrera suplementaria en la superficie de la capa cornea.

Características del sistema de liberación: El flujo de fármaco a través de la piel estará condicionado a la forma en que éste se encuentre (disuelto o suspendido). También es importante tener en cuenta el coeficiente de partición interfacial del fármaco entre el sistema de liberación y la piel, el pH del vehículo y la capacidad de reservorio de la forma farmacéutica.

Composición del sistema de liberación: Este parámetro no sólo afecta el tiempo de liberación del fármaco sino que también afecta la permeabilidad del estrato córneo,

modificando por ejemplo, su grado de hidratación. La penetración de ciertos fármacos a través de la piel puede facilitarse por medio de la incorporación de ciertas sustancias, como por ejemplo mediante el empleo de promotores de la absorción

## 2.4 PROMOTORES DE ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA

Como ya se ha mencionado, el estrato córneo (SC) está constituido por células muertas llamada corneocitos los cuales forman una barrera de alta tortuosidad "ladrillos y cemento" que dificulta el pasaje de moléculas, independientemente de su tipo. Por lo que el SC representa el blanco primario de todos los métodos utilizados para mejorar la penetración transdérmica de fármacos.

Existen fármacos no apropiados para la aplicación transdérmica. Esto puede ser consecuencia de (i) sus características fisicoquímicas (excesivo tamaño, excesiva carga eléctrica, insuficiente solubilidad, tendencia a causar irritación directa, etc.) o (ii) sus características cinético/dinámicas (biotransformación cutánea, alta extracción en sangre o baja potencia) (Riviere y Papich, 2001). En los últimos años se han desarrollado diversas estrategias tecnológicas con el objetivo de mejorar la capacidad de penetración de los fármacos. Estas estrategias pueden ser de tipo químico (mejoradores de la penetración) o físico (iontoforesis, ultrasonido y microagujas) (Figura 8). Aun cuando existe un gran número de sustancias con características apropiadas para mejorar la penetración de fármacos, son muy pocas las que inducen un mejoramiento significativo *in vivo* de la penetración transdérmica, el cual se refleje en las concentraciones sistémicas y/o locales del principio activo (Mitragotri, 2004). Otra característica que reduce el número de fármacos aptos para uso *in vivo* es la irritación cutánea que estos compuestos provocan a las dosis efectivas para incrementar el paso del fármacos a través del estrato córneo.

Sin embargo, el mejoramiento de la penetración es un objetivo difícil de alcanzar, debido a la alta velocidad de restitución que posee el estrato córneo. Las estrategias más comúnmente aplicadas para modificar el estrato córneo se basan en: (a) remoción de lípidos aplicando solventes orgánicos (lo que conduce a una gran pérdida de agua) y (b) remoción de corneocitos y lípidos (*tape stripping*).

Ambas estrategias inducen cambios como la síntesis de citocinas lo que inicia una respuesta metabólica de las células nucleadas de la epidermis, conduciendo a una restitución de la barrera lipídica y restauración de la impermeabilidad. Existen técnicas no invasivas que permiten monitorizar el tiempo de la respuesta de reparación de esta barrera, como el método de pérdida de agua transepidérmica (TEWL por sus siglas en inglés) (Riviere y Papich, 2001).

Algunas de las propiedades ideales para los promotores son los siguientes (Barry, 2001):

- No tóxico, no irritante ni alergénico
- Rápida acción con actividad y duración del efecto predecible y reproducible
- Sin efecto farmacológico dentro del organismo
- Efecto unidireccional
- Efecto reversible
- Compatible con excipientes y fármacos en diferentes formulaciones

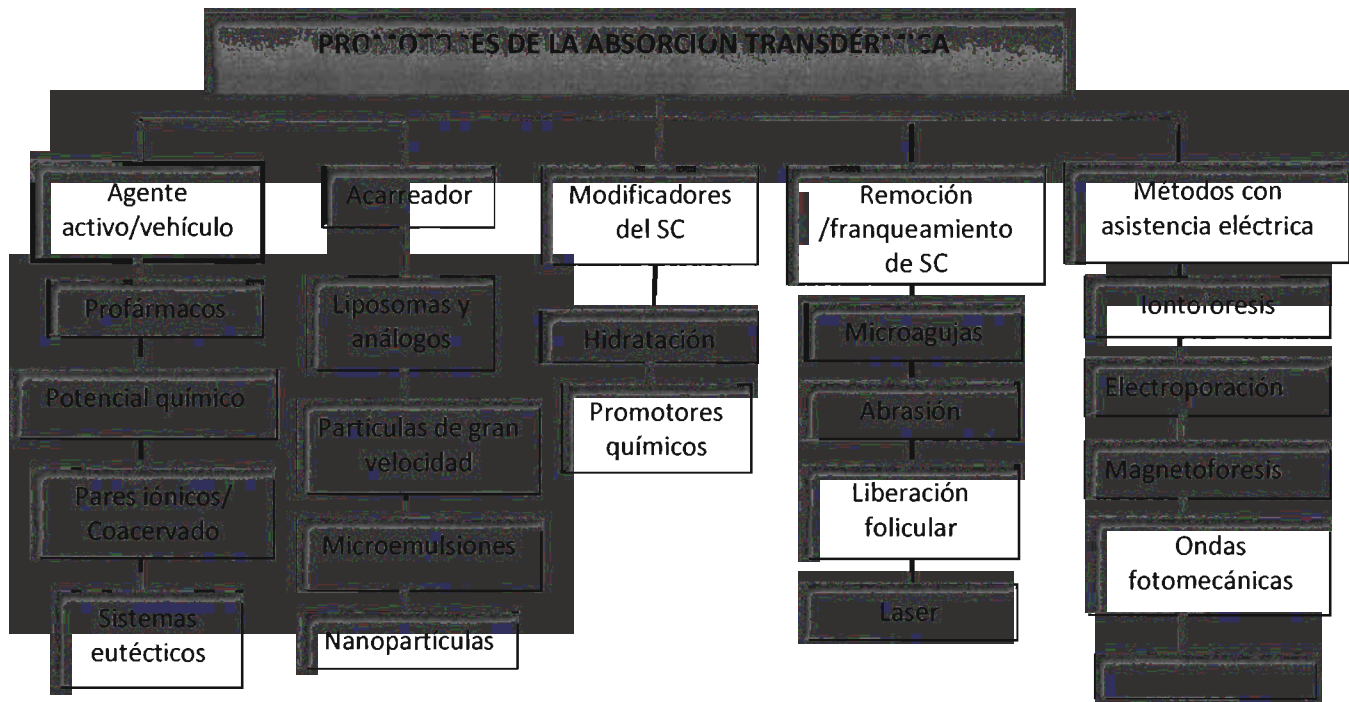


Figura 8. Algunos métodos para la optimización de la penetración transdermal de fármacos (modificada de Barry, 2001).

### **2.4.1 Acarreadores**

Se conoce como acarreador o vector a aquellos sistemas en que el fármaco se encuentra encapsulado, disperso o adsorbido y cumple con diversas funciones como proteger al fármaco del medio biológico, favorecer el transporte o distribución hacia distintos órganos o tejidos y lograr una liberación prolongada o controlada del principio activo. Los acarreadores pueden dividirse en tres tipos: Vesiculares (liposomas, transfersomas); Moleculares (ciclodextrinas, dendrímeros y micelas) y Particulares (micropartículas).

En los últimos años, los sistemas vesiculares han sido promovidos como un medio para la liberación sostenida o controlada de fármacos, debido a sus ventajas, como, falta de toxicidad, biodegradación, la capacidad de encapsular moléculas tanto hidrófilas como lipófilas, la capacidad de prolongar la existencia del fármaco en la circulación sistémica mediante encapsulación en estructuras vesiculares, la capacidad de dirigirse a los órganos y tejidos, la capacidad de la reducción de la toxicidad del fármaco y aumentar su biodisponibilidad (Dinu *et al.*, 2010).

Los sistemas vesiculares se pueden clasificar en dos categorías: Vesículas rígidas: liposomas y niosomas y vesículas elásticas o ultradeformables: Transferosomas y etosomas.

#### **2.4.1.1 Liposomas**

Los liposomas fueron descubiertos en el año 1965 por Bangham y colaboradores (Bangham *et al.*, 1965), quienes constataron que ciertos lípidos pueden formar estructuras membranosas artificiales cuando están en presencia de un exceso de agua. Estas estructuras vesiculares, altamente organizadas, están constituidas por una pared formada por láminas o bicapas lipídicas concéntricas que están separadas por un número igual de espacios de contenido acuoso (Figura 9)



Las características más relevantes de estas vesículas lipídicas son:

- Presentan una pared integrada por moléculas fosfolípicas constituyendo una doble capa.
- Estos fosfolípidos están orientados de forma que el polo hidrofílico se sitúa hacia el agua y el polo lipofílico mirando al interior de la pared.
- El compartimiento central lo ocupa el agua
- Las sustancia hidrofílica ocupa el compartimiento acuoso, mientras que las lipofílicas se sitúan entre los fosfolípidos de la pared y las anfifílicas se unen a las bicapas por su resto lipófilo

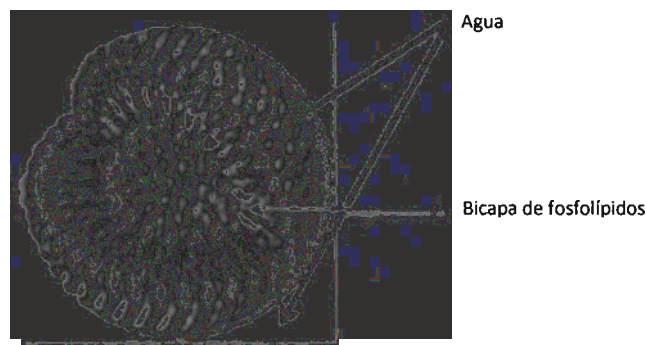


Figura 9. Esquema de liposomas (Imagen tomada, de <http://www.infinitefractal.com>)

Estos vectores poseen una forma, estructura y tamaño diversos, aunque sus dimensiones oscilan entre  $0.01 \mu\text{m}$  y  $10 \mu\text{m}$ . Visualizados por microscopía electrónica presentan forma esferoide, observándose una sucesión de bandas claras y oscuras, debido a la alternancia entre capas lipídicas y acuosas. Dada su constitución, tienen la capacidad de captar una gran variedad de sustancias activas hidrosolubles, liposolubles o anfifílicas (Couvreur *et al.*, 1980).

Para su elaboración, habitualmente se utilizan fosfolípidos, con o sin la incorporación de colesterol o de otros materiales, introducidos en la pared de los liposomas con el fin de dotar a las vesículas de alguna propiedad particular (ej.: carga superficial). Inicialmente estas vesículas se utilizaron como modelo de membranas biológicas,



dada la similitud que presentan con ellas, pero muy pronto teniendo en cuenta su versatilidad estructural, así como su carácter biodegradable y biocompatible, se planteó su utilización en la liberación de fármacos siendo espectacular el número de trabajos publicados sobre la utilización de liposomas en este campo desde que, al principio de los años 70, Gregoriadis inició el estudio sobre el potencial que presentan como sistemas de liberación de fármacos y otras moléculas bioactivas (Perrie, 2008).

La versatilidad de los liposomas se refleja en primer lugar, en el hecho de que son capaces de incorporar a su estructura moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y también de carácter anfifílico. (Fenske *et al.*, 2008) Además, sus propiedades físicas como la carga superficial, el tamaño, la permeabilidad/rigidez de la pared o su capacidad de carga; pueden ser fácilmente modulables. Por último, utilizando lípidos funcionales, se pueden unir anticuerpos u otros ligandos a la superficie de estas vesículas, que se convierten en sistemas de transporte con capacidad para acceder por ejemplo, específicamente a un determinado tejido/célula tumoral (*site-specific targeting*), de una forma bastante parecida a la que es de suponer había previsto Paul Ehrlich cuando introdujo el concepto de *bala mágica*.

A pesar de todas estas ventajas, es indudable que los liposomas también tienen limitaciones en cuanto a su utilización como sistemas de liberación, lo que sin duda explica que todavía no sea muy importante el número de formulaciones aprobadas y comercializadas para su uso en humanos. Entre estas limitaciones destaca el medio gastrointestinal que es desfavorable para los liposomas, lo que limita las posibilidades para que puedan ser administrados por vía oral, excepto que se introduzca alguna modificación sobre la estructura vesicular clásica (por ej. el recubrimiento de su superficie con un polímero adecuado), que permita superar este comportamiento inapropiado. Como consecuencia, la mayor parte de los trabajos publicados se refieren a su utilización por vías de administración parenterales, como la intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal, además de un grupo importante dedicado a explorar el interés que pueden tener como vehículos para la administración tópica cutánea y para la administración transdérmica. Más

recientemente, la posibilidad de administrar liposomas en forma de aerosol por vía pulmonar ha sido objeto de estudio, no sólo para el tratamiento de enfermedades que cursan a nivel pulmonar (p. ej. asma, fibrosis quística o tuberculosis), sino también para la administración de fármacos que actúen a nivel sistémico.

### Clasificación de Liposomas

La nomenclatura va a depender del tamaño y el número de bicapas o láminas que conforman la pared de la estructura vesicular (Tabla 5). Y otra alternativa podría ser referirse a ello haciendo alusión al procedimiento por el que han sido obtenidos (Tabla 6).

Tabla 5. Clasificación y nomenclatura de liposomas en función del tamaño y lamelaridad.

Abreviatura (siglas en inglés)	Lamellaridad	Tamaño
MLV	Vesículas multilaminares	>0.5 µm
OLV	Vesículas oligolaminares	0.1 – 1 µm
UV	Vesículas unilaminares	Todos los rangos de tamaños
SUV	Vesículas unilaminares pequeñas	40 – 100 nm
LUV	Vesículas unilaminares grandes	>400 nm
GUV	Vesículas unilaminares gigantes	>1 µm
MUV	Vesículas multivesiculares	>1 µm

Tabla 6. Clasificación y nomenclatura de liposomas en función del método de preparación.

<b>Abreviatura (siglas en inglés)</b>	<b>Método de preparación</b>
<b>REV</b>	Vesículas uni u oligolaminares obtenidas por evaporación reversa
<b>MLV-REV</b>	Vesículas multilaminares obtenidas por evaporación en fase reversa
<b>SPLV</b>	Vesículas estables plurilaminares por evaporación de fase reversa
<b>FAT MLV</b>	Vesículas multilaminares obtenidas por ciclos repetidos de congelación/descongelación
<b>VET</b>	Vesículas obtenidas por extracción
<b>LUVET</b>	Vesículas unilaminares grandes obtenidas por extracción
<b>DRV</b>	Vesículas obtenidas por deshidratación/hidratación

### **Métodos de producción de liposomas**

La importancia en la elección del método de fabricación de liposomas más adecuado para el desarrollo de un producto liposomal determinado, comienza en la fase experimental del mismo, ya que para el éxito del proyecto, no solo es importante formular un buen preparado con una buena actividad y estabilidad, sino que también debe ser reproducibles.

Los liposomas se pueden obtener aplicando distintas metodologías, que conducen a la formación de vesículas con características diferentes en función del procedimiento aplicado (tamaño y distribución de tamaños, lamellaridad, eficacia de asociación), lo que sugiere que diversos mecanismos pueden estar implicados en este proceso de formación. El componente mayoritario de esta estructura son lípidos (en particular fosfolípidos) que cuando se encuentran en un medio acuoso a una temperatura próxima a su temperatura de transición de fase, tienen la capacidad de formar estas estructuras vesiculares, incluso de manera espontánea. Si la situación de partida es un film lipídico que se hidrata con una solución acuosa mediante agitación mecánica,

entonces lo que se obtiene son vesículas multilaminares de tamaño relativamente grande y heterogéneo, siendo éste además el primer procedimiento de fabricación propuesto, también el más sencillo y el más popular.

Partiendo de estas vesículas multilaminares y aplicando ultrasonidos, se pueden obtener liposomas unilaminares de tamaño pequeño, tal y como propusieron por primera vez en 1962 Saunders y colaboradores.

Para controlar el diámetro de la vesícula, la lamellaridad y también la homogeneidad del tamaño de los MLV obtenidos por hidratación de una película de fosfolípidos, es posible aplicar un procedimiento de extrusión a la suspensión heterogénea de vesículas MLV, que consiste en hacerlas pasar a través de filtros de membrana de policarbonato con un tamaño de poro determinado. El número de veces que se repita esta operación, así como el diámetro de poro utilizado para llevarla a cabo, determina la lamellaridad y la dispersión de tamaños de los liposomas.

La formación de la película de lípidos que representa la primera etapa de la preparación de liposomas MLV en todos los casos anteriormente citados, requiere el uso de importantes cantidades de disolventes orgánicos que plantean importantes problemas de toxicidad ya que pueden comprometer la seguridad del producto final, además de suponer un inconveniente serio para la obtención de liposomas a nivel industrial, dado el impacto medio ambiental que supone el empleo de disolventes. Como consecuencia, se han propuesto procedimientos alternativos que requieren el uso de disolventes menos tóxicos, como el etanol, en los que la formación de los liposomas se produce por la inyección de una solución etanólica de lípidos en un medio acuoso de volumen considerablemente mayor. De esta manera los liposomas se forman espontáneamente, pudiendo controlarse mínimamente sus características (tamaño, lamellaridad) a través de la relación de volúmenes de etanol/agua, la velocidad de inyección o la concentración inicial de lípidos utilizada.

El etanol utilizado se puede eliminar fácilmente, por ejemplo por diálisis, si bien lo que limita en la práctica la utilización de este procedimiento es la posible inactivación de muchas biomoléculas en presencia del etanol.

Al final de la década de los 70, Szoka y Papahadjopoulos desarrollaron un procedimiento de preparación de liposomas al que denominaron de evaporación en fase reversa, mediante el cual se pueden obtener vesículas con un espacio central acuoso mucho más voluminoso. En este método se parte de una disolución de los fosfolípidos en éter etílico que se mezcla con una fase acuosa en una relación de volúmenes 1:3 (fase orgánica/fase acuosa). Esta mezcla se emulsifica por sonicación obteniéndose una suspensión de micelas invertidas. A continuación se elimina el éter a presión reducida (300 mm Hg), produciéndose al mismo tiempo una agregación de dichas micelas que conduce a la formación de una estructura tipo gel, la cual finalmente acaba por romperse cuando se sigue incrementando el grado de vacío aplicado (700 mm Hg) para lograr la completa eliminación del disolvente orgánico. En todo este proceso las monocapas lipídicas que constituyen las micelas se sitúan lo suficientemente cerca unas de otras, como para dar lugar a las bicapas lipídicas que constituyen la pared de los liposomas. Las vesículas formadas de esta manera son de tipo uni u oligolaminar, con un tamaño de 500 nm aunque bastante heterogéneo.

La fuerza iónica de la solución acuosa determina la capacidad de encapsulación que van a tener las vesículas, la cual puede oscilar entre en 20 y el 65 % (a menor fuerza iónica mayor eficacia de encapsulación). Posteriormente, el mismo Szoka, propuso la extrusión secuencial de los liposomas obtenidos en fase reversa, como alternativa para reducir tanto el tamaño como la polidispersión, si bien la eficacia de encapsulación disminuye en relación a las vesículas sin extruir. Vesículas de tipo unilaminar pequeño se pueden obtener a partir de MLV por una técnica de microfluidificación, la cual consiste en producir colisiones entre los liposomas al hacerlos pasar rápidamente a presión, a través de filtros de membrana de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Este proceso se repite una serie de veces, de manera que se estima que después de 10 ciclos se pueden obtener SUV de tamaño inferior a 100 nm (Gregory, 2007).

La liofilización de vesículas SUV seguida de una fase de rehidratación se ha propuesto como un procedimiento sencillo para obtener liposomas con elevada capacidad de encapsulación. Este método ha sido recientemente modificado de

manera que es posible obtener liposomas de tamaño submicrométrico y con una dispersión muy estrecha, estériles y libres de pirógenos (Li y Deng, 2004).

Finalmente, es posible obtener liposomas por un procedimiento denominado de eliminación del detergente, a partir de micelas mixtas formadas por una combinación de fosfolípidos y un detergente que preferiblemente debe presentar una concentración crítica micelar crítica elevada y un bajo índice de agregación (p. ej. colato o desoxicolato sódico, octilglucósido o el Triton X-100). Para conseguir la eliminación del detergente que conduce a la formación de las vesículas, se puede acudir a una técnica de diálisis, aunque también es posible hacerlo mediante cromatografía de exclusión en gel o por un procedimiento de adsorción del detergente sobre partículas de resinas hidrofóbicas.

### MECANISMO DE INTERACCIÓN LIPOSOMA-CÉLULA

Investigaciones realizadas han permitido detectar cuatro formas diferentes de interacción entre los liposomas y las células, pudiendo actuar más de un mecanismo al mismo tiempo como se muestra en la Figura 10 (Clares, 2003).

A) Por adsorción estable de los liposomas a la superficie celular mediante fuerzas hidrófobas o electrostáticas débiles o mediante interacción inespecífica con componentes de la superficie celular.

B) Los liposomas pueden penetrar en la célula por endocitosis de las células fagocitadas del sistema retículo endotelial. Se desintegra por la acción de las enzimas celulares liberando el fármaco. Los liposomas quedan englobados en células con gran capacidad fagocitaria.

C) Puede haber una transferencia de lípidos de la bicapa liposomal a las membranas celulares o subcelulares, sin adsorción previa ni asociación del contenido liposomas.

D) Puede producirse una fusión directa de las membranas del liposoma con la membrana plasmática celular, mediante inserción del estrato lipídico del liposoma en la membrana plasmática, con la liberación simultánea del contenido, es decir por coalescencia, el fármaco pasa del liposoma al interior celular.

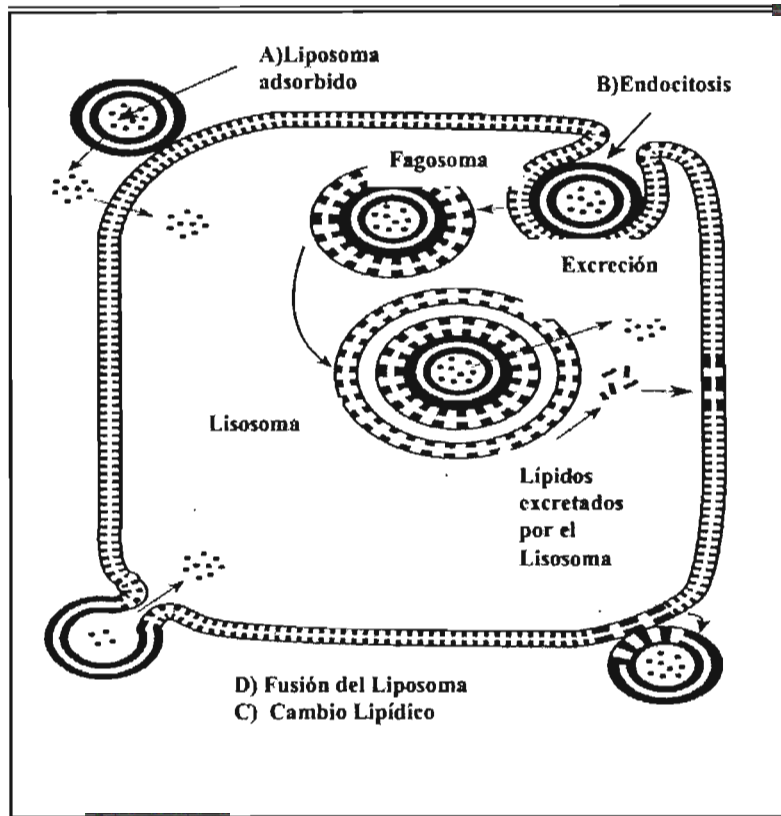


Figura 10. Mecanismo de Interacción (Clares, 2003).

#### 2.4.1.2. Transfersomas

Los Transfersomas son un tipo especial de liposomas, que contiene fosfatidilcolina y un activador de superficie que por lo general es un surfactante (Figura 11). El concepto de transfersomas fue introducido en 1992 por Cevc y colaboradores de trabajo. Estos transfersomas son varios órdenes de magnitud más elásticos que los liposomas estándar y por lo tanto son muy adecuados para la penetración en la piel e invadir la piel intacta y profundizar lo suficiente para ser absorbido a circulación sistémica (Dinu *et al.*, 2010).



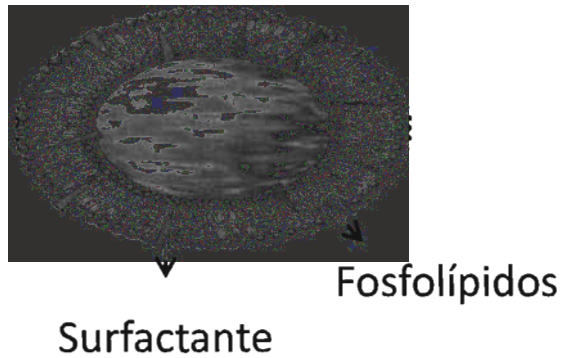


Figura 11. Esquema de liposomas elásticos (transfersomas).

### MECANISMO DE PENETRACIÓN DE LOS TRANSFERSOMAS

El mecanismo de penetración de los transfersomas es la generación de un "gradiente osmótico" debido a la evaporación de agua, mientras se aplica la suspensión de lípidos (transfersomas) sobre la superficie de la piel. Este gradiente osmótico se desarrolla debido a la barrera de penetración en la piel, evita la pérdida de agua a través de la piel y mantiene una diferencia de actividad de agua en la parte viable de la epidermis (75 % contenido de agua) y casi completamente seco en el estrato córneo, cerca de la superficie de la piel (15 % contenido de agua). Este gradiente es muy estable debido a la humedad relativa del ambiente. Todos los lípidos polares atraen un poco de agua, esto se debe a que existe una interacción energéticamente favorable entre los residuos hidrofílicos de las regiones lipídicas y su agua proximal. La mayoría de las bicapas lipídicas resisten una deshidratación inducida. En consecuencia, el lípido polar de las vesículas se mueven desde la superficie de la piel relativamente seca a los sitios con una concentración suficientemente alta de agua (Shivanand *et al.*, 2009).

El transporte de estas vesículas elásticas es por lo tanto independiente de la concentración. La hidratación transepidérmica proporciona la fuerza motriz para el transporte de las vesículas deformables a través del estrato córneo intacto y en la epidermis. Como las vesículas son elásticas, pueden pasar a través de los poros en el estrato córneo (aunque estos poros son menos de una décima parte del diámetro de las vesículas) (Figura 13D).



El uso de transfersomas en la administración de fármacos por consiguiente, depende de su capacidad para ampliar y superar los poros hidrofílicos en la piel. El transporte intracelular de los fármacos puede implicar la fusión de la bicapa de lípidos de las vesículas con la membrana de la célula, así como la endocitosis normal. El mecanismo es complejo y por lo tanto requiere de principios avanzados de la elasto-mecánica en combinación con el transporte de materiales y la hidratación / fuerza osmótica (Kulkarni *et al.*, 2011).

La suspensión de lípidos (transfersomas) tiende a escapar de la deshidratación moviéndose a lo largo de este gradiente sólo se puede lograr si éstos son suficientemente deformables para pasar a través de los poros estrechos en la piel. Los transfersomas compuestos de un surfactante adecuado poseen propiedades de hidratación responsables de su mayor deformabilidad; en cambio, los liposomas estándar se limitan a la superficie de la piel, donde se deshidratan y funden por completo, por lo que tienen menos poder de penetración que los transfersomas.

El proceso de penetración a través de la piel por la vesícula se atribuye a la alta deformabilidad de estas vesículas, como resultado del activador de superficie que contiene permitiendo la curvatura de la estructura (Figura 12). Esta reorganización reduce la energía necesaria para la deformación, siendo flexible y siguiendo el gradiente de hidratación transdérmico (Maghraby *et al.*, 2008).

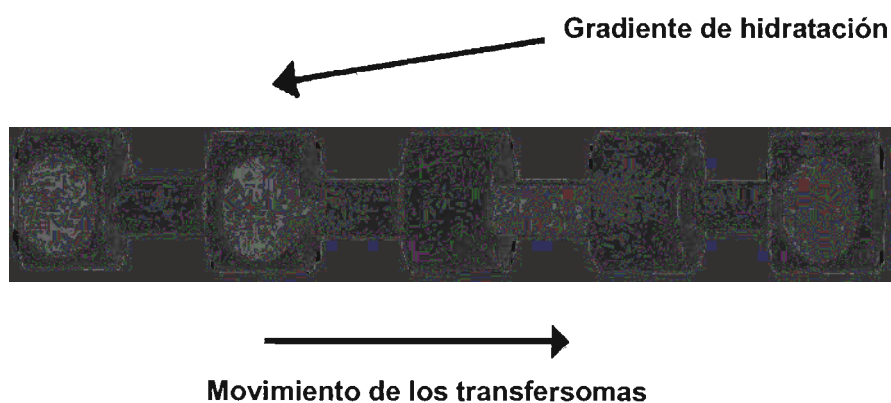


Figura. 12. Gradiente de Hidratación y movimiento impulsado por la deformabilidad de los Transfersomas a través de pequeños poros (Maghraby *et al.*, 2008).

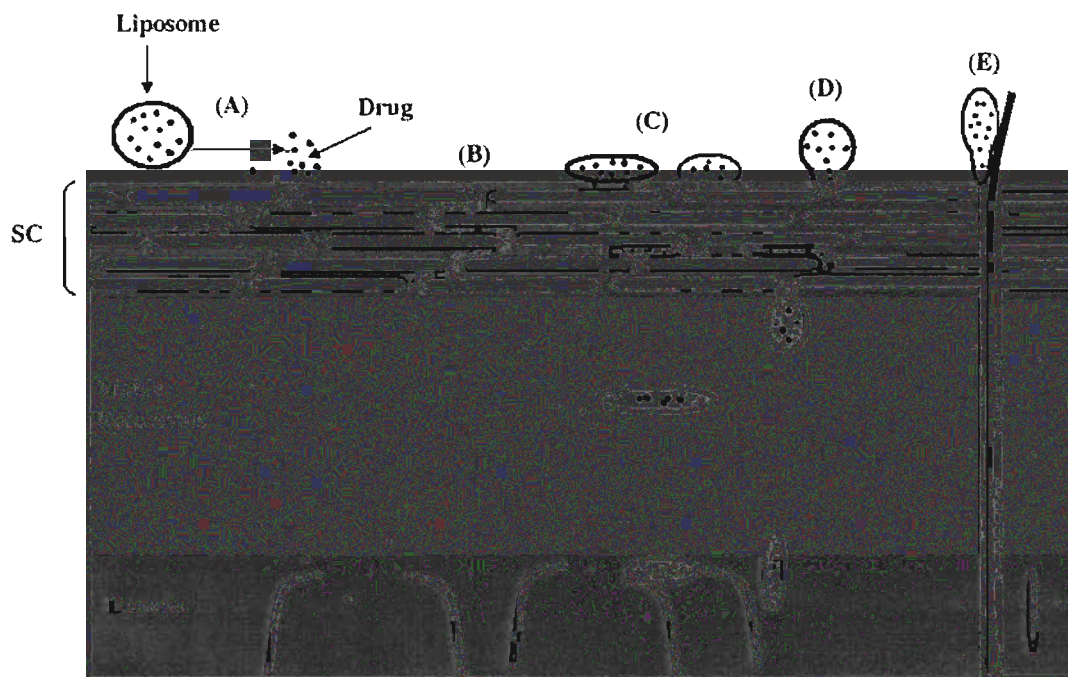


Figura 13. Los posibles mecanismos de acción de los liposomas como sistemas de suministro de fármacos en la piel. (A) mecanismo de fármaco libre, (B) potenciadores de la permeación por cambios de la estructura de lípidos intercelulares, (C) adsorción y / o fusión de la vesícula con el estrato córneo (SC), (D) penetración de la vesícula intacta dentro y a través de la piel intacta y (E) Penetración vía poros (Maghraby *et al.*, 2008).

#### 2.4.2 Microagujas

Las microagujas son sistemas transdérmicos que consisten de una matriz de proyecciones microestructuradas que contienen un fármaco en su superficie (microagujas recubiertas), incluidos en la matriz de la microaguja o bien que funcionan como un conducto a través del cual el fármaco puede ser conducido al interior de la piel (microagujas huecas). Las microagujas se aplican en la piel con el fin de facilitar la administración intradérmica de agentes activos, que de otro modo no sería capaz de cruzar el estrato córneo. El mecanismo para la entrega, sin embargo, no se basa en la difusión como en otros productos transdérmicos de suministro de fármacos. En su lugar, se basa en la interrupción temporal mecánica de la estructura organizada del tejido de la piel y en la liberación del fármaco dentro de la epidermis,

donde puede más fácilmente alcanzar la circulación sistémica. Las microagujas, en relación a las agujas tradicionales, se fabrican en escala micro. Por lo general son de una micra de diámetro y rango de 100 a 1000 micras de longitud. Las microagujas se han fabricado con diversos materiales tales como: metales (en microagujas sólidas de acero inoxidable, titanio y níquel-hierro), silicio, dióxido de silicio, polímeros (policarbonato, ácido poliláctico-glicólico, y carboximetilcelulosa), vidrio y otros materiales. Al ser mucho más pequeñas que las agujas hipodérmicas, no alcanzan las terminales nerviosas y por tanto, al insertarse en la piel, lo hacen de manera indolora, causando menos daño cuando perforan la piel, ofreciendo varias ventajas en comparación con las tecnologías convencionales de agujas (Roxhed, 2007).

Las microagujas pueden proveer un transporte efectivo de fármacos a través del espesor del estrato córneo (10 a 20  $\mu\text{m}$ ). Esto fue propuesto por primera vez en la década de 1970, pero el progreso se retrasó en gran parte debido a la falta de técnicas para fabricar estructuras tan pequeñas (Arora *et al.*, 2008). El primer trabajo sobre el uso de microagujas para administración transdérmica de fármacos se informó a finales de 1990 (Henry *et al.*, 1998).

La principal ventaja de las microagujas sobre las agujas tradicionales es su capacidad para traspasar el estrato córneo (principal barrera de permeabilidad) sin causar dolor. Las agujas convencionales, aunque sean capaces de superar esta capa de la piel y poder administrar eficazmente el medicamento, pueden ocasionar infecciones, si no se tienen las precauciones adecuadas y en general son dolorosas (Henry *et al.*, 1998).

## Tipos de microagujas y sus aplicaciones

Una clasificación para microagujas generalmente utilizada en la literatura se basa en el proceso de fabricación: en el plano o microagujas fuera de plano. Microagujas en el plano son fabricadas con el eje paralelo a la superficie del sustrato, la ventaja de esta disposición es que la longitud de la aguja puede ser controlada con mucha precisión. La desventaja es que es difícil de fabricar matrices bidimensionales. Las

microagujas fuera del plano sobresalen del sustrato y su fabricación es más sencilla. Por otro lado, el aspecto, y la relación longitud/diámetro, se convierten en retos importantes en la fabricación de este tipo de agujas (Roxhed, 2007).

Otro punto útil de distinción es si las microagujas son sólidas o huecas. Las agujas huecas permiten un transporte directo de la formulación a través de la microaguja. Estas microagujas eventualmente podrían ser utilizadas con parches de medicamentos para aumentar la tasa de difusión.

Los diseños de agujas huecas incluyen puntas cónicas y biseladas, pudiendo ser utilizadas para suministrar fármacos en localizaciones muy específicas. Algunos trabajos han demostrado que una matriz de microagujas de 400  $\mu\text{m}$  de largo se puede utilizar para perforar la piel humana y entregar macromoléculas. Microagujas muy pequeñas podrían proporcionar una administración altamente selectiva de fármacos a las células individuales. Estas son capaces de brindar una dosificación muy precisa, patrones de liberación, entrega local y mejorar la estabilidad biológica de fármacos mediante el almacenamiento en un volumen de micro que puede ser controlado con precisión (Azarmi *et al.*, 2008).

El objetivo común del uso de microagujas es crear una vía franqueando la barrera de permeabilidad de la piel. La justificación del uso de microagujas, en oposición a dispositivos de macroescala, está motivada por el tamaño de la diana y el beneficio de perforación de una manera mínimamente invasiva.

## APLICACIONES

Las microagujas se han utilizado en muchas aplicaciones diferentes, que van desde la neuroestimulación a la entrega de genes en células individuales, toma de muestras de fluido intersticial por medio de la acción capilar (esto se ha demostrado con microagujas fuera de plano de 350  $\mu\text{m}$  de largo, huecas) (Henry *et al.*, 1998).

La perforación con microagujas ha demostrado que aumenta la permeabilidad de la piel en varios órdenes de magnitud para una variedad de compuestos que van desde

marcadores de bajo peso molecular hasta nanopartículas, diversas proteínas y ADN (Arora *et al.*, 2008).

Una de las primeras microagujas reportadas en la literatura científica consistió en un arreglo de 4.2 x 4.2 mm<sup>2</sup>, conteniendo 100 microagujas de 1.5 mm de largo. Estas agujas extremadamente delgadas se utilizaron como electrodos eléctricos, y diseñados para estimular la corteza visual del cerebro con el fin de recuperar la vista. Similares sondas de microagujas también se han utilizado con fines de diagnóstico, donde las agujas se utilizan para las mediciones de impedancia de lesiones de la piel con el fin de detectar cáncer de piel. Otra aplicación de las microagujas es el muestreo de fluidos corporales. Parecido a la trompa de un mosquito, fabricado de un milímetro de largo, dentado y hueco para la recolección de sangre (Henry *et al.*, 1998).

Recientemente se han propuesto varios conceptos de microagujas que resultan nuevos e interesantes, pudiendo encontrar una gran utilidad en el futuro. Por ejemplo, las microagujas poliméricas biodegradables han sido recientemente fabricadas y caracterizadas. La ventaja de estas microagujas poliméricas es que su producción puede ser mucho más barata (en comparación con las del silicio) y no constituyen un problema si se rompen en la piel ya que son biodegradables. Para hacer microagujas de polímeros biodegradables con puntas afiladas, se han propuesto distintos métodos empleando elementos micro-electromecánicos, de grabado y moldeo, los cuales se han adaptado para producir agujas con punta biselada y punta tipo cincel. Los métodos a base de micro-litografía son también muy empleados (Roxhed, 2007).

#### MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS MICROAGUJAS

El mecanismo de acción depende del diseño de las microagujas y se resume en la Figura 14. Todos los tipos de microagujas son típicamente fabricadas como una matriz de hasta cientos de microagujas sobre un sustrato. Las microagujas sólidas puede utilizarse presionado sobre la piel o raspado en la piel para la creación de orificios microscópicos, lo que aumenta la permeabilidad de la piel hasta cuatro

órdenes de magnitud. Esto es seguido por la aplicación de medicamentos o vacunas en forma de un parche o formulación tópica. Los agujeros formados después de remover las microagujas tienen una vida útil de más de un día cuando se mantienen bajo oclusión, pero menos de 2 h cuando no se cubren (Arora *et al.* 2008).

La segunda estrategia es contar con vacunas o fármacos encapsulados en un revestimiento seco sobre microagujas sólidas. Este recubrimiento puede disolverse dentro de 1 min después de la inserción en la piel, después de lo cual las microagujas pueden ser retiradas. Como una alternativa al uso de metales o polímeros insolubles, se han fabricado microagujas a base de polímeros biodegradables o solubles en agua. En este caso, el fármaco puede estar contenido en la microaguja constituyendo un sistema de tipo matricial, que permitiría en un momento dado conseguir una liberación controlada, (Park *et al.*, 2010) o bien una liberación rápida (del orden de minutos) después de la inserción, lo cual puede conseguirse empleando materiales solubles como maltosa o polivinil pirrolidona (Arora *et al.*, 2008).

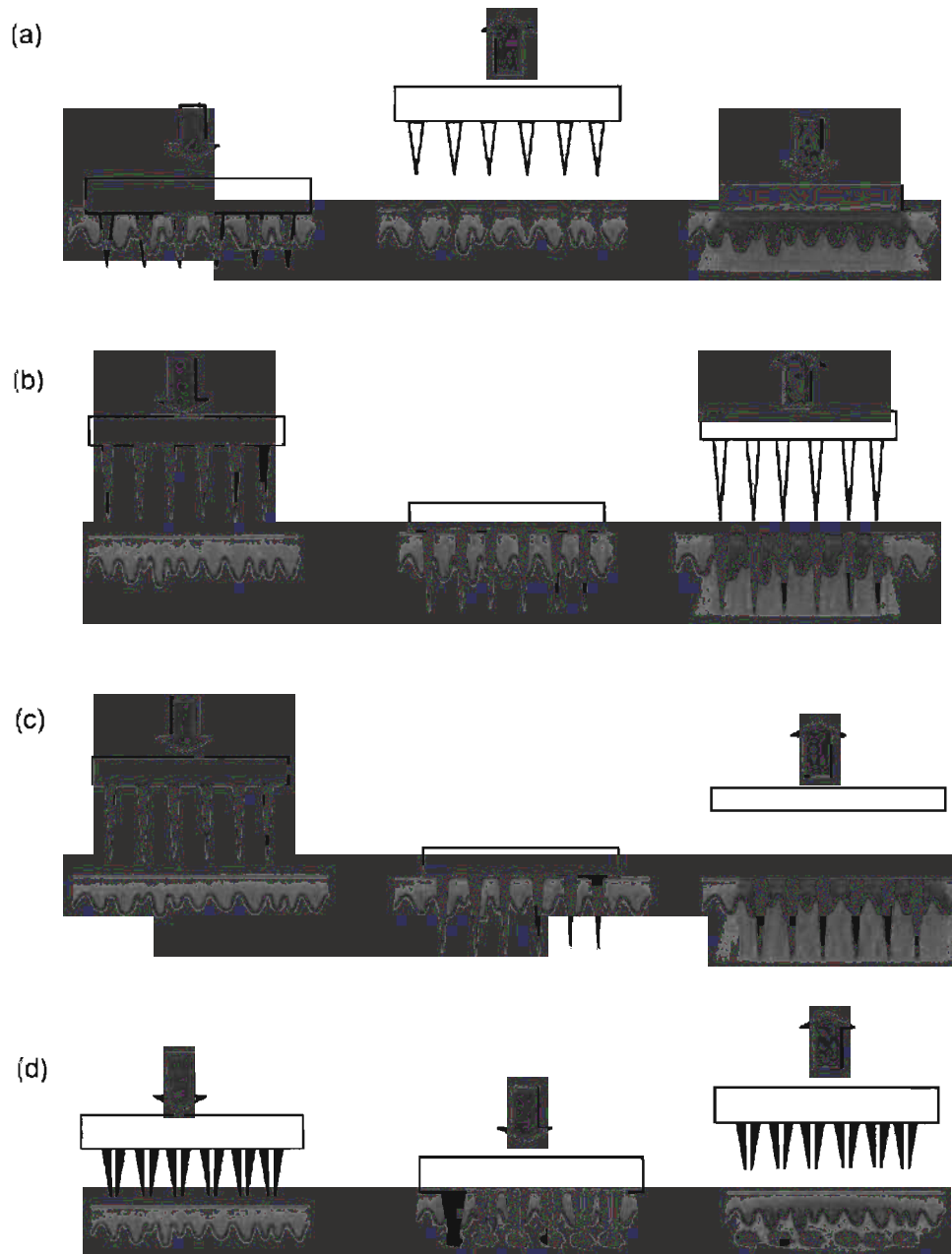


Figura 14. Esquema de administración de fármacos utilizando diferentes diseños de microagujas: (a) microagujas sólidas para permeabilización la piel a través de la formación de conductos a través del estrato córneo, (b) microagujas sólidas recubiertas con fármacos para disolución rápida en la piel, (c) microagujas poliméricas con fármaco encapsulado para la liberación rápida o controlada en la piel, (d) microagujas huecas para la inyección de solución de fármaco.



---

### 3. HIPÓTESIS

La inclusión de metotrexato en una formulación de liposomas flexibles y el pretratamiento de la piel con un arreglo de microagujas metálicas, promoverán el transporte del fármaco hacia y a través de la piel, en relación a su administración en forma de solución y en piel intacta, esperando un efecto sinérgico por el uso simultáneo de estos dos promotores (microagujas y acarreadores lipídicos deformables).

---

### 4. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Estudiar el efecto que tienen las microagujas y las formulaciones (liposomas flexibles y solución) en la penetración *in vitro* del metotrexato a través de la piel.

#### Objetivos particulares

- Desarrollar y validar un método para cuantificar MTX por espectrofotometría UV-Vis y por cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC).
- Preparar y caracterizar vesículas lipídicas flexibles formuladas con MTX.
- Realizar estudios de permeación *in vitro* de MTX (en solución e incluido en vesículas lipídicas) en piel de cerdo intacta y pretratada con arreglos de microagujas.
- Evaluar el efecto de la formulación (solución y nanoacarreador) en la permeación de MTX a través de la piel.

---

### 5. MATERIALES

Rodillo CR5 con arreglo cilíndrico de microagujas de acero inoxidable con una longitud de 500  $\mu\text{m}$  (MTS-Roller, USA).



Membranas de policarbonato de 0.1  $\mu\text{m}$ , 0.05  $\mu\text{m}$ , 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore, USA).

Celdas de difusión verticales estáticas tipo Franz con un área de permeación de 0.63  $\text{cm}^2$  y un volumen de receptor de 1.9 mL (Taller de soplado de Vidrio, FES Cuautitlán).

Material de vidrio.

### **Biológico**

Piel de oreja de cerdo recuperada del rastro después del sacrificio de los animales y antes de ser pasada por agua caliente o vapor.

### **Compuesto y Reactivos**

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

Fosfato monobásico de potasio (Fermont, México)

Fosfatidilcolina 95% (Epikuron 200, Germany)

Tween 80 (Merck, Germany)

Metotrexato Hidrato (Sigma Aldrich, USA),

Etanol (Fermont, México)

Metil etil cetona (Fermont, México)

Acetato de etilo (Fermont, México)

### **Equipos**

Balanza analítica (BBC 32, Boeco, Alemania)

Agitador magnético (Magnetir, Lab\_line instruments, USA)

Rotavapor (Laborota 4000, Heidolph, Alemania)

Recirculador de líquidos con termostato (VWR, Scientific, USA)

Vórtex (M 16715, Mixer, USA)

Espectrofotómetro UV-Vis (Cary IE95031003, Varian, Australia)

Sonicador (Branson 5210, Branson, USA)

Agitador magnético multiplaza (5069C, Barnsted International, USA).

Automuestreador (Automatic TLC Sampler III, Camag, Suiza)

Escaner (TLC Scanner III, Camag, Suiza)

Nanosizer (Coulter N4 Plus, Beckman, USA)

Zetasizer (Zen 3600, Malvern Instruments, USA)

---

## 6. MÉTODOS

### ESPECTRO DE ABSORCIÓN

Se determinó la longitud de onda de máxima absorción para MTX en solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH 7.4 y SAF pH 7.4 en contacto con piel.

### PRUEBA DE SOLUBILIDAD

Se realizaron pruebas de solubilidad cualitativa con solventes orgánicos: butanona y acetato de etilo y se determinó la solubilidad de forma cuantitativa de MTX en SAF, el cual será el medio receptor para la prueba de permeabilidad, para esto la SAF se saturó con MTX, manteniéndolo bajo agitación magnética durante 24 h. La cantidad disuelta se determinó utilizando un estándar de concentración conocida de MTX, leyendo las soluciones de la muestra y del estándar en el espectrofotómetro a una longitud de 305 nm.

### CONDICIONES ÓPTIMAS DE ANÁLISIS PARA CUANTIFICAR MTX POR HPTLC

Se prepararon soluciones de MTX en SAF pH 7.4 y se probaron diferentes fases móviles para correr las placas de sílice C-18. De acuerdo a los antecedentes reportados en la literatura, se probaron las siguientes condiciones variando la fase móvil y las proporciones:

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M pH 6.3: Metanol (75:25) y (60:40)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M pH 6.3: Metanol: Acetonitrilo (50:25:25)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M pH 6.3: Acetonitrilo (70:30)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M pH 6.3: Acetato de etilo (70:30)

NaH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.2M pH 6.0: Metanol (70:30)

NaH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.2M pH 6.0: Acetonitrilo (70:30)

SAF pH 6.0 que contiene (NaH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.2M: Ácido cítrico): Metanol (50:50),

NaH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.2M pH 6.0: Metanol (50:50).

Las condiciones óptimas de análisis para la cuantificación de MTX por HPTLC se determinaron en base a un valor de R<sub>f</sub> cercano a 0.5, a la identificación, selectividad

y cuantificación del MTXX, así como la intensidad de la bandas. La longitud de onda máxima de absorción se estableció a partir del espectro de MTX en HTPLC (302 nm).

## **VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DEL MTX**

La validación del método analítico se llevó a cabo bajo los protocolos de validación (Colegio de Q.F.B, 2006). Después de varias pruebas, las condiciones óptimas de elución fueron las siguientes: Fase Estacionaria: Placa de sílica C18; fase móvil: Fosfato Dibásico de sodio 0.2 N: Metanol (50:50), la longitud de onda fue de 302 nm, el volumen de inyección fue de 8000  $\mu$ L con un ancho de banda de 5.0mm, con una velocidad de aplicación de 1.0 mm/s y el tamaño del Slit para el escaneo fue de 4.00 x 0.45 mm.

Partiendo de las condiciones óptimas experimentales para el análisis de MTX, se validó el método analítico para cuantificar el MTX incluido en los liposomas.

### **SELECTIVIDAD**

Se inyectaron muestras de blanco de SAF pH 7.4, MTX en SAF y una dispersión de liposomas vacíos para verificar que no existiera interferencia por parte de la matriz biológica.

### **LINEALIDAD**

Se prepararon seis puntos a diferentes concentraciones en un rango de 21- 148 ng/mancha, cada punto se hizo por triplicado. A los resultados se les efectuó un análisis de regresión lineal calculando la ordenada al origen, la pendiente y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

### **EXACTITUD**

Se prepararon 3 concentraciones de 32 -117 ng/mancha de MTX en SAF pH 7.4, por triplicado. Se determinó su concentración por medio de la interpolación de la

respuesta sobre la curva patrón (Cest) la cual se comparó con la concentración nominal, y se determinó la desviación estándar la cual no debe exceder del 3 %.

#### PRECISIÓN

A partir de los datos de linealidad se calculó la precisión con el valor del coeficiente de variación porcentual (CV), el cual no deberá exceder el 3 %. El análisis se realizó por triplicado.

#### LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se evaluó mediante el análisis de soluciones diluidas de MTX. La menor concentración en la que el valor promedio de su determinación analítica estuviese en el  $\pm 20$  % de su valor nominal y con un coeficiente de variación que se encuentre en el mismo intervalo.

Matemáticamente se determinó por la siguiente expresión

$$LC = \frac{10 \text{Desviación estandar de la ordenada al origen}}{\text{Pendiente de la curva de calibración}}$$

#### LÍMITE DE DETECCIÓN

Se evaluó por el análisis de soluciones diluidas de MTX. La cantidad mínima detectable se consideró como aquella que proporcionara una señal del triple del ruido.

Matemáticamente se determinó con la siguiente expresión

$$LD = \frac{3.3 \text{Desviación estandar de la ordenada al origen}}{\text{Pendiente de la curva de calibración}}$$

### **VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR MTX EN UNA MATRIZ BIOLÓGICA (SAF pH 7.4 EN CONTACTO CON PIEL)**

Se validó un método analítico para cuantificar la cantidad de MTX capaz de permear a la solución receptora en los estudios de permeación. Para ello se preparó una solución de SAF pH 7.4 y se puso en contacto con piel manteniendo las mismas condiciones a las que se realizaron los estudios de permeación. Para ello, se extirpó

piel de oreja de cerdo, y la parte interna del tejido se puso en contacto con SAF pH7.4 en un recipiente simulando las condiciones en las que va estar en la celda de Franz, agitando durante 24 h. Posteriormente, se filtró el fluido por una membrana Millipore (0.45  $\mu\text{m}$ ) y con dicho fluido se procedió a la validación del método analítico empleando las condiciones previamente descritas. Las lecturas se obtuvieron en el espectrofotómetro UV-Vis a 305 nm utilizando como blanco la matriz biológica. Para validar el método se evaluaron los siguientes parámetros: linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación.

#### LINEALIDAD

Se prepararon seis puntos a diferentes concentraciones en un rango de 2.24 – 15.25  $\mu\text{g/mL}$ , cada punto se hizo por triplicado. A los resultados se les efectuó un análisis de regresión lineal calculando la ordenada al origen, la pendiente, el coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

#### EXACTITUD

Se prepararon 3 concentraciones de 5.22-1.20  $\mu\text{g/mL}$  de MTX en SAF, por triplicado. Se determinó su concentración por medio de la interpolación de la respuesta sobre la curva de calibración ( $C_{\text{est}}$ ) la cual se comparó con la concentración nominal, y se determinó la desviación estándar la cual no debe exceder del 15 % este valor es en base a Guidance for industry: Bionalytical Method Validation (U.S Departamento of Health and Human Services, 2001)

#### PRECISIÓN

A partir de los datos de exactitud se calculó la precisión con el valor del coeficiente de variación porcentual (CV), el cual no deberá exceder el 15 %. El análisis se realizó por triplicado, en dos días diferentes.

#### LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se evaluó mediante el análisis de soluciones diluidas de MTX. La menor concentración en la que el valor promedio de su determinación analítica estuviese en

el  $\pm 20\%$  de su valor nominal y con un coeficiente de variación que se encuentre en el mismo intervalo.

Matemáticamente se determinó por la siguiente expresión:

$$LC = \frac{10 \text{Desviación estandar de la ordenada al origen}}{\text{Pendiente de la curva de calibración}}$$

### LÍMITE DE DETECCIÓN

Se evaluó por el análisis de soluciones diluidas de MTX. La cantidad mínima detectable se consideró aquella que proporcionara una señal del triple del ruido.

Matemáticamente se determinó con la siguiente expresión:

$$LD = \frac{3.3 \text{Desviación estandar de la ordenada al origen}}{\text{Pendiente de la curva de calibración}}$$

### VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR MTX EXTRAÍDO DE LA PIEL

Al final de las pruebas de permeación se recuperó la piel y se extrajo el MTX remanente con una solución de SAF pH 7.4: Etanol (1:1), es por ello, que se hizo una curva de calibración de este disolvente, validando el método analítico para la cuantificación del fármaco.

Para simular las condiciones experimentales se preparó una solución de SAF pH 7.4: Etanol (1:1), la cual estuvo en contacto con piel durante 24 horas en agitación constante. Se leyeron las muestras a 305 nm, utilizando como blanco una solución de SAF pH 7.4: Etanol (1:1) en contacto con piel.

Para validar el método se evaluaron los siguientes parámetros: linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación, siguiendo el mismo procedimiento que para la validación de MTX en una matriz biológica.

El rango de concentración utilizado para la linealidad utilizado fue de 1.28-24  $\mu\text{g/mL}$  y para la exactitud 4 – 20.6  $\mu\text{g/mL}$ .

## **VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR MTX EN SAF**

Para determinar la cantidad de MTX liberado a través de la membrana de diálisis colocada en las celdas de Franz se utilizó como diluyente SAF pH 7.4 y el método se validó con los siguientes parámetros: linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación, siguiendo el mismo procedimiento que para la validación de MTX en una matriz biológica.

El rango de concentración utilizado para la linealidad fue de 3.8- 11.4 µg/ mL y para la exactitud 4.9 – 10.0 µg/mL.

## **PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS**

Se realizaron pruebas para preparar vesículas lipídicas de MTX, por tres métodos: método de hidratación para formar MLV [vesícula multilaminar (por sus siglas en inglés multilamellar vesicle)], método REV [vesícula de evaporación de fase inversa (del inglés, reverse-phase evaporation vesicle)], y un método tomado de una patente donde se hicieron modificaciones al método de hidratación.

a) Para el método de hidratación se pesaron 86 mg de fosfatidilcolina y 14 mg de tween 80 los cuales se disolvieron en etanol. La solución anterior se vertió en un matraz bola para hacer una película delgada dejando evaporar esta solución en rotavapor a 30 °C, 30 rpm, los residuos se eliminaron dejando a sequedad el matraz toda la noche.

Para hidratar la película se utilizaron soluciones de MTX al 0.1 % en SAF pH 7.4 y SAF pH 7.4 con 7 % y 20 % de etanol. Se dispersó la suspensión con ayuda del vórtex durante 15 min. Posteriormente, la dispersión se dejó 2 h en reposo para que los liposomas se hincharan. Transcurridas las 2 h, los liposomas se sonicaron a 40Kw durante 10 min. La dispersión se filtró a través de una membrana de 0.1µm y se midió la talla de los liposomas formados con un nanosizer (Coulter N4 Plus). Una vez obtenidos los liposomas, se determinó la eficiencia de encapsulación del MTX.

b) Preparación de liposomas por el método REV: Se pesaron 86 mg de fosfatidilcolina y se disolvieron en 12 ml de cloroformo: dietiléter (1:1), se adicionaron

2ml de una solución acuosa conteniendo 2 mg de MTX y 14mg de Tween 80. Se formó una emulsión estable y se evaporó en rotavapor a 30°C, 30rpm, los residuos del solvente se eliminaron dejando el matraz expuesto al medio ambiente toda la noche. La película se hidrató con una solución de SAF pH 7.4, formando la dispersión con ayuda del vórtex durante 15 min. Posteriormente los liposomas se dejaron 2 h en reposo para que hincharan. Una vez pasadas las 2 h, la dispersión de liposomas se sonicó a 40 Kw durante 10 min, filtrando la dispersión a través de una membrana de 0.1 µm (Katsumi & Naoru, 1987) y posteriormente se midió la talla de los liposomas formados con el nanosizer (Coulter N4 Plus) y se determinó la tasa de encapsulamiento.

Para este método se hicieron pruebas para determinar la proporción óptima de disolvente orgánico y el aparato a utilizar para obtener una emulsión estable (vórtex y sonicador). Se probaron tres proporciones de fase orgánica: fase acuosa: a) 71.5:28.5, b) 78:22 c) 86:14.

c) Se prepararon liposomas de MTX en base a la patente ES 2 016 842 (Katsumi *et al*; 1987). Primero se formaron los liposomas por el método de MLV pesando 86mg de fosfatidilcolina y 14mg de tween 80 los cuales se disolvieron en etanol. Lo anterior se vertió en un matraz bola para hacer una película delgada dejando evaporar esta solución en rotavapor a 30°C, 30rpm, los residuos se eliminan dejando el matraz expuesto al medio ambiente toda la noche.

Se hidrató la película formada con una solución de MTX al 0.1 % en SAF pH 7.4, dispersando los lípidos con ayuda del vórtex durante 15 min. Posteriormente se dejó 2h en reposo, y después de este tiempo se adicionó 1mL de dietiléter para formar un gel, evaporando el disolvente y agitando con ayuda de un vórtex durante 10 min. La dispersión se filtró a través de una membrana de 0.1µm, midiendo la talla de los liposomas formados en un nanosizer. Una vez obtenidos los liposomas se determinó la tasa de encapsulación.

## **CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS**

Determinación del tamaño de los liposomas



La distribución de tamaño de la suspensión de liposomas se determinó empleando un Nanosizer con ángulo de 90° a 25 °C, después de haberlos pasado través de una membrana de 0.1 µm (Isopore, Millipore, Bedford, MA, USA), diluyendo la muestra con agua destilada. Cada medición se realizó por triplicado.

#### Potencial Z

Se determinó el potencial Z con ayuda de un Zetasizer (Malvem Instruments, ZAN 3600, USA), considerando la viscosidad y la constante dieléctrica del agua, 150 V de corriente eléctrica, a una temperatura de 25°C y utilizando una celda de capilar doblado, el medio de dispersión fue SAF pH 7.4.

#### Eficiencia de encapsulamiento

Para determinar la eficiencia de encapsulación se utilizaron columnas de Sephadex-10 para separar el MTX libre de los liposomas. La dispersión liposomal se hizo pasar a través de las columnas de Sephadex mediante centrifugación. Esta técnica se optimizó haciendo pruebas para determinar la velocidad y el tiempo de centrifugación, así como el volumen necesario para que el fármaco libre quedara retenido y se eluyeran solamente los liposomas cargados con el MTX. La optimización se realizó haciendo pasar una solución del fármaco con una concentración de 1 mg/mL y cada prueba se evaluó por HTPLC a 305 nm para verificar que no presentara la señal característica del MTX, lo cual indicaría que el fármaco está siendo eluido, cuando lo que se busca es que quede retenido en la columna. Por otro lado, los liposomas eluidos se rompieron con etanol y se aforaron a 5 mL con SAF pH 7.4, cuantificando el MTX incluido en las vesículas.

#### Elasticidad

La suspensión de liposomas se hizo pasar dos veces consecutivas a través de un filtro de policarbonato de 0.1 µm, midiendo posteriormente el tamaño de las vesículas en el nanosizer con un ángulo de 90° a 25 °C diluyendo con agua destilada. La misma suspensión de liposomas que se filtró a través de la membrana de 0.1 µm,

se hizo pasar por un filtro de tamaño de poro de 0.05  $\mu\text{m}$  (menor al tamaño de las vesículas) y se diluyó con agua destilada, determinando el tamaño de las vesículas.

## **ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE MTX**

Se estudió la velocidad de liberación de MTX incluido en liposomas y se comparó con la obtenida con una solución del fármaco en SAF pH 7.4. . El procedimiento seguido fue el siguiente: Se montaron seis celdas de Franz con área de permeación de 0.63  $\text{cm}^2$  y un volumen de receptor de 1.9 mL utilizando una membrana de diálisis de celulosa (Spectrum Lab Inc), con peso molecular de corte de 6-8000 KD). En el compartimento donador de las celdas se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de la solución o de la suspensión de liposomas, ambas con un contenido aproximado de 1 mg / mL.

Para ambos estudios el compartimento receptor consistió en 1.9 mL de una solución de SAF pH 7.4, la cual se mantuvo a 37 °C con agitación constante. Durante la liberación se tomaron muestras de 280  $\mu\text{L}$  a los siguientes intervalos de tiempo: 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.50, 2, 2.50, 3, 4, 5 y 6 horas, reponiendo dicho volumen con medio de disolución fresco.

## **ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE PERMEACIÓN *IN VITRO* DE MTX A TRAVÉS DE PIEL DE CERDO**

El procedimiento que se siguió para llevar a cabo las permeaciones fue el siguiente:

1. Se utilizó piel de oreja de cerdo recuperada del rastro después del sacrificio de los animales y antes de que fueran tratados con agua caliente o vapor. Se extirparon porciones de piel de la parte externa de la oreja utilizando un escalpelo, recortando cuidadosamente los pelos que recubren la piel del cerdo. La piel aislada se conservó en hojas de aluminio a -5 °C hasta ser utilizadas.

2. Las permeaciones se llevaron a cabo tanto en piel intacta como en piel pretratada con las microagujas. Para ello, se empleó un arreglo cilíndrico de microagujas de acero inoxidable con una longitud de 500  $\mu\text{m}$  (MTS\_Roller, USA). El tratamiento se

realizó pasando el rodillo sobre la piel (procurando mantener un ángulo y presión constante), siguiendo cuatro diferentes direcciones, como se muestra en la Figura 15.

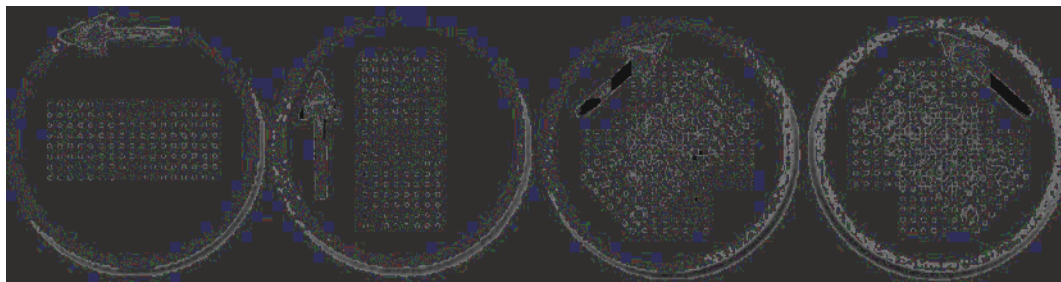


Figura 15. Direcciones utilizadas con el rodillo de microagujas para obtener las microperforaciones en la piel

3. La piel, tanto la intacta como la pretratada con microagujas, se montó en celdas verticales tipo Franz (Figura 16). Se realizaron permeaciones para la solución de MTX en SAF pH 7.4 y para la suspensión de liposomas, ambas con un contenido aproximado de 1 mg/mL de MTX.



Figura 16. Celdas verticales tipo Franz empleadas en los estudios de permeación

Para el estudio, el compartimiento receptor consistió en SAF pH 7.4, la cual se mantuvo a 37 °C con agitación constante. Durante la permeación se tomaron muestras de 280  $\mu$ L a los siguientes intervalos: 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas, reponiendo el volumen con medio de disolución fresco. Las muestras tomadas a

cada tiempo, se leyeron en el espectrofotómetro a 305 nm, utilizando como blanco SAF que estuvo en contacto con piel bajo las mismas condiciones que durante la permeación.

#### **MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE MTX RETENIDO EN LA PIEL**

Para determinar el porcentaje de MTX extraído de la piel, se siguió el siguiente procedimiento: Se montó la piel en las celdas de Franz y se colocaron en el donador 200  $\mu$ L de una solución de MTX en SAF pH 7.4: etanol (1:1) con una concentración de 0.5 mg/mL, se dejó evaporar el disolvente de la superficie de la piel y posteriormente se retiró la piel de cada una de las celdas, haciendo lavados para eliminar el exceso de MTX de la superficie, para lo cual se realizaron lavados, primeramente con etanol, después con SAF pH 7.4 y finalmente con agua. La piel fue cortada en finas porciones, las cuales se colocaron en viales, agregando 5 mL de una solución de SAF pH 7.4: etanol (1:1), cada uno de los sistemas se mantuvo en agitación constante durante 24 h, protegidos de la luz y a temperatura ambiente. Posteriormente se filtraron las soluciones (Millipore 0.45  $\mu$ m) y se leyeron en el espectrofotómetro a 305 nm. La misma prueba se llevó a cabo utilizando SAF pH 7.4 para extraer el fármaco, esto con la finalidad de determinar el medio de extracción óptimo.

Posteriormente, las soluciones se filtraron (Millipore 0.45  $\mu$ m) y se tomó 1 mL llevándolo a 10 mL con SAF, se tomaron 500  $\mu$ L y se determinó MTX la cantidad de MTX determinando la absorbancia a 305 nm.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA ABSORCIÓN Y DE LA SOLUBILIDAD DE MTX

El espectro de absorción de MTX en SAF pH 7.4 y MTX en SAF pH 7.4 en contacto con piel, se presentan en la Figura 17 en el cual se observa un máximo de absorción a 305 nm, mostrando que no existe interferencia por parte de la matriz.

En las pruebas de solubilidad se determinó que es insoluble en disolventes orgánicos como etanol, metanol, cloroformo, acetato de etilo, metiletil cetona y en agua, siendo la solubilidad del MTX dependiente del pH. El MTX tiene una solubilidad en SAF pH 7.4 de 6 mg/ml, la cual fue útil para los estudios de liberación y permeabilidad, asegurando condiciones sink a lo largo de las pruebas.

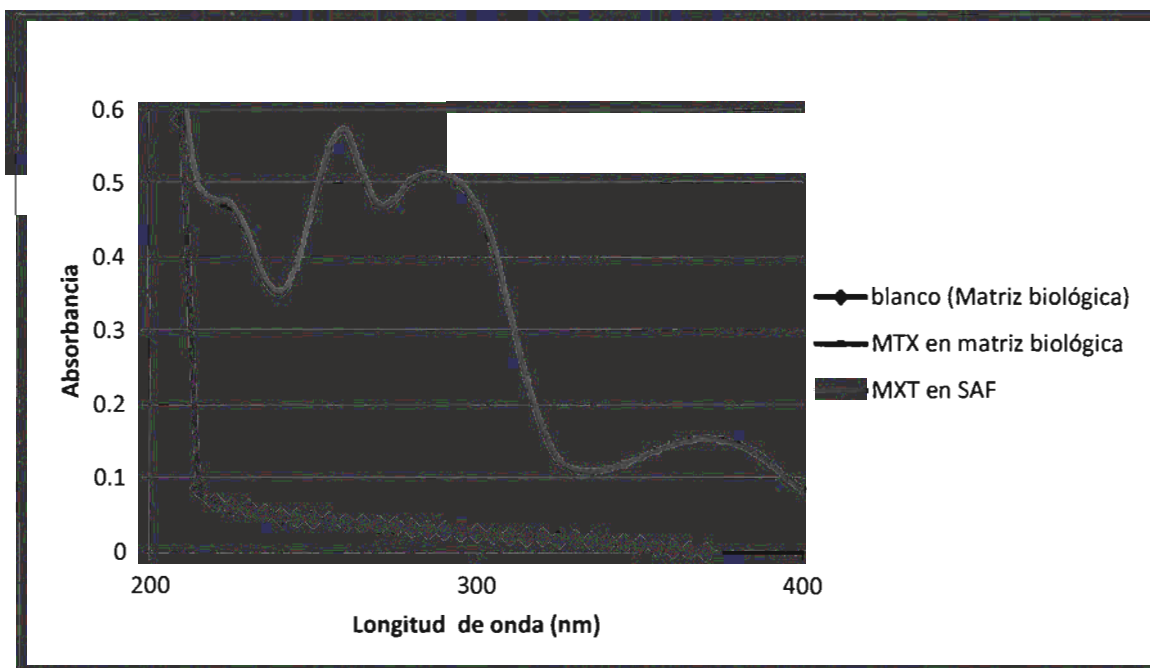


Figura 17. Espectro de absorción de MTX (9 µg/mL) en SAF pH 7.4, en SAF pH 7.4 en contacto con la piel (matriz biológica) y de un blanco consistente en SAF pH 7.4 en contacto con piel.

## VALIDACIÓN ANALÍTICA

La finalidad de la validación es asegurar la fiabilidad del método y la confianza de los datos obtenidos. Los parámetros que se evaluaron para la cuantificación del MTX fueron: selectividad, linealidad, exactitud, precisión, límite de cuantificación y de detección.

### VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DEL MTX

La técnica empleada para determinar la tasa de encapsulación fue la Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC, por sus siglas en inglés). En la Figura 18 se muestran los cromatogramas obtenidos para una solución acuosa de MTX, la fase móvil y la SAF, mostrando que el método es selectivo ya que no presenta señal la fase móvil ni el diluyente a la longitud de onda seleccionada.

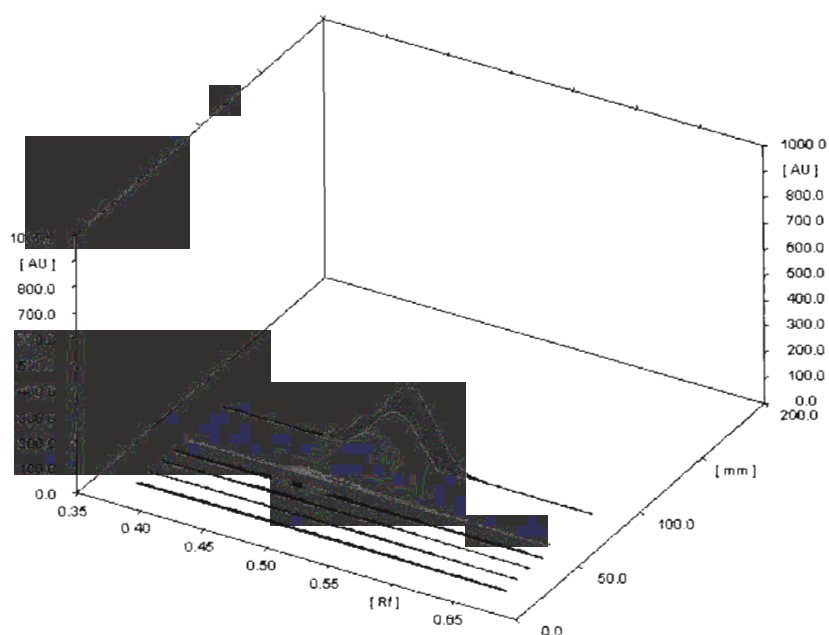


Figura 18. Cromatogramas de MTX obtenidos para diferentes cantidades aplicadas (21 -148 ng/mancha). Las dos primeras líneas (café y rosa) corresponden a la fase móvil y diluyente, respectivamente.



Para determinar la tasa de encapsulamiento, una vez que la suspensión liposomal fue pasada por la columna de Sephadex, los liposomas eluidos se rompieron con etanol y se aforo la solución a 5 ml con SAF pH 7.4 para cuantificar el fármaco encapsulado, Por esta razón fue necesario verificar que los lípidos se separaran del pico principal de MTX para que no interfirieran en la cuantificación. En la Figura 19 se muestra el cromatograma donde se observa que los la fosfatidilcolina que conforma los liposomas no interfiere con el pico de MTX.

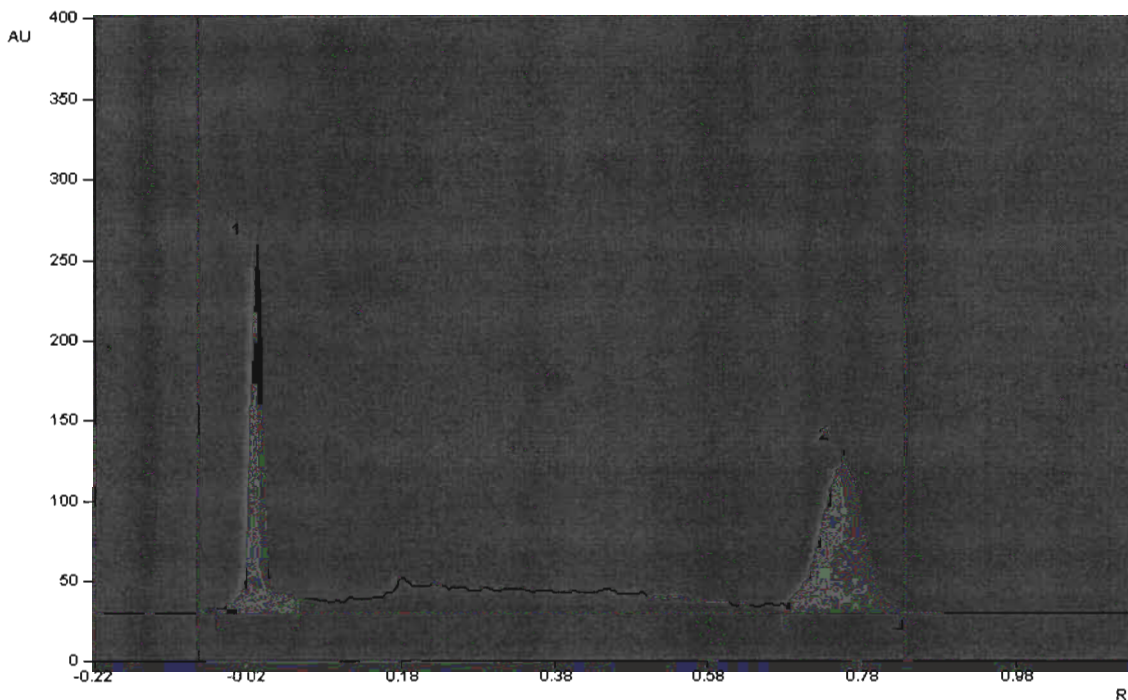


Figura 19. Cromatograma de MTX (84.8 ng/mancha) en Placas C18; fase móvil: Fosfato dibásico de sodio 0.2 N: Metanol (50:60), la longitud de onda fue de 302 nm. El pico 1 corresponde al placebo de liposomas y el pico 2 al MTX.

En la Figura 20 se representa gráficamente la recta de calibrado resultante de la medición de seis concentraciones por triplicado y en la tabla 7 se presentan los resultados de cada parámetro donde se observa que el método es lineal con un valor de coeficiente de determinación mayor a 0.98. Los valores de coeficiente de variación porcentual son menores al 3 % para exactitud y precisión, así como

tomando en cuenta que el porcentaje de recobro promedio ( $\bar{x}$ ) está incluido en el intervalo de confianza IC ( $\mu$ ), se demuestra que el método es exacto y preciso.

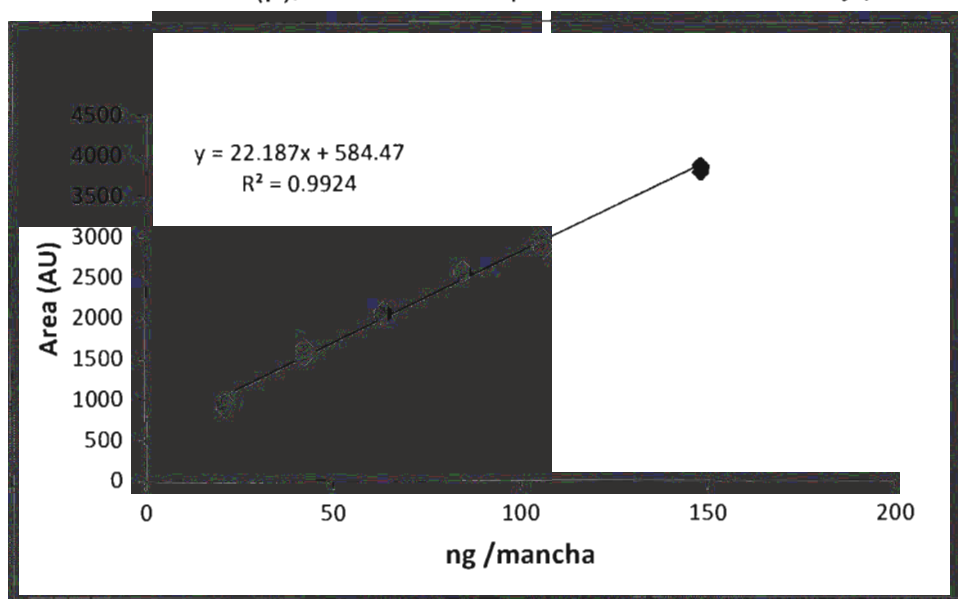


Figura 20. Recta de Calibración de MTX empleada para determinar la tasa de encapsulación en los liposomas

Tabla 7. Resultados de la validación para cuantificar MTX encapsulado

LINEALIDAD	EXACTITUD	PRECISIÓN		LC	LD
		REPETIBILIDAD	INTER-DIA		
$r^2=0.99$	IC ( $\mu$ )=100.01-102.03 $\bar{x} = 100.64 \%$	CV =1.78 %	CV= 2.4 %	5.05 ng/mancha	1.66 ng/mancha
IC (B1)= 21.1- 23.5	CV=2.54 %				

### VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR MTX EN UNA MATRIZ BIOLÓGICA (SAF pH 7.4 EN CONTACTO CON PIEL)

La cuantificación de MTX en la solución receptora durante los estudios de permeación se realizó por espectrofotometría UV. En la Figura 21 se representa gráficamente la recta de calibrado resultante del análisis por sextuplicado, donde se observa que existe linealidad a las concentraciones seleccionadas, que se corrobora con un valor de coeficiente de determinación mayor a 0.98. Los valores de



coeficiente de variación porcentual son menores al 15 % para exactitud y precisión, y tomando en cuenta que el porcentaje de recobro promedio ( $\bar{x}$ ) está incluido en el intervalo de confianza IC ( $\mu$ ) (tabla 8), se demuestra que el método es confiable para cuantificar MTX en una matriz biológica.

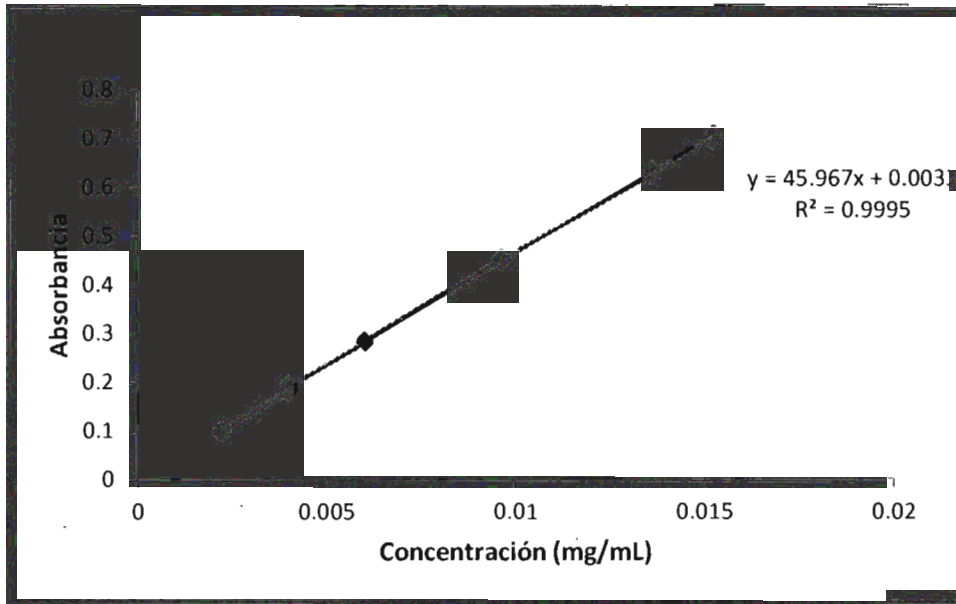


Figura 21. Curva de calibración de MTX en SAF pH 7.4 en contacto con piel de cerdo, empleada para cuantificar el fármaco en el medio receptor durante los estudios de permeación.

Tabla 8. Resultados de la validación del método para cuantificar MTX en una matriz biológica (SAF pH 7.4 en contacto con piel de cerdo).

LINEALIDAD	EXACTITUD	PRECISION		LC	LD
		REPETIBILIDAD	INTER-DIA		
$r^2=0.99$	IC ( $\mu$ )= 98.45-100.51 $\bar{X}=99.75\%$	CV =2.73 %	CV=2.16 %	1.2 $\mu\text{g/mL}$	0.412 $\mu\text{g/mL}$
IC (B1)= 45.4-46.5	CV=2.41 %				

## VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR MTX EXTRAÍDO DE LA PIEL.

Para determinar la cantidad de MTX retenida en la piel se desarrolló un método, siguiendo las mismas condiciones con las cuales se trata la muestra; para ello, se emplearon secciones de piel que estuvieron en contacto con una solución de SAF pH 7.4: Etanol (1:1) por 24 h en agitación constante, y la solución resultante fue empleada para preparar los sistemas. El blanco utilizado para corregir la línea base fue solución de SAF pH 7.4: Etanol en contacto con piel.

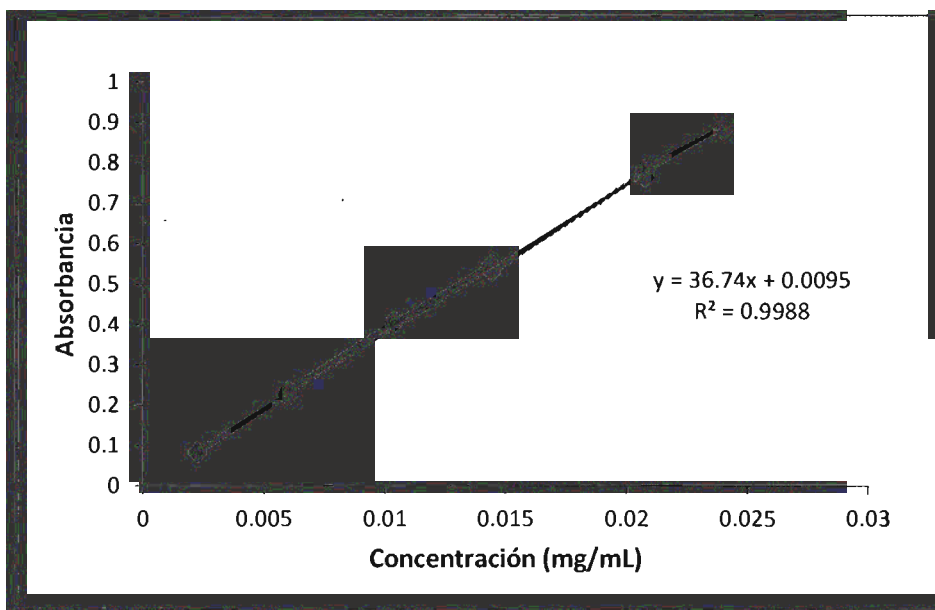


Figura 22. Curva de calibración de MTX en SAF pH 7.4: etanol (1:1) empleada para la determinación del fármaco retenido en piel al finalizar los estudios de permeación

La evidencia de que el método es idóneo para cuantificar MTX retenido en piel se presenta en la tabla 9 demostrando que el método es lineal con un valor de coeficiente de determinación mayor a 0.98 (ver Figura 22) y los valores de coeficiente de variación porcentual son menores al 15 % para exactitud y precisión, tomando en cuenta que el porcentaje de recobro promedio ( $\bar{x}$ ) está incluido en el intervalo de confianza IC ( $\mu$ ), se demuestra que el método es preciso y exacto.

Tabla 9. Resultados de la validación del método para cuantificar MTX extraído de la piel al final de los estudios de permeación.

LINEALIDAD	EXACTITUD	PRECISIÓN		LC	LD
		REPETIBILIDAD	INTER-DÍA		
$r^2=0.998$	IC ( $\mu$ )= 97.80- 99.75 X=98.67				
IC (B1)= 36.06 - 37.41	CV= 2.29%	CV =2.74 %	CV =2.19 %	27.3 $\mu$ g/mL	9.011 $\mu$ g/mL

### VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR MTX EN SAF pH 7.4

Para determinar la cantidad de MTX liberado a partir de los liposomas y de una solución del fármaco, se recurrió a un método espectrofotométrico, que cuantificara el fármaco que pasa a través de la membrana de diálisis, para lo cual se reprodujeron las mismas condiciones utilizando SAF pH 7.4 que estuviera en contacto con la membrana de diálisis, durante 6 horas, el cual se utilizó para preparar las muestras y para corregir la línea base.

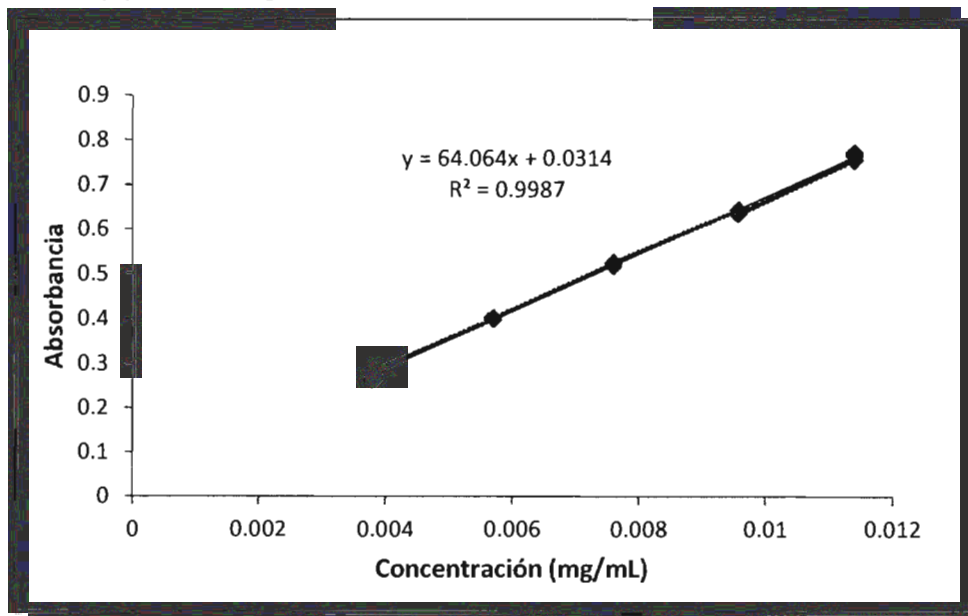


Figura 23. Curva de calibración de MTX en SAF pH 7.4 empleada para los estudios de

LINEALIDAD	EXACTITUD	PRECISIÓN		LC	LD
		REPETIBILIDAD	INTER-DIA		
$r^2=0.9987$	IC ( $\mu$ )=100.2-101.55 x=100.41 %	CV =2.45 %	CV =1.79 %	2.0 $\mu\text{g/mL}$	0.84 $\mu\text{g/mL}$
IC (B1)= 61.56 – 65.06	CV= 1.77 %				

liberación a través de una membrana de diálisis

Tabla 10 Resultados de la validación del método para determinar MTX en SAF

En la Figura 23 se representa gráficamente la recta de calibrado donde se muestra la linealidad a las concentraciones establecidas, en la tabla 10 se presentan los resultados de cada parámetro donde se observa que el método es lineal con un valor de coeficiente de determinación mayor a 0.98 y el coeficiente de variación porcentual menor al 3 % para precisión y un porcentaje de recobro promedio (x) incluido en el intervalo de confianza IC( $\mu$ ), y el coeficiente de variación del porcentaje de recobro no es mayor al 3 %, demostrando que el método es confiable para cuantificar MTX.

## PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS CON MTX

En la tabla 11 se muestra el resumen de los tres métodos probados para la preparación de los liposomas con MTX. La finalidad fue contar con un método que permitiera incrementar la cantidad de MTX encapsulado, en base a ese resultado se seleccionó el método de preparación.

El método donde se obtuvo mayor eficiencia de encapsulación fue el modificado de la patente ES 2 016 842 (Katsumi, *et al*; 1987) con un 20.8 % de MTX encapsulado en los liposomas. Este método es una variante del método de hidratación, la diferencia radica en la adición de dietiléter, lo que permitió que al romper y volver a formar la vesículas se encapsulara un mayor porcentaje de fármaco. El porcentaje de la eficiencia de encapsulación obtenido superó lo que se encuentra reportado en la literatura, en donde encapsulan aproximadamente 0.18 mg/mL (Trotta et al. , 2004) en comparación con los 0.2mg/mL de MTX encapsulados con el método probado en el laboratorio.

Tabla 11. Métodos de preparación probados para preparar liposomas de MTX

Método de preparación de liposomas	Modificaciones	Condición	Eficiencia de encapsulación de MTX (%)	Tamaño (nm)	Índice de polidispersión
Hidratación de la película (MLV)	Solución de hidratación	Buffer de Fosfatos	5	172	0.65
		Buffer de Fosfatos al 7% de Etanol	ND	174	0.29
		Buffer de Fosfatos al 20% de Etanol	ND	169	0.46
REV	Proporción de fase orgánica: fase acuosa para formar la emulsión	71.5: 28.5	17.1	160	0.55
		76: 22	4	178	0.46
		86: 14	12	175	0.41
Modificación al método de hidratación		1ml de Dietiléter	20.5	130	0.17

ND= No detectado

## CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS

Los liposomas elásticos de MTX preparados por la técnica de hidratación modificada, tuvieron un tamaño promedio de  $130 \pm 5.25$  nm y una eficiencia de encapsulación de fármaco de 20.4 %. (Tabla 12)

Conforme a la literatura, el potencial Z requerido para que una suspensión sea considerada como estable suele ser de  $\pm 30$  mV. La energía de enlace existente entre partículas es responsable de la formación de agregados de partículas débiles o fuertes. El potencial Z obtenido fue de -8 mV, lo que nos predice una inestabilidad física del sistema, la cual se determinó con el tamaño de vesícula y análisis visual de la suspensión, observando que no se ve modificado el tamaño y las características de la suspensión después de 15 días. No obstante, es necesario hacer un análisis más largo para evaluar la estabilidad por un periodo prolongado y verificar el tiempo de estabilidad de los liposomas.

La prueba de elasticidad indicó que los liposomas elásticos (transfersomas) elaborados tienen la propiedad de deformarse debido a que el tamaño de vesícula se mantiene en el rango de los 100 nm, después de hacerlos pasar por una membrana con diámetro de poro mucho más pequeño que el de las vesículas de ( $0.05 \mu\text{m}$ ), mantienen su integridad física, lo que hace suponer que al contacto con la piel, el transporte del transfersoma se verá favorecido penetrando de manera intacta, gracias al gradiente de hidratación existente en la piel. Es importante señalar que no es posible hacer pasar una suspensión de liposomas convencionales (no elásticos) a través de la membrana de  $0.05 \mu\text{m}$ , lo que enfatiza la importancia del agente de superficie para lograr la obtención de sistemas elásticos.

Tabla 12. Caracterización de los liposomas elaborados por el método de hidratación modificado (Katsumi *et al.*, 1987).

Eficiencia de encapsulamiento	20.4%
Tamaño (nm)	130 ± 5.25
Potencial Z (mV)	- 8
Índice de polidispersión	0.174 ± 0.29
Tamaño en la prueba de Elasticidad (nm)	Antes 124
	Después 105

\* Antes y después de hacerlos pasar por una membrana con diámetro de poro de 0.05  $\mu\text{m}$ .

## LIBERACIÓN

La prueba de liberación de la solución de MTX en SAF pH 7.4 y la suspensión de liposomas mostró que las dos curvas tienen el mismo comportamiento, sin que exista diferencia en el porcentaje máximo liberado (85 % para la solución y 87 % para los liposomas). Al comparar los porcentajes liberados a los 15 min y 6 h con una prueba de t-student no se encontró diferencia estadística ya que la  $P > 0.05$ . Para el caso de los porcentajes liberados entre 1 y 5 horas se encontró que sí existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) evaluado con una prueba de ANOVA. Por lo que, los liposomas muestran un retardo en la liberación de MTX en relación a la solución cuando se encuentra encapsulado favoreciendo que el fármaco sea liberado en forma más lenta y prolongada (ver Figura 24).



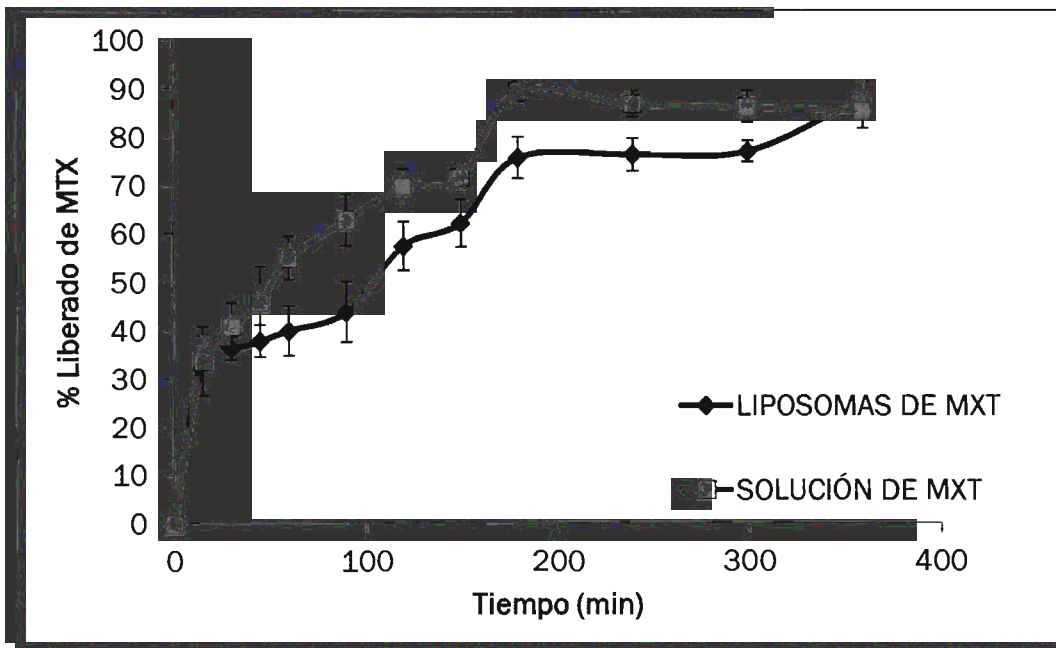


Figura 24. Perfiles de liberación de MTX en solución e incluido en liposomas (n=6)

## CINÉTICA DE PERMEACIÓN

Las permeaciones *in vitro* se realizaron con piel de oreja de cerdo porque está plenamente demostrado que guarda similitud histológica y de permeabilidad con la piel humana (Godin & Touitou, 2007). Para cada experimento (n=5) se empleó la piel del mismo animal para reducir la variabilidad, de la misma forma se intentó mantener el mismo grosor, seleccionando la piel después de medirla con un vernier digital.

Para la cuantificación de MTX en el compartimiento receptor consistente en SAF pH 7.4, se empleó el método descrito por espectrofotometría UV –Vis previamente validado. Se utilizó como blanco una celda de Franz con liposomas placebo, expuesta a las mismas condiciones que las muestras.

En la Figura 25 se aprecia el comportamiento de la cinética de permeación para los cuatro experimentos (dos formulaciones; solución y suspensión liposomal; piel intacta y piel pretratada con las microagujas), existiendo diferencias significativas al realizar un análisis de varianza del porcentaje permeado a las 24 h con un valor de  $P < 0.05$



( $P= 3.84 \text{ E-}07$ ). Como puede se puede observar en la tabla 13, el porcentaje permeado para la solución es muy bajo (aproximadamente del 20 %) independientemente de que la piel se trate o no con microagujas, lo cual resulta interesante, pues a pesar de los canales formados por las microagujas, el fármaco, por su naturaleza no logra penetrar a través de la piel más que en cantidades muy modestas. El hecho de incluir el MTX en liposomas hace que la cantidad permeada a través de piel intacta sea de un 40 %, resaltando el efecto promotor de los liposomas elásticos como acarreadores transdérmicos; mientras que permea un 50 % al pretratar la piel con microagujas.

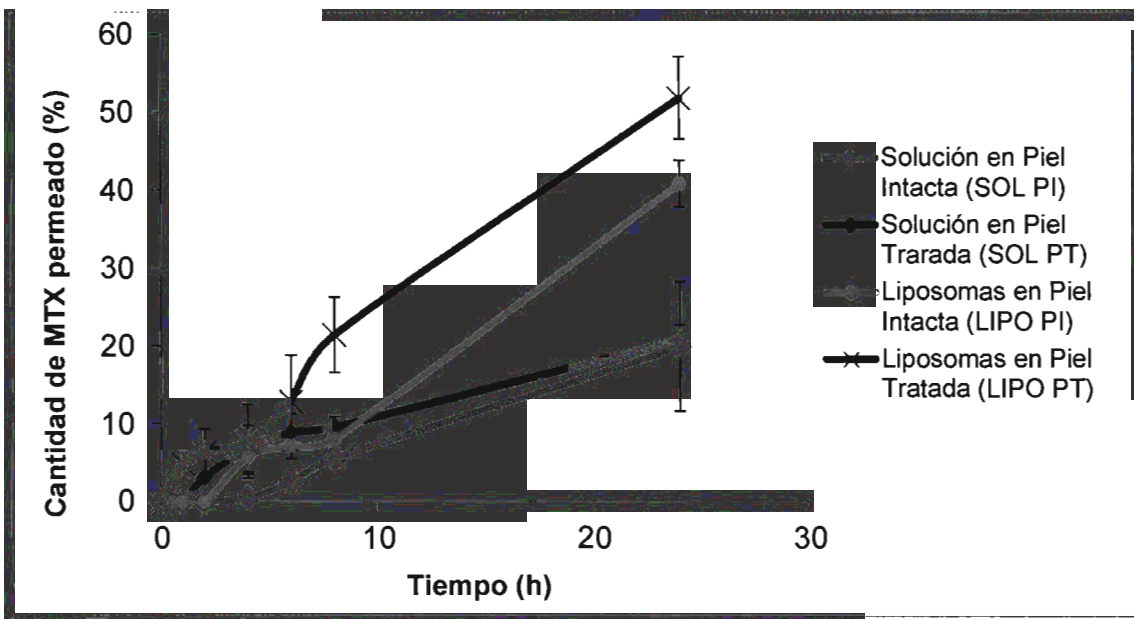


Figura 25. Cantidad de MTX permeado a través de piel de oreja de cerdo *in vitro*, bajo diferentes condiciones: MTX en solución o en liposomas; piel intacta o bien tratada con las microagujas (n=5)

Tabla 13. Porcentaie de MTX permeado después de 24 h para los cuatro tratamientos.

Tratamiento	MTX permeado (%) 24 h
SOL PI	19.88 ± 8.29
SOL PT	20.83 ± 1.83
LIPO PI	40.77 ± 2.97
LIPO PT	51.74 ± 5.28

SOL: Solución, LIPO: liposomas PI: piel intacta, PT: piel tratada

Al realizar un análisis de medias con la prueba de Tukey en el programa estadístico SPSS se determinó que la diferencia significativa se encuentra entre la permeación de la solución de MTX y los liposomas de MTX (con y sin microagujas) ( $P < 0.05$ ) con un nivel de significancia de 0.05 y entre la permeación de liposomas en piel intacta y liposomas en piel tratada (ver anexos).

Esto pone de manifiesto, que la combinación entre estos dos métodos promotores: el uso de un acarreador (liposomas flexibles), con la capacidad de deformarse y pasar por espacios incluso más pequeños que su talla; y las microagujas las cuales actúan generando canales que facilitan el paso de los liposomas.

En los estudios de permeación se tomaron las siguientes consideraciones para que la primera Ley de Fick pudiera ser aplicada:

1. El soluto difunde unidireccionalmente, considerando una membrana plana homogénea en cuanto a estructura.
2. El grosor de la membrana presenta un valor finito ( $x=1$ )
3. La concentración del receptor mantiene condiciones de gradiente máximo o sumidero "sink" (la concentración de MTX no excede del 10 % de la saturación en el comportamiento receptor).

Los valores de flujo se obtuvieron a partir de la primera Ley de Fick

$$J = \frac{\Delta Q/S}{\Delta t}$$

$\Delta Q/S$  = cantidad de soluto transferido por unidad de área

$\Delta t$  = tiempo

Al graficar  $Q/S$  contra  $t$ , la pendiente de la parte lineal corresponde al flujo en el estado estacionario. De la misma recta se calcula el tiempo de latencia ( $t_{lag}$ ) extrapolando la recta al eje  $x$  (Figura 26).

Como ya se explicó se llevaron a cabo permeaciones de MTX formulado en una solución y encapsulado en liposomas, a través de piel intacta y piel pretratada con

microagujas de 500  $\mu\text{m}$ . En la Figura 26 se puede apreciar el comportamiento de la liberación del MTX de donde se calcularon los flujos (Tabla 14). Comparando el flujo del MTX incluido en liposomas y en solución, se observa un incremento de tres veces, sin que haya diferencia en el flujo obtenido en piel intacta o piel tratada con microagujas. Así que el factor que impacta más en el flujo del fármaco es el uso de un acarreador. El análisis estadístico con la Prueba de Tukey indica que no existe diferencia significativa entre los valores del flujo para la prueba con el uso de microagujas y en piel intacta tanto para la solución como para los liposomas de MTX ( $P > 0.05$ ), pero sí existe diferencia significativa entre la solución de MTX y el uso de un acarreador (Liposomas) con un valor de  $P < 0.05$  (Ver anexos).

Para la permeación de MTX formulado en liposomas y tratando la piel con microagujas puede verse una disminución notable en el tiempo de latencia, lo cual favorece que el fármaco actúe en un menor tiempo.

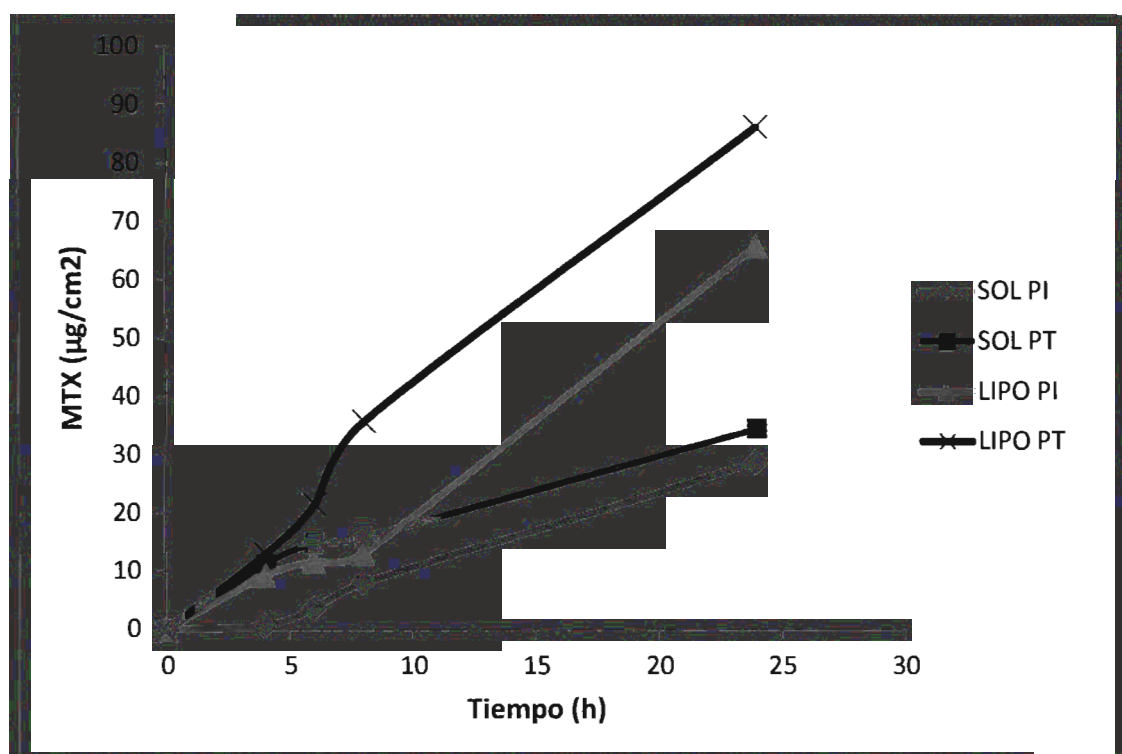


Figura 26. Liberación de MTX graficando cantidad permeada vs tiempo

Tabla 14. Parámetros de la cinética de permeación

Tratamiento	Flujo ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ )	$t_{1/2}$ (h)	Q máx ( $\mu\text{g}$ )
SOL PI	1.37 $\pm$ 0.62	6.59 $\pm$ 3.16	18.25 $\pm$ 7.01
SOL PT	1.10 $\pm$ 0.38	6.90 $\pm$ 6.01	18.56 $\pm$ 6.04
LIPO PI	2.96 $\pm$ 0.37	5.60 $\pm$ 4.78	31.96 $\pm$ 3.04
LIPO PT	3.55 $\pm$ 0.64	1.58 $\pm$ 2.11	52.33 $\pm$ 5.58

### MTX RETENIDO EN PIEL

Después de las 24 h durante las cuales se siguió la permeación, se evaluó la cantidad de MTX retenida en la piel. En la Figura 27 se muestra un incremento de tres veces en la cantidad de MTX retenido en piel cuando se administran tanto liposomas en piel tratada con microagujas en relación al MTX en solución y sin tratar la piel.

Si se analiza la cantidad retenida de fármaco en piel intacta cuando se utiliza liposomas esta se incrementa al doble en comparación con MTX en solución, en cambio no existe cambio significativo cuando se trata la piel con microagujas tanto para liposomas y fármaco en solución. Por lo que el uso de microagujas aumenta la cantidad retenida sin importar en qué forma se administre el fármaco en solución o con un acarreador.

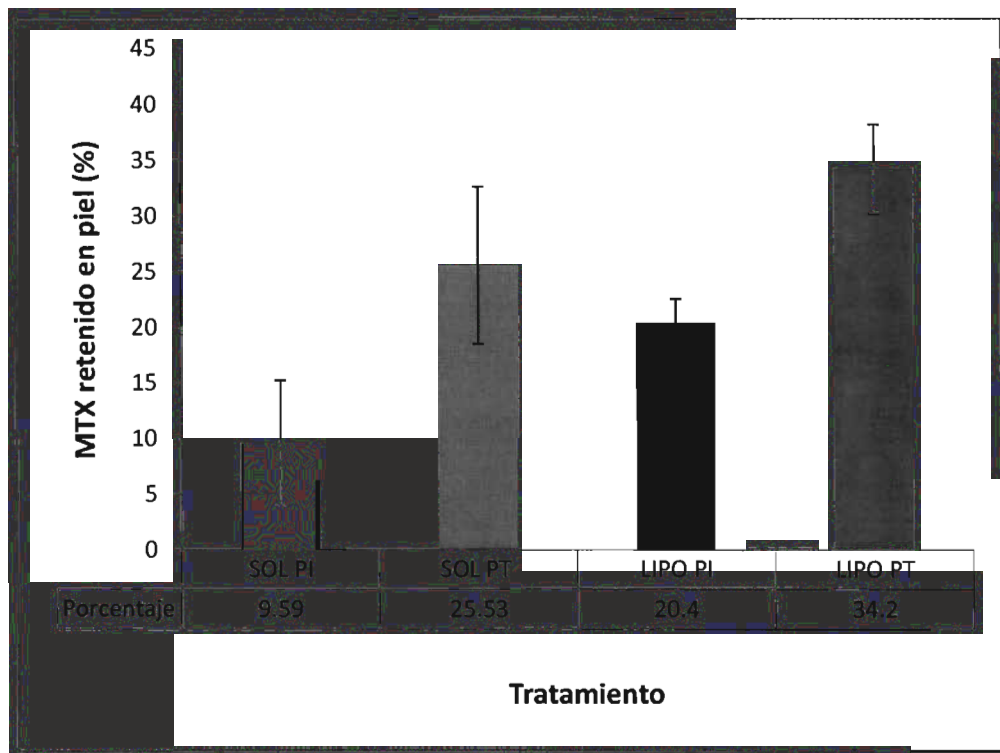


Figura 27. Cantidad de MTX retenido en piel después de 24h de permeación (SOL = solución; LIPO = liposomas; PI = piel intacta; PT = piel tratada con microagujas) (n=5).

Al realizar el análisis estadístico de comparación múltiple de las medias, se demuestra que existe diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre MTX en solución en piel intacta y los demás experimentos así como entre los liposomas en piel intacta y piel tratada con microagujas. Estos resultados ponen en evidencia que el uso de microagujas forma canales que permiten que una mayor cantidad de fármaco penetre y quede depositado en la piel, desde donde puede ser cedido gradualmente y es probable que esta liberación se lleve a cabo de una manera sostenida.

Los resultados demuestran que el hecho de utilizar un acarreador con la capacidad de deformarse, penetrando intacto a través de los espacios intercelulares de la piel, favorece el paso de MTX, fungiendo como un excelente acarreador que no sólo protege al MTX, el cual es un fármaco fotosensible, sino que además promueve su paso a través de la piel. Por otro lado, el uso simultáneo de microagujas y el acarreador, sugiere un efecto sinérgico en la permeación de MTX al incrementarse todavía más tanto la cantidad permeada al receptor como la retenida en piel.

Los resultados que se obtuvieron concuerdan con estudios anteriores donde demostraron que los liposomas elásticos cargados mejoran el suministro transdérmico del fármaco sin tratamiento de microagujas, y que el tiempo de latencia obtenida tras la aplicación de liposomas elásticas a través de la piel tratada con microagujas se reduce en casi 70 % en comparación con el obtenido a partir de liposomas convencionales. Lo que sugieren que la combinación de liposomas elásticos con pretratamiento con microagujas puede ser un método útil para aumentar la permeabilidad cutánea de fármacos con alto peso molecular y baja solubilidad en agua (Qui *et al.*, 2088).

Si comparamos la cantidad de MTX permeada (57%) y retenida en piel (34%) obtenida en este trabajo con investigaciones reportadas en la literatura usando otros promotores, se encontró que con el uso de iontoforesis e hidrogeles la cantidad permeada de MTX es del 3% (Alvarez y Blanco, 2001). Trotta reporta que los liposomas deformables usando como surfactante Glicirricinato dipotasico obtienen un 23% de MTX permeado y 49% retenido en piel (Trotta, 2004). En cambio Dubey realizo etosomas con lo que obtuvo un 54.9% de MTX permeado y 31% de MTX en piel (Dubey *et al.*, 2007). Estos últimos resultados son muy semejantes a los obtenidos en el presente trabajo pero la desventaja de los etosomas utiliza gran cantidad de etanol utilizado.

---

## 8. CONCLUSIONES

- o Se desarrollaron y validaron métodos para cuantificar MTX en la determinación de la eficiencia de encapsulación por HTPLC, así como para los estudios de liberación, estudios de permeación, y para la extracción del MTX remanente en piel al final de la permeación por espectrofotometría UV-Vis.
- o Se prepararon liposomas elásticos de MTX con el método modificado de hidratación con un tamaño de partícula de 130 nm, con un potencial Z de -8 mV y con una eficiencia de encapsulación del fármaco de 20.4 %.
- o De acuerdo a los resultados obtenidos, la solución de MTX no incrementa su paso a través de la piel empleando microagujas, lo que implicaría que las características de solubilidad y coeficiente de partición del fármaco no favorecen su transporte a través del estrato córneo, a pesar de los canales generados con las microagujas.
- o La inclusión del MTX en liposomas elásticos, aumenta tanto la cantidad permeada como la retenida en piel de manera significativa ( $\alpha=0.05$ )
- o La cantidad retenida en piel para MTX incluido en liposomas se incrementa un 67.64 % al pretratar la piel con microagujas, lo que sugiere de la posible formación de un depósito en piel.
- o La cantidad retenida, el  $t_{lag}$  y  $Q_{max}$  pueden ser indicativos de un efecto sinérgico al incluirlo en los liposomas elásticos y utilizando microagujas. Por lo tanto el uso de estos dos promotores un físico y un químico resuelve el problema de la baja permeabilidad en piel de MTX en solución debido a sus características fisicoquímicas.

---

## 9. REFERENCIAS

1. Alvarez-Figueroa, M. J. & Blanco-Méndez, J. (2001). Transdermal delivery of methotrexate: iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* (215), 57–65.
2. Arora, A., Prausnitz, M. R. & Mitragotri, S. (2008). Micro-scale devices for transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* (364), 227-236.
3. Azarmi, S., Roa, W. & Lobenberg, R. (2008). Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* (60), 863-875.
4. Bangham, A. D., Standish, M.M. & Watking, J.C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* (13), 238-252.
5. Barry, B. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (14), 101-114.
6. Blanco Méndez, J., Alvarez Figueroa, M. & Delgado Charro, M. (2001). Passive and iontophoretic transdermal penetration of methotrexato. *International Journal of Pharmaceutics* (212), 101-107.
7. Chabner, B., Allegra, C., Cut A., G. & Calabresi, P. (2006). Fármacos Antineoplásicos. En J. S. Laurence L. Brunton, *Goodman and Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica* (9a ed., Vol. 1, págs. 1320-1329). San Diego California: McGraw Hill Interamericana.



8. Chandak, A, & Verma, P. (2008). Transdermal delivery of methotrexate using mixed Grades of Eudragit physico-chemical, *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Clinical Research and Regulatory* (2), 53-72.
9. Chien. Y, W. (1991). Transdermal systemic drug delivery recent developments. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, (11), 5-23.
10. Clares Naveros, B. (2003). *Sistemas de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: Liposomas multilaminares portadores de Acetonido*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
11. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C, Guia de Validación de Métodos Analíticos.(2002). México D.F:
12. Couvreur, P., Kante, B, Lenaerts, V, Guiot, P. & Roland, M. (1980). Tissue Distribution of 3H- actinomycin D Adsorbed on Polybutilcianoacrylate Nanoparticles. *Internacional Journal of Pharmaceutics* (7), 45-53.
13. Crommelin, D., Slatas, N. & Van Bloois, L. (1983). Preparation and characterization of doxorubicin-containing liposomes. I. Loading capacity, long-term stability and doxorubicin-bilayer interaction mechanism. *Internacional Journal of Pharmaceutics* (16), 79-92.
14. Degim, T. (2006). New tools and approaches for predicting skin permeability. *Drug Discovery Today*, (11), 517-523.
15. Diez, S. & Domínguez, M. (1990). Permeabilidad cutánea. *Piel* (5), 503-509.
16. Dinu, C., Hlevca, C., Ortan, A. & Prisada, R. (2010). Elastic Vesicles as Drugs Carriers Through the skin. *Farmacía* (2), 128-135.

17. Dubey, V., Mishra, D., Dutta, T., Nahar, M., Saraf, D. & Jain, N. (2007). Dermal and transdermal delivery of anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes. *Journal of Controlled Release* (123), 148-154.
18. Fenske, D.B, Chonn, A. & Cullis, P. (2008). Liposomes Nanomedicines: an emerging field. *Toxicologic Pathology* (36), 21-29.
19. Florey, K. (1976). *Analytical Profiles of Drug Substances* (Vol. 5), New York: Academic Press.
20. Godin, B. & Touitou, E. (2007). Transdermal skin delivery: Predictions for humans. *Advanced Drug Delivery Reviews* ( 59), 1152-1161.
21. Gregory, G. (2007). *Liposome Tecnology* (Tercera ed.). New York: Infoma Healthcare.
22. Guy, R. H. (1996). Current status and future prospects of transdermal drug delivery. *Pharmaceutical Research* (12), 1765-1769.
23. Henry, S., McAllister, D, & Allen, M. a. (1998). Microfabricated Microneedles: Microfabricated Microneedles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (8), 922-925.
24. Hwang, G., Lin, A., Chen, W. & Sharpe , R. (1995). Development and optimization of a methotrexate topical formulation. *Drug Development and Industrial Pharmacy* (17), 1941-1952.
25. Javadzadeh, Y. & Hamishehkar, H. (2011). Enhancing percutaneous delivery of methotrexate using different types of surfactants. *Colloids and Sufaces B: Biointerfaces* (82), 422-426.
26. Junquera, L. & Carneiro, J. (1996). *Histología Básica*. España: Mason
27. Kalia, Y. & Guy, R. (2001). Modeling transdermal drug release. *Advanced Drug Delivery Reviews* (48), 159-172.

28. Katsumi, I., Naoru, H. & Yasuaki, O. (1987). *Patente Nº 87302866.6*. España.
29. Kligman, A. (1984). Skin permeability: dermatologic aspects of transdermal drug delivery. *American Heart Journal* (1), 200-206.
30. Kneen, V., Hadgraft, J. & Guy, R. (1987). Transdermal Drug Delivery: Problems and possibilities. *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* (4), 13-37.
31. Kneep , Y., Hadgraft, J. & Guy, R. (1987). Transdermal drug delivery: problems and possibilities. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, (1) 13-37.
32. Kulkarni, P., Yadav, J., Vaidya, K. & Grandhi, P. (2011). Transferosomes: an emerging tool for transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* (4), 735-741.
33. Lennard, L. (1999). Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drug. *British journal of Clinical Pharmacology* (47), 131-143.
34. Li, C. & Deng, Y. (2004). A novel method for the preparation of liposomes: Freeze drying of monophasic solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (93), 1403-1414.
35. Lu, G. & Jun, H. (1998). Diffusion studies of methotrexate in carbopol and poloxamer gels. *International Journal of Pharmaceutics* (160), 1-9.
36. Lu, g., Jun, H. & Suh, H. (1997). Percutaneous absorption and disposition studies of methotrexate in rabbits and rats. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 18(5), 409-422.
37. Maghraby, Barry, B. W. & Williams, A. (2008). Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes.. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (34), 203-222.

38. Martini, M. C. (2005). *Introducción a la Dermofarmacia y a la Cosmetología*. Zaragoza; Acriba.
39. Mehta, R. (2004). *Topical and Transdermal Drug Delivery: What a Pharmacist Need to Know*. Arizona: Collage of Pharmacy Glendale.
40. Mitragotri, S. (2004). Breaking the skin barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* (56), 555-556.
41. Naik, A., Yogeshvar, N., Guy, K. & Guy, R. (2000). Transdermal Drug Delivery: overcoming the skin's barrier fuction. *Pharmaceutical Sciences and Technology Today* (9), 318-326.
42. Park, J., Choi, S., Soonmin, S., Young, B. & Prausnitz, M. (2010). A microneedle roller for transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76, 282-289.
43. Perrie, Y. (2008). Introducing liposomes to drug delivery. *Journal of Drug Targeting* (16), 518-519.
44. Qui, Y. Q., Gao, Y., Hu, K., & Li, F. (2088). Enhancement of skin permeation of docetaxel: A novel approach combining microneedle and elastic liposomes. *Journal of Controlled Release* (2), 144-150.
45. Riviere, J. & Papich, M. (2001). Potential and problems of developing transdermal patches for veterinary applications.. *Advanced Drug Delivery Reviews* (50), 175-203.
46. Roxhed, N. (2007). *A fully Integrated Microneedle-based Transdermal Drug Delivery System*. Stockholm Suiza: Escuela de Electricidad e Ingenieria Instituto Royal de Tecnología.

47. Said, S., Jeffes, E. W. & Weinstein, G. D. (1997). Methotrexate. *Clinics in Dermatology* (15), 781-797.
48. Sherwood, L. (1997). *Human physiology: From Cells to System* (3ra ed.). Wadsworth Publishing Company.
49. Shivanand, P., Manisd, G., Viral, D, & Jarina, F. (2009). Transfersomes: A Novel Approach for Transdermal Drug Delivery. *Der Pharmacia Lettre* (2), 143-150.
50. Tortora, G. (2006). *Principios de Anatomía y Fisiología*. 11 ed., Vol. 1, México: Médica Panamericana
51. Tortora, G. & Derrickson, B. (2002). *Principios de Anatomía y Fisiología*. 9na ed. México; Oxford.
52. Trommer, H. & Neubert, R. (2006). Overcoming the Stratum Corneum: the modulation of skin penetration. *Skin Pharmacology and Physiology* (19), 106-121.
53. Trotta, M., Peira, E., Carlotti, M. & Gallarate, M. (2004). Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. *International Journal of Pharmaceutics* (270), 119-125.
54. Tung, J. & Maibach, H. (1990). The practical use of methotrexate in psoriasis. *Drugs* (5), 697-710.
55. U.S Departamento of Health and Human Services, FDA,CDER,CVM. Guidance for industry: Bionalytical Method Validation. 2001
56. Vaidyanathan, R., Chaubal, M., & Vasavada, R. (1985). Effect of pH and solubility on *in vitro* skin penetration of methotrexate from 50% v/v propylene glycol-water vehicle. *International Journal of pharmaceutics* (25), 85-93.

57. Vemulapalli, V., Ajay, B. & Phillip, F. (2008). Optimization of Iontophoretic Parameters for the transdermal Delivery of Methotrexato. *Drug delivery* (7), 437 - 442.
58. Winter, M. E. (1994). *Farmacocinética Clínica Básica* (2da ed). Diaz de Santos: España
59. Wong, T.-W., Zhao, Y., Sen, A. & Hui, S. (2005). Pilot study of topical delivery of methotrexate by electroporation. *British Association of Dermatologists* (153), 524-530.

### **PAGINAS WEB CONSULTADAS**

<http://www.eucerin-la.com/mx/la-piel/acerca-de-la-piel/la-piel-y-sus-celulas/la-dermis-corion/> (19 de Septiembre de 2012).

[http://www.infinitefractal.com/movabletype/blogs/my\\_blog/metodos-de-produccion-de-lipos.html](http://www.infinitefractal.com/movabletype/blogs/my_blog/metodos-de-produccion-de-lipos.html)(18 de Octubre de 2008).

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Skinlayers\\_\(espa%C3%B1ol\).png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Skinlayers_(espa%C3%B1ol).png) (5 de Noviembre de 2012).

<http://www.yalemedicalgroup.org/stw/Page.asp?PageID=STW025380> (10 de Noviembre de 2012).

## 10. ANEXO

Comparación múltiple de medias prueba de Tukey

Dependiente Variable	(I) tratami ento	(J) tratami ento				Intervalo de confianza 95%			
			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound		
<b>Permeación final</b>	Tukey HSD	1.00	2.00	-.94974	3.68666	.994	-11.8951	9.9956	
			3.00	-20.89595 <sup>*</sup>	3.68666	.001	-31.8413	-9.9506	
			4.00	-31.86169 <sup>*</sup>	3.68666	.000	-42.8070	-20.9164	
		2.00	1.00	.94974	3.68666	.994	-9.9956	11.8951	
			3.00	-19.94621 <sup>*</sup>	3.68666	.001	-30.8915	-9.0009	
			4.00	-30.91195 <sup>*</sup>	3.68666	.000	-41.8573	-19.9666	
		3.00	1.00	20.89595 <sup>*</sup>	3.68666	.001	9.9506	31.8413	
			2.00	19.94621 <sup>*</sup>	3.68666	.001	9.0009	30.8915	
			4.00	-10.96573 <sup>*</sup>	3.68666	.050	-21.9111	-.0204	
		4.00	1.00	31.86169 <sup>*</sup>	3.68666	.000	20.9164	42.8070	
			2.00	30.91195 <sup>*</sup>	3.68666	.000	19.9666	41.8573	
			3.00	10.96573 <sup>*</sup>	3.68666	.050	.0204	21.9111	
	Bonferroni	1.00	2.00	-.94974	3.68666	1.000	-12.5726	10.6731	
				3.00	-20.89595 <sup>*</sup>	3.68666	.001	-32.5188	-9.2731
				4.00	-31.86169 <sup>*</sup>	3.68666	.000	-43.4845	-20.2388
		2.00	1.00	.94974	3.68666	1.000	-10.6731	12.5726	
				3.00	-19.94621 <sup>*</sup>	3.68666	.001	-31.5691	-8.3234
				4.00	-30.91195 <sup>*</sup>	3.68666	.000	-42.5348	-19.2891
3.00		1.00	20.89595 <sup>*</sup>	3.68666	.001	9.2731	32.5188		
			2.00	19.94621 <sup>*</sup>	3.68666	.001	8.3234	31.5691	
			4.00	-10.96573	3.68666	.070	-22.5886	.6571	
4.00		1.00	31.86169 <sup>*</sup>	3.68666	.000	20.2388	43.4845		
			2.00	30.91195 <sup>*</sup>	3.68666	.000	19.2891	42.5348	
			3.00	10.96573	3.68666	.070	-.6571	22.5886	

<b>Extracción</b>	Tukey HSD	1.00	2.00	-15.93416*	3.47466	.003	-26.2501	-5.6182
			3.00	-11.09063*	3.47466	.034	-21.4066	-.7747
			4.00	-24.19659*	3.47466	.000	-34.5125	-13.8807
		2.00	1.00	15.93416*	3.47466	.003	5.6182	26.2501
			3.00	4.84353	3.47466	.526	-5.4724	15.1595
			4.00	-8.26243	3.47466	.135	-18.5784	2.0535
		3.00	1.00	11.09063*	3.47466	.034	.7747	21.4066
			2.00	-4.84353	3.47466	.526	-15.1595	5.4724
			4.00	-13.10597*	3.47466	.012	-23.4219	-2.7900
		4.00	1.00	24.19659*	3.47466	.000	13.8807	34.5125
			2.00	8.26243	3.47466	.135	-2.0535	18.5784
			3.00	13.10597*	3.47466	.012	2.7900	23.4219
	Bonferroni	1.00	2.00	-15.93416*	3.47466	.004	-26.8887	-4.9797
			3.00	-11.09063*	3.47466	.046	-22.0451	-.1361
			4.00	-24.19659*	3.47466	.000	-35.1511	-13.2421
		2.00	1.00	15.93416*	3.47466	.004	4.9797	26.8887
			3.00	4.84353	3.47466	1.000	-6.1110	15.7980
			4.00	-8.26243	3.47466	.209	-19.2169	2.6921
		3.00	1.00	11.09063*	3.47466	.046	.1361	22.0451
			2.00	-4.84353	3.47466	1.000	-15.7980	6.1110
			4.00	-13.10597*	3.47466	.016	-24.0605	-2.1515
		4.00	1.00	24.19659*	3.47466	.000	13.2421	35.1511
			2.00	8.26243	3.47466	.209	-2.6921	19.2169
			3.00	13.10597*	3.47466	.016	2.1515	24.0605
<b>Flujo</b>	Tukey HSD	1.00	2.00	.19892	.36946	.948	-.8980	1.2958
			3.00	-1.58076*	.36946	.005	-2.6777	-.4839
			4.00	-2.18107*	.36946	.000	-3.2780	-1.0842
		2.00	1.00	-.19892	.36946	.948	-1.2958	.8980
			3.00	-1.77968*	.36946	.002	-2.8766	-.6828
			4.00	-2.37999*	.36946	.000	-3.4769	-1.2831
		3.00	1.00	1.58076*	.36946	.005	.4839	2.6777
			2.00	1.77968*	.36946	.002	.6828	2.8766
			4.00	-.60030	.36946	.402	-1.6972	.4966



	4.00	1.00	2.18107*	.36946	.000	1.0842	3.2780
		2.00	2.37999*	.36946	.000	1.2831	3.4769
		3.00	.60030	.36946	.402	-.4966	1.6972
Bonferroni	1.00	2.00	.19892	.36946	1.000	-.9659	1.3637
		3.00	-1.58076*	.36946	.006	-2.7456	-.4160
		4.00	-2.18107*	.36946	.000	-3.3459	-1.0163
	2.00	1.00	-.19892	.36946	1.000	-1.3637	.9659
		3.00	-1.77968*	.36946	.003	-2.9445	-.6149
		4.00	-2.37999*	.36946	.000	-3.5448	-1.2152
	3.00	1.00	1.58076*	.36946	.006	.4160	2.7456
		2.00	1.77968*	.36946	.003	.6149	2.9445
		4.00	-.60030	.36946	.781	-1.7651	.5645
	4.00	1.00	2.18107*	.36946	.000	1.0163	3.3459
		2.00	2.37999*	.36946	.000	1.2152	3.5448
		3.00	.60030	.36946	.781	-.5645	1.7651

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.