

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**



**ESTUDIOS DE DIFUSIÓN A TRAVÉS DE PIEL DE
FORMULACIONES LIPOSÓMICAS DE ACICLOVIR**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Rosario Gutiérrez Fernández de Molina

Bajo la dirección de los doctores
Manuel Córdoba Díaz
José Ramón Chantres Antoranz

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-695-0627-1

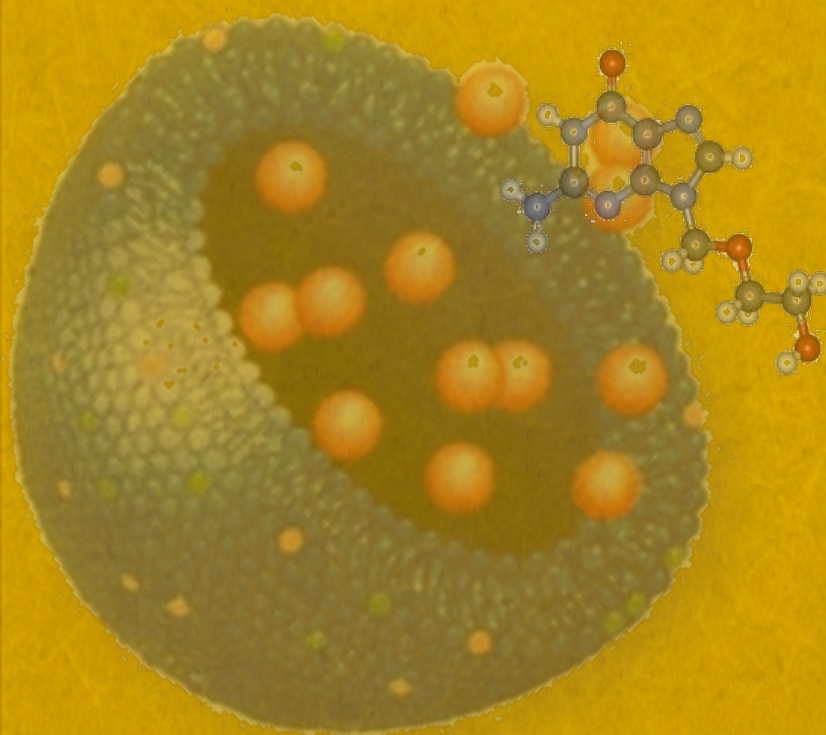
©Rosario Gutiérrez Fernández de Molina, 2011



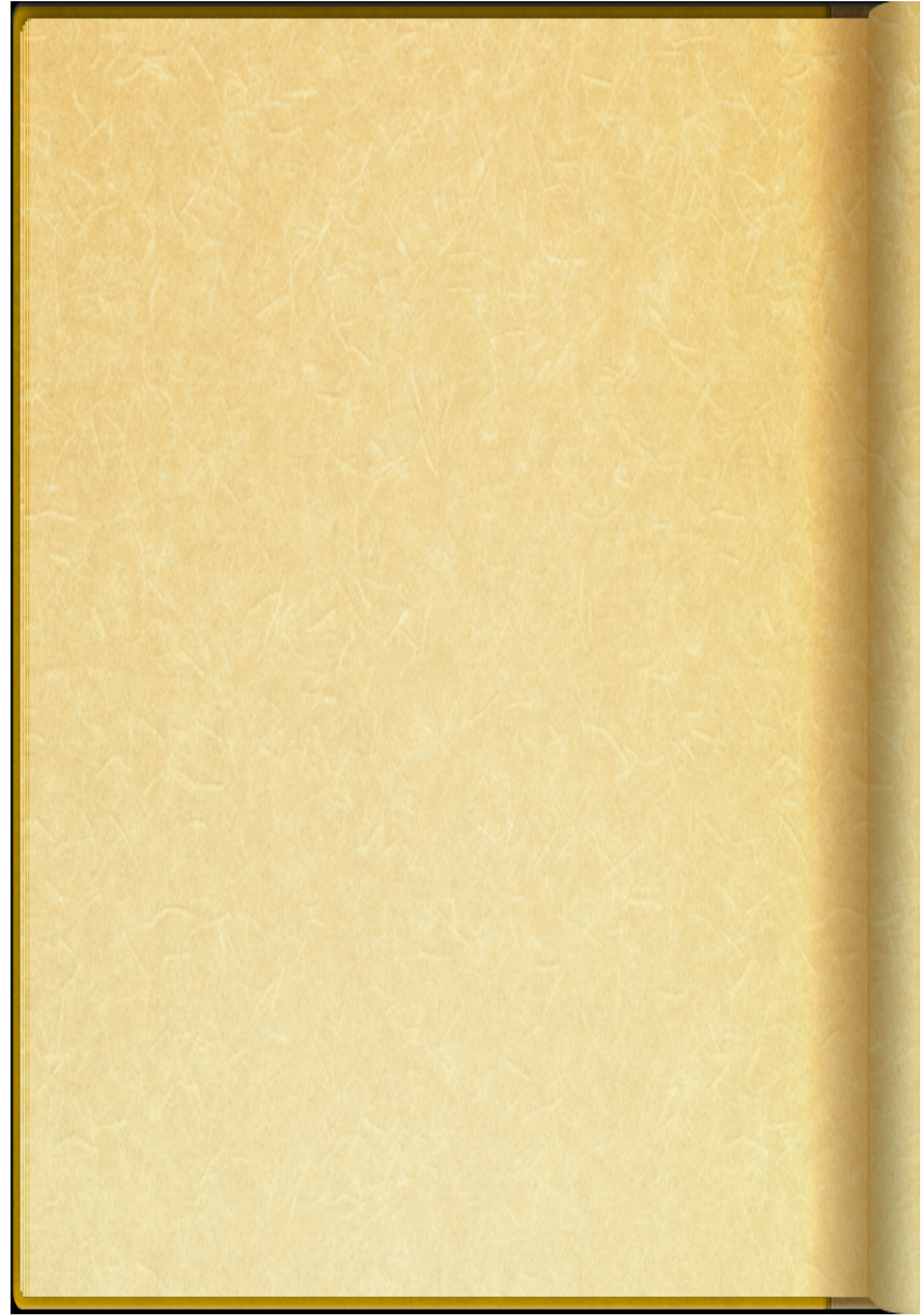
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid

ESTUDIOS DE DIFUSIÓN A TRAVÉS DE PIEL DE FORMULACIONES LIPOSÓMICAS DE ACICLOVIR

ROSARIO GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ DE MOLINA



Madrid, 2011





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

**ESTUDIOS DE DIFUSIÓN A TRAVÉS DE
PIEL DE FORMULACIONES LIPOSÓMICAS
DE ACICLOVIR**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Rosario Gutiérrez Fernández de Molina

Bajo la dirección de los doctores

Manuel Córdoba Díaz y José Ramón Chantres Antoranz

Madrid, 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Pza. de Ramón y Cajal
Ciudad Universitaria
28040 – Madrid
Tel.: 91 3947243
Fax: 91 3941736

D. **MANUEL CÓRDOBA DIAZ**, Doctor en Farmacia y Profesor Titular del Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y D. **JOSÉ RAMÓN CHANTRES ANTORANZ**, Doctor en Farmacia y Profesor Titular jubilado del Dpto. de Química – Física II

CERTIFICAN: que la memoria que se presenta para optar el grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid realizada por la licenciada en Farmacia D^a Rosario Gutiérrez Fernández de Molina, cuyo título es “Estudios de difusión a través de piel de formulaciones liposómicas de aciclovir”, ha sido realizada bajo la dirección de los que suscriben y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que conste a los efectos oportunos lo firmamos en Madrid, a 15 de abril de 2011.

Fdo.: M. Córdoba Díaz

Fdo.: J.R. Chantres Antoranz

AGRADECIMIENTOS

Resulta difícil en unos pocos párrafos poder expresar los agradecimientos ya que han sido muchos años y mucha personas la que ha estado conmigo durante la realización de este proyecto. Quiero empezar agradeciendo a Ramón Chantres la oportunidad que me dio de entrar en su grupo de investigación “*Grupo de Aplicaciones Biomédicas de Liposomas*” y la posibilidad de realizar la tesis doctoral siendo él y Manuel Córdoba mis directores de tesis. Manuel no ha sido sólo mi compañero en la realización del trabajo experimental, sino que ha sido, con mayúsculas, mi director de tesis. Al inicio, me proporcionó algo que para mí fue muy valioso, la estructura de un índice, y desde entonces me ha ayudado con sus conocimientos, planteamientos, me ha proporcionado material de trabajo imprescindible, por supuesto me ha corregido la tesis todo lo que ha hecho falta y me ha mostrado su constante apoyo, disposición y confianza. Ahora, si miro hacia atrás, no me parece posible la elaboración de esta tesis sin su dirección, y le doy las gracias por ello.

Quiero recordar en estos agradecimientos como Ramón junto con Begoña Elorza y Marian Elorza, gracias a su trabajo, dedicación y generosidad crearon el grupo de investigación al que hemos pertenecido Manuel Córdoba, Marta Torre-Enciso, Natalia Hernández, Natalia Diduk, Ioshvany Fernández, Arantxa Bravo, Antonio Alarcón, Sara Alemanno, Damián Córdoba, y yo misma. Durante estos años investigando compartimos muchas experiencias, ilusiones, dudas, risas,...y a todos les agradezco la realización de esta tesis que es el resultado del trabajo de este grupo. Y como no, agradezco también a todos los que forman parte del Departamento de Química-Física II, su acogida y apoyo, han sido muchas horas las que hemos pasado allí, y muchos recuerdos.

Marian Elorza y Begoña Elorza han sido también una parte esencial en la elaboración de esta tesis, no solo por el trabajo que realizaron a nivel de dirección del grupo de investigación, sino también por la ayuda siempre incondicional y muy apreciada que me han proporcionado. A Marian además le agradezco la revisión que ha hecho del trabajo, las sugerencias aportadas y las correcciones realizadas.

Tampoco quiero dejar de mencionar la financiación recibida para realizar este trabajo del Proyecto CICYT (SAF98-0073-C02-01) “*Diseño de liposomas con aciclovir para*

administración endovenosa y dérmica". Caracterización fisicoquímica y evaluación biológica", y los contratos a través de OTRI-UCM con el laboratorio farmacéutico Italfármaco, el cual colaboró trabajando con nosotros intensamente. Este trabajo ha sido posible también gracias a la financiación que obtuve a través de una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario, concedida por la Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica del Ministerio de Educación y Cultura para llevar a cabo el proyecto de Tesis Doctoral.

Durante todos estos años que he estado escribiendo la tesis, lo he hecho con la ilusión de hacer un buen trabajo. En este recorrido, en muchas ocasiones duro, he tenido la suerte de tener personas a mi lado que me han apoyado, han confiado y creído en mí, han sufrido conmigo, han sido comprensivos, me han animado, ayudado, me han dado consejos..... han soportado pacientemente mi excusa eterna “ No puedo ir porque hoy tengo que hacer la tesis” y se han alegrado casi más que yo de ver finalizado este trabajo. Aquí incluyo a mis padres, a toda mi familia, a Raúl, a mis amigos, quiero que cada uno de ellos sepa lo importantes que han sido para mí, y que no se me olvida. Gracias a todos.

A mis padres

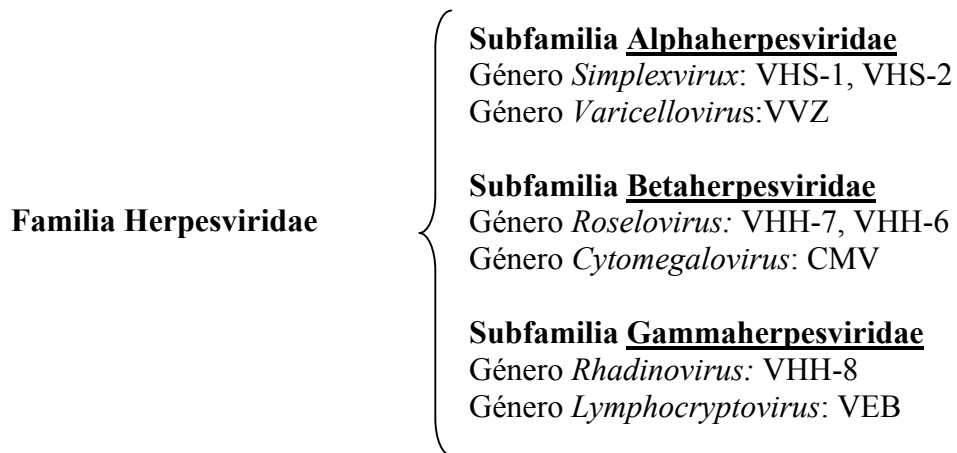
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
II. <u>OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL</u>	13
III. <u>PARTE TEÓRICA: MATERIALES Y MÉTODOS</u>	19
III.1. <u>Estudio general de componentes</u>	21
III.1.1. <u>Principio activo: Aciclovir (ACV)</u>	23
III.1.2. <u>Componentes de formulación</u>	33
III.1.3. <u>Formulación comercial: Zovirax®</u>	43
III.2. <u>La vía tópica como ruta de administración de fármacos</u>	47
III.2.1. <u>Descripción general de la piel</u>	49
III.2.2. <u>El estrato córneo y su función barrera</u>	55
III.2.3. <u>Metabolismo cutáneo</u>	61
III.2.4. <u>Rutas de penetración de xenobióticos a través de la piel</u>	65
III.2.5. <u>Optimización de una formulación de administración tópica</u>	71
III.3. <u>Los liposomas como recurso de formulación</u>	77
III.3.1. <u>Planteamiento general</u>	79
III.3.2. <u>Preparación y caracterización de liposomas en nuestro estudio</u>	103
III.4. <u>Estudios de difusión <i>in vitro</i></u>	111
III.4.1. <u>Planteamiento general de los estudios de difusión <i>in vitro</i></u>	113
III.4.2. <u>Descripción de los estudios llevados a cabo en nuestra memoria</u>	139
III.4.3. <u>Condiciones de preparación de las formulaciones de estudio</u>	157
III.5. <u>Análisis estadístico de resultados</u>	169
IV. <u>PARTE EXPERIMENTAL: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	177
IV.1. <u>Cuadro de trabajo</u>	179
IV.2. <u>Estudios de permeabilidad de bicapas</u> (con membranas hidrófilas)	183
IV.2.1. <u>Estudios con Carboxi-fluoresceína</u>	185
IV.2.2. <u>Ensayos con aciclovir</u>	209
IV.3. <u>Estudios de difusión de aciclovir en geles a través de membranas hidrófilas</u>	229
IV.3.1. <u>Influencia de la viscosidad del gel (geles no liposómicos)</u>	231
IV.3.2. <u>Difusión de aciclovir en geles liposómicos con ACV encapsulado y libre</u>	249
IV.4. <u>Estudios de difusión a través de membranas lipófilas</u>	263
IV.5. <u>Estudios de difusión a través de piel de ratón sin pelo</u>	269
IV.5.1. <u>Estudios con aciclovir libre</u>	271
IV.5.2. <u>Estudios con aciclovir encapsulado</u>	279
IV.5.3. <u>Acumulación en piel viable con formulaciones seleccionadas</u>	289

IV.5.4. <u>Acumulación en piel viable: Influencia de la concentración en compartimento donador con DPPC/COL/DPPG</u>	295
IV.5.5. <u>Acumulación en piel viable: Influencia del tamaño y lamellaridad de vesícula con DPPC/COL/DPPG</u>	301
IV.5.6. <u>Acumulación en piel viable: estudios de difusión <i>in vivo-ex vivo</i></u>	307
IV.6. <u>Estudios de difusión a través de piel humana</u>	315
V. <u>CONCLUSIONES</u>	323
VI. <u>BIBLOGRAFÍA</u>	329

I.

INTRODUCCIÓN

La familia *Herpesviridae* se caracteriza por poseer una serie de propiedades estructurales (doble hebra de ADN, nucleocápside icosaédrico y envoltura glicoproteica), y ciertas propiedades biológicas (ubicuidad, latencia y capacidad de transformar células). El virus del *Herpes simplex* tipo 1 (VHS-1) y 2 (VHS-2), el citomegalovirus humano (CMV), el virus de la varicela zóster (VVZ), el virus de Epstein-Barr (VEB) y el virus del herpes humano (VHH) tipos 6, 7 y 8 pertenecen a esta familia vírica (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004) cuya estructura se resume en el esquema siguiente:



La estructura del virus VHS presenta un genoma compuesto por una doble hebra de ADN. El genoma del virus se rodea por un cápside icosaédrico proteico compuesto por 162 capsómeros y la cubierta más externa del virus se corresponde con una envoltura en cuya bicapa lipídica se encuentran embebidas glicoproteínas virales, a través de las cuales, el virus se adhiere a la célula huésped. Entre la cápside y la envoltura lipídica se localiza el tegumento, de carácter proteico. La estructura genómica del VHS, tanto del tipo 1 como del tipo 2, es similar y la homología de su secuencia genómica alcanza el 50% (Corey, L., *et al.*, 1986), (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004).

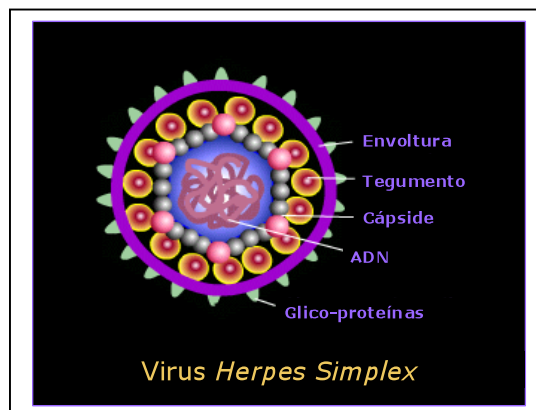


Fig.1. Esquema del virus VHS.

La replicación del virus VHS sigue el siguiente mecanismo: después de adherirse los viriones a la célula huésped se fusionan la envoltura externa viral y la membrana celular liberándose el nucleocápside dentro del citoplasma celular. Posteriormente, tras un desensamblaje controlado del nucleocápside, se desprende el ADN viral, el cual, llega al núcleo celular donde se produce la expresión de tres clases de genes, inmediatamente precoces (alfa), precoces (beta), y tardíos (gamma) en una secuencia temporal regulada de forma que la expresión previa de los primeros es necesaria para la expresión de los siguientes. Los genes inmediatamente precoces son responsables del inicio de la replicación y se transcriben en ausencia de síntesis de proteínas víricas. La mayoría de las proteínas estructurales del VHS son codificadas por los genes tardíos. Tras la replicación del genoma vírico y la síntesis de las proteínas estructurales, el ensamblaje del virus se produce en el núcleo celular. Desde allí, el virus es transportado a través del citoplasma hasta la membrana celular, donde se produce la liberación de los viriones. El VHS contiene en su envoltura glicoproteínas, una de las cuales, provee de especificidad antigénica al VHS, e induce una respuesta de anticuerpos que permite su distinción entre los tipos 1 y 2 (Corey, L., *et al.*, 1986), (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004).

Patogenia del VHS. Tras la exposición de la piel o las mucosas al VHS, éste se replica localmente en las células epiteliales, lo cual, provoca su lisis y desencadena una respuesta inflamatoria produciéndose la característica lesión de la infección que consiste en una vesícula de pared fina sobre una base inflamatoria. Los vasos y ganglios linfáticos regionales se afectan simultáneamente y si la replicación del virus continúa, puede producirse viremia y diseminación visceral sobre todo si el paciente no es inmunocompetente. Tras la infección primaria, el virus, o más probablemente su nucleocápside, es objeto de transporte intraxonal hacia las células de los ganglios sensitivos donde establece la latencia. La reactivación del virus latente está sometida a varios controles no del todo bien conocidos. Puede ser espontánea pero con mayor frecuencia se asocia a estados de inmunosupresión, estrés emocional, cambios hormonales, exposición a los rayos ultravioleta o lesión tisular. Una vez reactivado el virus es transportado de forma anterógrada a través del axón de la célula nerviosa hacia la zona mucocutánea donde produce de nuevo la infección lítica (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004).

Respuesta inmunológica del VHS. La infección por el VHS está influida por mecanismos defensivos del huésped, la inmunidad tanto celular como humoral es clínicamente importante. Se ha observado que los pacientes inmunodeprimidos con defectos en la inmunidad celular

experimentan infecciones más graves por VHS que los pacientes con defectos en la inmunidad humoral (Corey, L., *et al.*, 1986), (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004).

Cuadros clínicos causados por VHS . La mayor parte de las veces la infección producida por estos virus se limita a la superficie mucocutánea, pero en ocasiones produce graves infecciones que afectan al sistema nervioso central (SNC) y otros órganos. Las manifestaciones clínicas de la infección por VHS dependen fundamentalmente de la edad, del estado inmunológico del individuo y del tipo antigénico del virus. En general, los primeros episodios de infección provocan una afectación más extensa de las mucosas y de la piel, se acompañan con frecuencia de signos y síntomas generales, y duran más que los episodios de recidiva (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004).

Infecciones orofaciales: la mayoría de los casos de infección orofaríngea por VHS corresponde a la infección por VHS-1. Aunque la primoinfección por VHS suele ser asintomática, con cierta frecuencia produce gingivostomatitis y faringitis, mientras que la reactivación produce fundamentalmente afectación labial (herpes labial). La gingivostomatitis por VHS-1 es una infección del niño y adolescente que se acompaña generalmente de fiebre, malestar general, mialgias y adenopatía cervical. La lesión mucosa puede afectar el paladar, la lengua, los labios y el área facial. La reactivación de la infección por VHS a partir del ganglio del trigémino suele provocar el clásico herpes labial, que cursa con escozor, dolor y la aparición de vesículas que evolucionan a costra (2-3 días) y que se acompañan de una adenopatía submandibular dolorosa.

Herpes genital: el herpes está causado en el 60-70% de los casos por VHS-2 y el resto, por VHS-1. En los casos en los que la primoinfección es sintomática, el cuadro clínico suele caracterizarse por la presencia de fiebre, malestar general, mialgias, disuria, dolor local y adenopatía inguinal dolorosa que acompaña la aparición de las clásicas vesículas y úlceras que se extienden por el cérvix, la uretra y los genitales externos en la mujer y por el glande en el hombre.

Encefalitis herpética: el VHS-1 es responsable de la mayoría de los casos de encefalitis herpética. La presentación clínica de la encefalitis herpética es aguda, con fiebre, cefalea y signos de focalidad neurológica, sobre todo referidos al lóbulo temporal.

Queratitis herpética: la infección por VHS es causa frecuente de úlcera corneal. El cuadro clínico suele tener un comienzo agudo, con dolor ocular intenso, visión borrosa, conjuntivitis y la aparición al examen con lámpara de hendidura de una lesión dendrítica corneal característica.

Panadizo herpético: la infección por VHS de los dedos ocurre por la inoculación del herpes labial o genital a través de una herida de la piel. El cuadro clínico es de comienzo brusco y consiste en edema, eritema, dolor y lesiones vesiculares en el dedo afectado. Suele haber fiebre, linfadenitis y adenopatías regionales.

Infecciones neonatales: la infección por VHS del recién nacido es una contingencia rara, pero cuando se presenta se asocia con una alta incidencia de infección diseminada con afectación del SNC y de otros órganos. La infección del recién nacido es mayoritariamente producida por el VHS-2.

Infección herpética en el paciente inmunodeprimido: los pacientes inmunodeprimidos, incluyendo los grandes quemados con enfermedades difusas de la piel, corren el riesgo de padecer infecciones graves por VHS. En pacientes sometidos a transplante de órganos la infección puede ser asintomática, aparecer en forma de herpes genital u orofaríngeo, provocar esofagitis, neumonitis, traqueobronquitis, hepatitis o infección diseminada. En pacientes con neoplasias hematológicas, la infección provoca la aparición de cuadros mucocutáneos graves. Las infecciones graves por VHS son relativamente comunes en los pacientes con síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), en los que se han descrito esofagitis, colitis, neumonitis, afectación del sistema central, úlceras orales, genitales y perianales. En pacientes quemados o con enfermedades difusas de la piel se puede presentar lesiones cutáneas graves de la piel.

Tratamiento de las infecciones herpética por VHS. La mayoría de los fármacos antivirales disponibles para tratar las infecciones producidas por estos virus son análogos de nucleósidos que al ingresar en la célula huésped son fosforilados e inhiben la síntesis de ADN del virus. El principio activo aciclovir (ACV) es el prototipo de este grupo de fármacos. Otros antivirales que utilizan este mecanismo de acción son penciclovir, trifluridina, e idoxiuridina. El fármaco foscarnet, análogo orgánico del pirofosfato inorgánico, inhibe directamente a la ADN

polimerasa y, es el tratamiento de elección de las infecciones por virus del herpes resistentes al aciclovir (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004), (Lebel, A., *et al.*, 2006).

El ACV es un análogo acíclico del nucleósido natural 2´deoxiguanosina, que presenta una potente actividad *in vitro* frente al VHS, con una incidencia de efectos adversos relativamente baja. Por ello se ha convertido en el tratamiento antiherpes de referencia. Valaciclovir (valiéster del aciclovir) es un profármaco que se transforma en aciclovir en el intestino e hígado durante la absorción oral (Departamento Técnico del CGCOF, 2010). Cuando la infección vírica por VHS se limita a la piel se considera de especial interés la administración tópica del ACV al presentar una serie de ventajas potenciales frente a la administración sistémica como son la comodidad del paciente, la obtención de altos niveles de principio activo en la zona máxima replicación viral (capa basal de la epidermis) y por lo tanto una mayor eficacia terapéutica. Además, la vectorización específica del agente antiviral a la zona diana, supone una reducción del coste y de los efectos colaterales del fármaco causados por la exposición sistémica (Spruance, S.L. *et al.* 1990). Sin embargo, con las formulaciones tópicas de ACV comerciales se ha observado una falta de eficacia que se ha relacionado con un inadecuado reparto del principio activo a la piel (Parry, G.E. *et al.*, 1992), (Seth, A.K., *et al.*, 2003).

La barrera limitante en la terapia tópica del ACV reside en el estrato córneo (Spruance, S.L. *et al.*, 1990), capa más externa de la piel cuya función principal es la prevención de la pérdida de agua y la absorción de xenobióticos. Está constituida por células muertas rellenas de queratina (corneocitos) embebidas en una matriz lipídica, en la cual, la inusual composición y disposición física de los lípidos intercelulares, ha sido relacionada con la función de barrera de la capa córnea (Schaefer, H. *et al.*, 1996b). Además la molécula de ACV no presenta unas características, deducidas a partir de la primera ley de Fick, óptimas para la penetración en piel (Barry, B.W, 2001), y no se dispone por vía tópica, de un profármaco adecuado de dicha molécula que resuelva el problema de forma satisfactoria. Así, la mejora en el tratamiento tópico del VHS con el ACV se basa en otros aspectos relacionados con la optimización de formulaciones dérmicas.

Se han empleado diversas estrategias en la optimización de una formulación tópica, cuyo fin en todas ellas es facilitar el paso de principio activo a través del estrato córneo, aunque la más utilizada ha sido el uso de promotores químicos de la penetración que disminuyen

temporalmente la función de barrera de la capa córnea. Como principal inconveniente destaca que muchos de los promotores son irritantes e interfieren con células viables de la piel, aspecto que reduce su uso únicamente a aquellos que se consideran benignos para la piel (Barry, B.W, 2001), y a partir de los cuales, no siempre se consiguen resultados adecuados. Actualmente, algunas formulaciones tópicas existentes de ACV contienen promotores de la penetración aunque hasta ahora los beneficios clínicos obtenidos han sido escasos (Wagstaff, A.J, *et al.*, 1994), (Departamento Técnico del CGCOF, 2010). La necesidad, asociada a las ventajas de utilización de la vía cutánea, de conseguir concentraciones altas de principio activo en la capa basal de la epidermis a partir de una formulación tópica de ACV impulsa la búsqueda de nuevos promotores químicos de penetración o bien de otras estrategias (Akomeah, F.K. *et al.*, 2008), como el uso de vesículas (Barry, B.W., 2001). La relativa baja eficacia del ACV a partir de preparaciones tópicas atribuido a la baja permeabilidad cutánea del principio activo relacionada con su carácter hidrofílico (Akomeah, F.K. *et al.*, 2008), hacen pensar en el empleo de liposomas como vehículo del ACV en una posible estrategia mediante la cual se puede conseguir una mejora en la administración tópica de dicho compuesto.

Los liposomas, son sistemas coloidales que consisten en una o más bicapas lipídicas que atrapan un cierto volumen acuoso. Dichas vesículas se introdujeron en los años 70 como vehículos de principios activos destacando la capacidad de incorporar a su estructura una amplia variedad de fármacos, hidrofílicos, lipofílicos y anfifílicos. La baja toxicidad y la biodegradabilidad de estas estructuras son ventajas adicionales que suscitan el interés por la tecnología de liposomas. Se ha estudiado el empleo de formulaciones liposómicas en varias rutas de administración, siendo especialmente en la administración intravenosa y tópica donde se ha conseguido, en numerosos casos, mejores resultados (Egbaria, K., *et al.*, 1990a), (Lasic, D.D., 1998), (Brandl, M., 2001). Dentro de los aspectos que engloba la tecnología del liposoma destacamos la formación de los liposomas, su caracterización físico química y formulación que conlleva todo ello, el uso de numerosas técnicas (Lasic, D.D., 1998), (Brandl, M., 2001).

Uno de los métodos más controvertidos para aumentar el transporte de diversos principios activos a través de la barrera natural de la piel es el uso de vesículas lipídicas. Los liposomas pueden ejercer diferentes funciones tras una aplicación tópica, como mejorar la acumulación de principios activos en piel buscando un efecto localizado, proporcionar un reparto de

principio activo dirigido a los anexos cutáneos, y potenciar el reparto transdérmico al incrementar las concentraciones sistémicas de la molécula en estudio (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2006), (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2008).

A partir de los primeros estudios realizados por Mezei y colaboradores (Mezei, M., *et al.*, 1980), (Mezei, M. *et al.*, 1982), se demostró la capacidad de modificación del coeficiente de reparto (vehículo: piel) de diversos principios activos a partir de formulaciones liposómicas comparado con la aplicación del compuesto en un sistema convencional. Estos primeros estudios indicaron un efecto localizado de principio activo en piel, si bien, en posteriores investigaciones no sólo se ha buscado obtener dicho efecto a partir de vesículas, sino también potenciar el reparto transdérmico o el reparto dirigido a los anexos cutáneos. En cambio, sobre los mecanismos de acción de los liposomas, existen diversas especulaciones, como una penetración del principio activo libre una vez fuera de la vesícula, conseguir un efecto promotor de la penetración, o una penetración intacta de la vesícula. El Magharaby y col. resumieron en su estudio los diferentes funciones que pueden tener los liposomas tras una aplicación tópica, así como los posibles mecanismos de acción. (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha estudiado cómo influyen las características físico químicas de las vesículas en la penetración de diversos principios activos (Du Plessis, J., *et al.*, 1994a), (Kirjavainen, M. *et al.*, 1996), (Coderch, L., *et al.*, 2000), (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2001a), (Verma, D.D., *et al.*, 2003a), (Honeywell-Nguyen, P.L., *et al.*, 2005). Sin embargo, la gran cantidad de datos obtenidos y la escasa posibilidad de comparación entre los mismos debido a la gran variedad de condiciones experimentales empleadas originan diversidad de opiniones en la interpretación de ciertos aspectos.

En los estudios de absorción percutánea de un principio activo, se han empleado tanto métodos *in vivo* como *in vitro*. En la mayoría de los ensayos *in vivo* las cantidades de principio activo en sangre son muy bajas de modo que los resultados son determinados generalmente de forma indirecta mediante la cuantificación en orina o heces del compuesto o metabolito marcado con radioactividad. Sin embargo, este método no es aplicable en humanos a partir de compuestos que son tóxicos y no se absorben o se excretan de manera eficiente. Además en este tipo de estudios hay que tener en cuenta el coste y tiempo empleado. Con el fin de medir la absorción percutánea minimizando los inconvenientes, se han desarrollado una serie de protocolos alternativos *in vivo* como, entre otros, el establecimiento de la correlación entre la función reservoria del estrato córneo y la absorción percutánea (mediante la técnica

de stripping), o la estimación de la absorción a partir de la respuesta farmacológica/biológica por parte del principio activo (como la vasoconstricción en el caso de corticosteroides). Actualmente, el procedimiento más utilizado en la evaluación de la absorción percutánea de fármacos es el diseño de estudios *in vitro* mediante el uso de celdas de difusión. Entre las ventajas de la experimentación *in vitro* destacan la posibilidad de controlar las condiciones experimentales de una manera precisa, así como de estudiar sustancias potencialmente peligrosas utilizando piel humana, obtener información sobre la absorción y distribución de un principio activo en las distintas capas de piel, y la capacidad de determinar el flujo de absorción directamente debajo de la membrana. Por otra parte, entre las desventajas se encuentra el vacío de información sobre los parámetros farmacocinéticos una vez que ha penetrado el principio activo (Bronaugh, R.L, 1989), (Schaefer, H. *et al.*, 1996d), (Brain, K.R., *et al.*, 1998), (Touitou, E., *et al.*, 1998), (Wester, R.C., *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos a partir de la experimentación *in vitro* deben provenir de procedimientos que simulan las condiciones *in vivo* lo más cercana y razonablemente posible. A diferencia de las celdas de difusión horizontales que provocan una excesiva hidratación del estrato córneo en ensayos donde se determina, generalmente, el coeficiente de permeabilidad de compuestos (Durrheim, H., *et al.*, 1980), la celda de difusión de Franz (estática) (Franz, T.J, 1975) se diseñó con el objetivo de estudiar la absorción percutánea mimetizando las condiciones *in vivo* al estar la membrana, por su lado epidérmico, expuesta a las condiciones ambientales. Posteriormente, se diseñó una celda de difusión de flujo continuo (dinámica) donde además se imitaban las condiciones sumidero simulando más fielmente las condiciones *in vivo* (Bronaugh, R.L, *et al.*, 1985) al retirar el medio receptor que fluye bajo la piel el material absorbido a través de la membrana. Se ha recomendado el uso de piel humana frente al de piel animal evitando de este modo la extrapolación de datos (Bronaugh, R.L, 1989). Por otra parte, una serie de membranas sintéticas artificiales se han evaluado como modelos en los estudios de penetración a través de la piel ofreciendo la posibilidad de proporcionar un sistema menos variable y más disponible en relación con la piel natural (Brain, K.R., *et al.*, 1998). Dentro de otros factores experimentales que intervienen en este tipo de ensayos se incluyen la preparación de la membrana (piel entera o en secciones), la viabilidad de la piel, la integridad de la membrana, la elección del líquido receptor, el método de aplicación (dosis finita/dosis infinita), el tiempo de duración del experimento y los métodos de cuantificación de principios activos en piel, (Brain, K.R., *et al.*, 1998), (Bronaugh, R.L *et al.*, 1999) siendo la

cuantificación del ACV en la capa basal de la epidermis complicada (Parry, G.E., *et al.*, 1992).

La creencia de que el transporte a través de la piel de distintos compuestos se produce principalmente por mecanismos de difusión pasiva, hace posible aplicar las leyes de difusión de Fick a los experimentos de difusión *in vitro*. Dichos estudios, pueden utilizar dosis infinitas y dosis finitas. La determinación de la capacidad intrínseca de los compuestos para atravesar el estrato córneo mediante el cálculo del coeficiente de permeabilidad (a partir de la primera ley de Fick) o la modificación de dicho coeficiente una vez incorporados en formulaciones se obtiene en general, en ensayos realizados en condiciones de dosis infinitas donde se alcanza el estado estacionario. Por otra parte, en ensayos que simulan las condiciones *in vivo*, dosis finitas (que responden a la segunda ley de Fick), son parámetros relevantes en la predicción de la absorción percutánea la cantidad de principio activo absorbida acumulada, el tiempo que se tarda en alcanzar el flujo máximo y el valor de flujo máximo (Guy, R.H., *et al.*, 1989), (Schaefer, H., *et al.*, 1996d).

No hay que olvidar en este tipo de estudios que la relevancia de los resultados obtenidos a partir de los estudios *in vitro* no es siempre evidente debido a varios motivos como, por ejemplo, el no imitar fielmente las condiciones de evaporación en la superficie de la piel o la función de barrera del tejido enfermo. Sumado dicho aspecto, a la falta de modelos de animales apropiados en muchas enfermedades, el último paso en la optimización de una formulación está basado en la realización de ensayos clínicos (Schaefer, H., *et al.*, 1996e), (Seth, A.K., *et al.*, 2003).

II.

OBJETIVOS Y
PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

El principal objetivo del presente estudio experimental es el desarrollo de una formulación liposómica de ACV cuya finalidad terapéutica es el tratamiento tópico de infecciones causadas por VHS-1 y VHS-2. En este tipo de infecciones es necesario conseguir concentraciones eficaces de principio activo en la capa basal de la epidermis, zona diana del tratamiento al ser la zona de máxima replicación del virus. La mayor dificultad se encuentra en la barrera limitante que ofrece a la difusión del principio activo el estrato córneo. La evaluación de la penetración de ACV en piel a partir de las diferentes formulaciones liposómicas en estudio se realizará mediante ensayos de difusión *in vitro* utilizando celdas de difusión de flujo continuo.

Mediante las técnicas de análisis adecuadas, se determinarán las características fisicoquímicas que definen a la formulación liposómica y que pueden influir en el comportamiento de la vesícula en la piel, como son el tamaño de la vesícula, el potencial zeta (ζ), concentración lipídica de la bicapa, concentración de principio activo en la formulación, y eficiencia de encapsulación. Teniendo en cuenta el diseño de una formulación de aplicación tópica con una consistencia adecuada, también se prepararán en el presente estudio geles liposómicos. La permeabilidad del principio activo encapsulado en función de la bicapa lipídica del liposoma y la influencia de la formación de un sistema tipo gel en dicho proceso se determinará a través de la experimentación *in vitro* con celdas de difusión de flujo continuo utilizando dosis finitas, condiciones oclusivas y membranas hidrófilas. Previo al estudio de la permeabilidad del principio activo en geles liposómicos, se realizará una batería de ensayos con geles de ACV con diferente concentración de agente gelificante con el fin de seleccionar aquella concentración que ofrezca menor resistencia a la difusión del principio activo. Las cantidades cedidas acumuladas de principio activo en el compartimento receptor en función del tiempo (perfiles de cesión), el cálculo del coeficiente de permeabilidad (K_p) y la constante de velocidad de salida del liposoma (K_1) son parámetros indicativos de la permeabilidad de la molécula. En este tipo de estudios se estimarán los parámetros mediante ajustes de modelos matemáticos a los datos experimentales obtenidos.

En los estudios de difusión *in vitro* que determinan la acumulación en piel del principio activo y su difusión a receptor, se emplearán en función del diseño del experimento membranas de difusión de diferente naturaleza y procedencia, simulando las condiciones *in vivo*, y empleando dosis finitas y condiciones no oclusivas. Antes de iniciar los ensayos con

piel natural (de origen humano o animal) a la que se le ha retirado por disección el tejido subcutáneo, se utilizará piel artificial, tipo de membrana con unas características definidas que constituye un sistema reproducible y de fácil manejo. Seguidamente, y debido a la poca disponibilidad de piel humana y variabilidad inherente en estudios realizados con este tipo de piel, se llevarán a cabo baterías de ensayos de difusión *in vitro* a través de un modelo de piel animal adecuado, piel de ratón sin pelo. A lo largo de toda la serie de ensayos realizados se estudiará la capacidad promotora de los liposomas, así como, la influencia de las características físicoquímicas de las vesículas (composición de bicapa, tamaño y lameridad de la vesícula, carga superficial, y eficiencia de encapsulación), concentración de la formulación donadora y encapsulación del principio activo en liposomas (frente al principio activo libre en el medio de dispersión de las vesículas), sobre la acumulación del ACV en piel o en piel viable (piel a la que se le ha retirado el estrato córneo mediante la técnica de stripping una vez finalizado el ensayo). Teniendo en cuenta la necesidad de conseguir concentraciones efectivas de principio activo en la capa basal de la epidermis, zona de acción del virus VHS, se realizarán también estudios de difusión *in vivo- ex vivo* siguiendo un régimen múltiple de dosis finitas (simulando la administración *in vivo*), con el fin de estimar la concentración de principio activo en la capa basal de la epidermis. Por último se llevarán a cabo los ensayos de difusión con piel humana, evitando la extrapolación de datos desde un modelo de piel animal. En dichos ensayos, se estudiará la acumulación de ACV en diferentes profundidades de la piel cuantificando el principio activo acumulado en láminas cutáneas, obtenidas mediante criotomo una vez finalizado el ensayo, y se realizará un estudio comparativo de las formulaciones en estudio frente a la formulación comercial de referencia.

A modo de resumen de todo lo expuesto anteriormente, el objetivo principal, se centra en el diseño de una formulación tópica de ACV en la que se logren concentraciones eficaces de fármaco en la capa basal de la epidermis y a tiempos cortos para impedir la replicación del virus. Para ello, se selecciona, entre otras alternativas, la tecnología de liposomas.

Para la consecución de este objetivo se diseña el siguiente planteamiento experimental:

1. Cálculo de las constantes de salida del ACV de liposomas de distinta composición. Estudios de permeabilidad de bicapas mediante ensayos de difusión con membranas inertes.

2. Estudio de la capacidad de retención de geles de ACV y de geles liposómicos
3. Experimentos de difusión con diferentes composiciones de liposomas de ACV a través de piel natural (ratón sin pelo): primera selección de bicapas
4. Experimentos de difusión con formulaciones seleccionadas de entre las estudiadas en el punto 3 a través de piel natural (ratón sin pelo): estudio de acumulación de ACV en piel epidermis (sin estrato córneo)
5. Estudios de difusión en piel humana con formulaciones de liposomas de bicapa lipídica fluida.

III.

PARTE TEÓRICA:
MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.

ESTUDIO GENERAL DE **COMPONENTES**

III.1.1.

Principio activo: Aciclovir

El aciclovir (ACV) es un análogo acíclico del nucleósido natural 2' deoxiguanosina que inhibe selectivamente la replicación de los virus ADN del grupo herpes con una baja toxicidad celular (Wagstaff, A.J., *et al.*, 1994).

Características Físicoquímicas

Se presenta como un polvo blanco y cristalino, que debe almacenarse en recipientes herméticamente cerrados. Su fórmula molecular es $C_8H_{11}N_5O_3$ poseyendo un peso molecular de 225,2 g/mol. Químicamente puede nombrarse como 9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina (Reynolds, J.E.F., 1996), su fórmula estructural se representa en la **Fig. 2**.

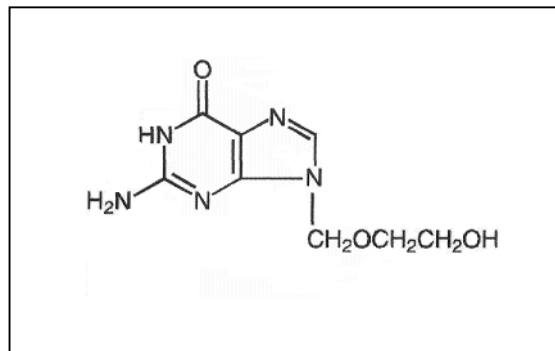


Fig 2. Estructura química desarrollada del ACV.

El ACV presenta una baja solubilidad en agua siendo del orden de 1,5 mg/mL a 25 °C y 2,7 mg/mL a 35 °C, y una solubilidad en solución amortiguadora HEPES (utilizada en la memoria de tesis actual) a pH 7,4 del orden de 1,7 mg/mL a 25°C y 2,0 mg/mL a 30°C (Bravo, A., 2001). Se trata de un compuesto prácticamente insoluble en alcohol y en la mayoría de los solventes orgánicos, y soluble en soluciones acuosas diluidas de hidróxidos alcalinos y de ácidos minerales (Reynolds, J.E.F., 1996). Tiene un punto de fusión de 256,6-257°C y presenta dos pKa en torno a 2,40 y 9,20 (Kristl, A. *et al.*, 1989), (Kristl, A. *et al.*, 1993). El ACV utilizado en el presente trabajo experimental fue suministrado por Heumann Pharma GmbH (0008700) con una pureza certificada superior al 99%.

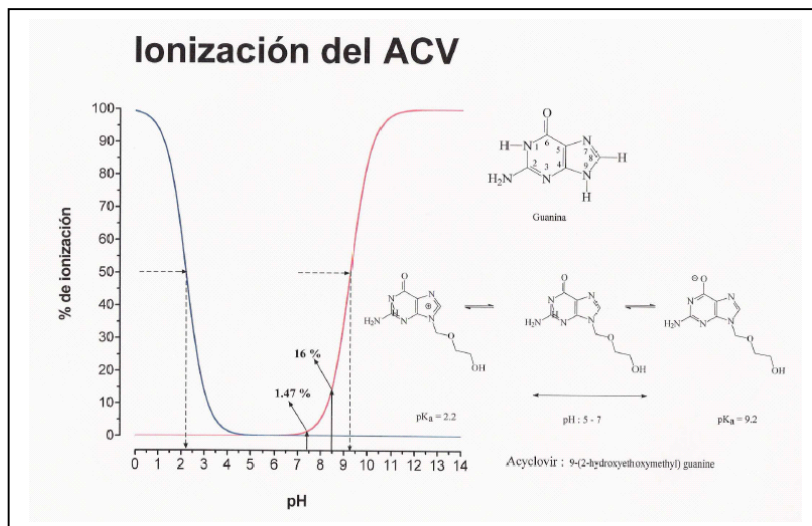


Fig. 3. Curva de ionización del ACV.

El aciclovir sódico (ACVNa) es la sal sódica del ACV. Se presenta como un polvo blanco y cristalino siendo su fórmula molecular $C_8H_{11}N_5NaO_3$ y su peso molecular de 247,2 g/mol. 1,1g de ACVNa equivalen a 1g de ACV. El nombre químico de la molécula es 9-(2-hidroxietoximetil)guanina sódico (Reynolds, J.E.F., 1996), su fórmula estructural se representa en la **Fig. 4**.

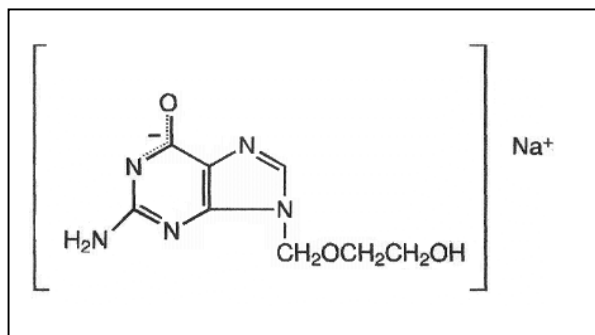


Fig. 4. Estructura química desarrollada del ACVNa.

El ACVNa es mucho más soluble en agua que el ACV. Así su solubilidad ronda en torno a 1 parte por cada 10 de agua (Reynolds, J.E.F., 1996), excediendo los 100 mg/mL. Al igual que el ACV, el ACVNa utilizado en el presente trabajo experimental fue suministrado por Heumann Pharma GmbH (9905824) con una pureza certificada superior al 99%.

Actividad antiviral, mecanismo de acción y latencia

Se ha demostrado que el ACV presenta actividad antiviral *in vitro* frente a los virus, *Herpes simplex* tipo 1 (VHS-1) y tipo 2 (VHS-2), el virus de la varicela – zóster (VVZ), el virus de Epstein Barr (EBV), el virus del herpes humano 6 (VHH-6) y el citomegalovirus (CMV), nombrados en orden decreciente de susceptibilidad (Wagstaff, A.J., *et al.*, 1994), (Reynolds, J.E.F., 1996). La actividad antiviral del ACV es consecuencia de su efecto bloqueante en la síntesis de ADN al actuar como inhibidor de la ADN-polimerasa vírica, así como al interrumpir la cadena incorporarse al ADN vírico. El ACV es captado por la célula huésped y convertido por la timidina quinasa vírica en monofosfato de ACV. Posteriormente, las enzimas celulares mediante una fosforilación consecutiva, transforman el monofosfato de ACV, en difosfato de ACV y por último, en su metabolito activo el trifosfato de ACV. La mayor o menor potencia antivírica del aciclovir frente a a los diferentes herpesvirus depende de la aidez de la timidina quinasa vírica por el aciclovir y del grado de inhibición del trifosfato de aciclovir sobre la ADN-polimerasa del virus. El mecanismo de acción del ACV es altamente selectivo presentando una baja toxicidad en las células sanas debido a, la mínima fosforilación a su forma monofosfato efectuada por las enzimas celulares, y a la mayor sensibilidad de la ADN polimerasa vírica, comparada con la de la célula huésped, a la inhibición por el ACV trifosfato (Elion, G.B., 1982), (Wagstaff, A.J, *et al.*, 1994), (Reynolds, J.E.F., 1996).

Los virus del grupo herpes se caracterizan por su capacidad de permanecer latentes después de infectar, siendo el sitio de latencia para los VHS las células de los ganglios sensitivos. Las causas por las que el virus se reactiva está sometida a controles no bien conocidos. En los VHS puede ser espontánea, pero con mayor frecuencia se asocia a estados de inmunosupresión, estrés emocional, cambios hormonales, exposición a los rayos ultravioletas o lesión tisular (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004). El ACV no presenta actividad frente al virus latente, pero hay cierta evidencia de que podría inhibir el virus *Herpes simplex* latente en las primeras etapas de la reactivación (Reynolds, J.E.F., 1996).

Características farmacocinéticas

La farmacocinética del ACV administrado por vía intravenosa se describe mediante un modelo abierto bicompartimental, no viéndose afectada la disposición farmacocinética del principio activo por factores como la dosis, duración o frecuencia de administración. El ACV administrado por vía oral tiene una absorción lenta, variable e incompleta, presentando una biodisponibilidad oral entre el 15 y el 30 %. La absorción percutánea del ACV es baja y está muy influenciada por la formulación utilizada. El reparto del principio activo a la capa basal de la epidermis (zona de infección del VHS) a partir de la administración tópica es inferior a la obtenida a partir de la administración oral. Existe una considerable penetración intraocular a partir de la pomada oftálmica (Wagstaff, A.J, *et al.*, 1994), (Reynolds, J.E.F, 1996).

El ACV se distribuye a una amplia variedad de tejidos y fluidos, incluyendo el líquido cefaloraquídeo, atraviesa la placenta y se acumula en la leche materna. Su unión a las proteínas se encuentra en un rango entre el 9 y el 33% y es independiente de las concentraciones plasmáticas del principio activo (Wagstaff, A.J, *et al.*, 1994), (Reynolds, J.E.F., 1996). La excreción renal es la principal ruta de eliminación del ACV siendo su semivida plasmática de 2-3 horas en sujetos con capacidad renal normal. La mayoría de la dosis de ACV es excretada sin metabolizar en orina. Su principal metabolito, 9-carboximetoximetil guanina, es farmacológicamente inactivo y aparece en orina hasta un porcentaje del 14%. La dosis debe ajustarse en pacientes con aclaramientos de creatinina inferiores a 50ml/min. El ACV es un principio activo hemodializable (Wagstaff, A.J, *et al.*, 1994), (Reynolds, J.E.F., 1996).

Efectos adversos

El ACV es un fármaco bien tolerado en todas sus rutas de administración: oral, intravenosa tópica y ocular. La incidencia de la mayoría de los efectos adversos que aparecen tras la terapia oral (síntomas gastrointestinales, erupciones cutáneas, cefaleas) es pequeña y similar en pacientes que han recibido placebo. Excepcionalmente, se ha relacionado la aparición de insuficiencia renal y neurotoxicidad con este tipo de administración (Wagstaff, A.J, *et al.*, 1994), (Reynolds, J.E.F., 1996), (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004).

Por vía intravenosa, la inflamación y flebitis en el lugar de inyección son los efectos adversos más frecuentes. Sin embargo, hay que tener en cuenta dos importantes reacciones asociadas a este tipo de administración: efectos neurológicos y/o psiquiátricos e insuficiencia renal reversible, ambos problemas asociados a concentraciones plasmáticas altas de ACV (Wagstaff, A.J, *et al.*, 1994), (Reynolds, J.E.F., 1996), (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004).

Las reacciones adversas en administración tópica son limitadas fundamentalmente a efectos locales leves (Wagstaff, A.J, *et al.*, 1994), (Reynolds, J.E.F., 1996), (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004).

Utilidad terapéutica

El ACV es usado principalmente en el tratamiento de las infecciones producidas por VHS y VVZ donde la actividad que presenta el ACV *in vitro* es en general similar o mayor que la mayoría de los agentes utilizados en este tipo de infecciones (Wagstaff, A.J, *et al.*, 1994).

Infecciones por VHS

Actualmente, la administración de ACV por vía oral o intravenosa es una de las indicaciones más frecuentes en el tratamiento de la infección primaria por herpes genital (causado principalmente por VHS-2) siendo su eficacia muy modesta en las infecciones recurrentes. Por otra parte, la administración crónica de ACV disminuye la aparición del herpes genital recurrente, aunque el número de recidivas vuelve a ser el mismo cuando se suspende el tratamiento antivírico (Wagstaff, A.J, *et al.*, 1994), (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004), (Departamento Técnico del CGCOF, 2010).

El tratamiento de infecciones mucocutáneas de *Herpes simplex* en pacientes inmunodeprimidos, ha resultado eficaz tras la administración del ACV por vía oral o intravenoso. En este tipo de infecciones también se ha utilizado la administración de ACV de manera profiláctica (Wagstaff, A.J, *et al.*, 1994), (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004), (Departamento Técnico del CGCOF, 2010).

La administración de ACV por vía intravenosa constituye el tratamiento de elección en la encefalitis por *Herpes simplex* (VHS-1 es responsable de la mayoría de los casos de encefalitis herpética). Las infección por *Herpes simplex* neonatal (mayoritariamente

producida por el VHS-2) parece responder clínicamente a la terapia de ACV intravenoso con una baja toxicidad asociada. En pacientes inmunocompetentes con infecciones graves por *Herpes simplex* la terapia parenteral con ACV es una de las de primera elección (Wagstaff, A.J., *et al.*, 1994), (Departamento Técnico del CGCOF, 2010).

En cuanto la utilidad terapéutica del ACV por vía tópica, se ha demostrado su eficacia en el tratamiento de queratitis por *Herpes simplex* mediante aplicación oftálmica especialmente cuando existe una afectación profunda (Departamento Técnico del CGCOF, 2010). También se ha observado su utilidad en la prevención de la queratitis herpética recurrente tras una queratoplastia penetrante, siendo en este caso el ACV sistémico por vía oral más efectivo que el ACV tópico (Ghosh, S *et al.*, 2008). En casos de herpes genital primario o de infecciones mucocutáneas en inmunodeprimidos por VHS, su eficacia es inferior por vía tópica a las formulaciones orales o parenterales. Referente al herpes labial, consecuencia de la reactivación del VHS (fundamentalmente el VHS-1) tras la infección orofaríngea los beneficios del ACV en general y particularmente en los preparados tópicos, parecen muy escasos con las formulaciones hasta ahora utilizadas (Wagstaff, A.J., *et al.*, 1994), (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004), (Departamento Técnico del CGCOF, 2010). Un estudio clínico realizado con una formulación liposómica de ACV preparada a partir de etosomas, demostró la eficacia clínica de dicha formulación en el tratamiento del herpes labial recurrente (Horwitz, E., *et al.*, 1999).

Infecciones por VVZ

El virus de la VVZ origina dos entidades clínicas diferentes. La varicela originada cuando el organismo se pone en contacto con el virus por primera vez y el herpes zóster resultado de la reactivación del virus latente tras la primoinfección. El VVZ es menos sensible al ACV que el VHS, por lo que en el tratamiento de las infecciones por este virus deben utilizarse dosis sustancialmente más elevadas. La administración de ACV intravenoso (y oral en menor medida) en pacientes inmunodeprimidos con varicela o herpes zóster es capaz de reducir la frecuencia de la diseminación cutánea y las complicaciones viscerales. En el paciente inmunocompetente la eficacia del ACV muy modesta y supeditada al inicio del tratamiento (Bermejo, C.L., *et al.*, 2004).

Administración y Dosificación

La terapia con ACV debe iniciarse lo antes posible una vez que aparecen los síntomas de la enfermedad. La administración intravenosa del ACV se realiza por infusión lenta durante una hora con la hidratación suficiente para proporcionar un adecuado flujo de orina que prevenga la precipitación del principio activo en los túbulos renales, evitándose, la inyección en bolus o rápida. En la aplicación tópica del ACV se recomienda lavarse o protegerse las manos evitando la autoinoculación a otras partes del cuerpo y la transmisión de la infección a otras personas (Wagstaff, A.J, *et al.*, 1994), (Reynolds, J.E.F, 1996). Las dosis recomendadas en los diversos tratamientos con ACV se establecen como norma orientativa en mg/día o en mg/kg/día según tipo de administración, variando las dosis y el periodo de tratamiento según la indicación (Departamento Técnico del CGCOF, 2010).

Limitaciones del ACV en el tratamiento tópico de infecciones cutáneas por VHS

Limitaciones en la actividad antiviral: Derivado de su propio mecanismo de acción, cabe reseñar que el ACV NO INACTIVA LOS VIRIONES LIBRES, siendo el objetivo del tratamiento la máxima supresión de la replicación viral con el fin de no infectar células adicionales. Aunque la potencia de un principio activo antiviral se mide normalmente como la cantidad de inhibición de replicación viral *in vitro* al 50% (ID₅₀), el uso del parámetro ID₉₉ es más relevante *in vivo* para conseguir una rápida supresión de la extensión viral, de forma que son necesarias altas concentraciones de principio activo en el lugar de acción. Se ha estudiado *in vitro* la interacción entre la célula huésped, el ACV y el VHS observándose que las variables experimentales multiplicidad de la infección, tiempo de administración del principio activo en relación al ciclo de replicación viral, permissividad de la línea celular, concentración del fármaco y cepa del virus influyen en la actividad del principio activo (Spruance, S.L, *et al.*, 1990).

Limitaciones en la penetración del estrato córneo: El paso limitante en la administración tópica de ACV en la infección cutánea por VHS es su absorción a través de la potente barrera anatómica que constituye el estrato córneo, que se encuentra entre el lugar de aplicación y el de infección, que se corresponde con las células de la capa basal de la epidermis. El fármaco debe llegar al sitio diana con unas concentraciones inhibitorias eficaces durante el estado precoz del desarrollo de la lesión (síntomas prodromales o eritema focal), penetrando la piel

intacta. En cambio, cuando el principio activo atraviesa con menos dificultad la piel dañada y la lesión ha progresado a estados vesiculares y ulcerosos, es demasiado tarde para esperar un beneficio del tratamiento antiviral (Spruance, S.L, *et al.*, 1990).

III.1.2.

Componentes de formulación

III.1.2.1. Componentes de la bicapa lipídica

- Fosfatidilcolina:

La familia de las fosfatidilcolinas (**Fig. 5**) constituye el fosfolípido mayoritario para la preparación de los liposomas. Está constituido por un esqueleto de glicerol que presenta el grupo hidroxilo (en posición 3) esterificado por el ácido fosfórico, el cual, a su vez se une a la colina formando la cabeza polar de la molécula y, los otros dos grupos hidroxilo (en posición 1 y 2) esterificados por ácidos grasos cuyas cadenas hidrocarbonadas constituyen la zona apolar de los fosfolípidos y le dan nombre. La carga negativa del fosfato a pH fisiológico se neutraliza con la carga positiva del amonio de la colina constituyendo la PC un zwitterion que confiere carga neutra a la bicapa lipídica. Dichos fosfolípidos se caracterizan por su origen (PC de soja, huevo, sintético) y la temperatura de transición de fase (T_c) que determina a que temperatura la membrana pasa de un estado gel (rígido), a un estado cristal líquido (fluido) (New, R.R.C., 1990a), (Brandl, M., 2001). Dicho parámetro es especialmente relevante en estudios como el nuestro ya que condiciona la permeabilidad de la bicapa liposómica al paso del o de los principios activos en función de la temperatura.

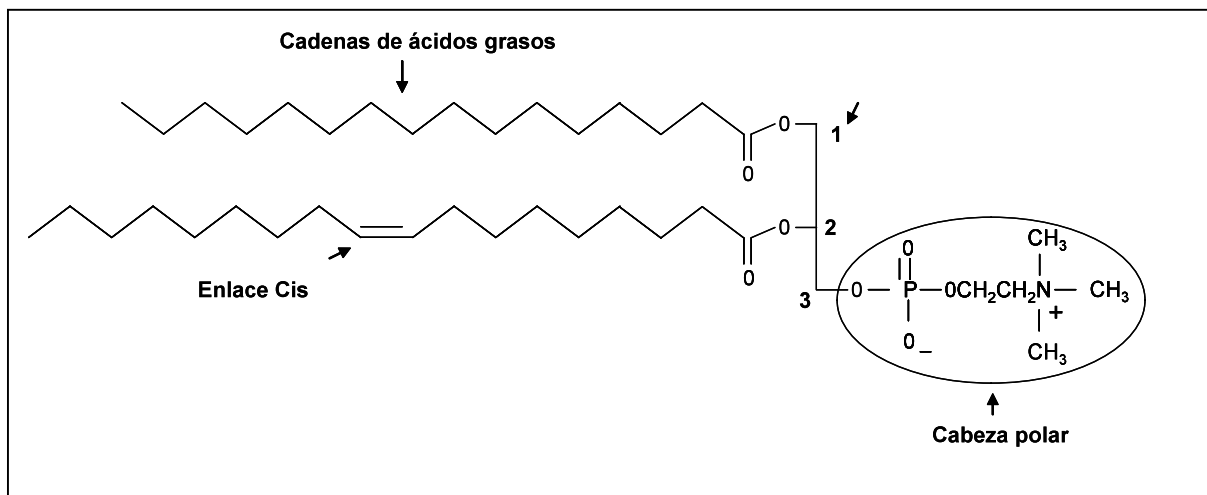


Fig. 5. Estructura de una fosfatidilcolina.

1-palmitil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC): Polvo blanco de origen sintético suministrado por Chemi con una pureza contrastada. Su fórmula molecular es $C_{42}H_{82}NO_8P$ con una masa molecular de $760,1 \text{ g mol}^{-1}$. Según especificaciones del fabricante debe almacenarse a una temperatura de -20°C en atmósfera de nitrógeno. La cabeza polar de la molécula (fosfocolina) se une al grupo glicerol en la posición 3, mientras que los ácidos

grasos palmítico (C16:0), saturado, cuya longitud de cadena es de 16 átomos de carbonos (C), y oleico (C18:1) con una longitud de cadena de 18C y un doble enlace cis en el C9, se unen a la posición 1 y 2, respectivamente, del esqueleto del glicerol. Presenta una Tc de -4°C (Marsh, D., 1990).

1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC): De origen sintético, se presenta con una apariencia semisólida de elevada viscosidad con un color de blanco a ligeramente amarillo. Suministrado por Chemi con una pureza contrastada, su fórmula molecular es $C_{44}H_{84}NO_8P$ con una masa molecular de 786.1 g mol^{-1} . Debe almacenarse a una temperatura de -20°C en atmósfera de nitrógeno. En esta molécula, el grupo glicerol queda unido en la posición 3 a la cabeza polar (fosfocolina), y en la posición 1 y 2 al ácido oleico (C18:1), presentando una Tc de -19°C (Marsh, D., 1990).

1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC): Polvo blanco de origen sintético suministrado por Chemi con una pureza contrastada. Su fórmula molecular es $C_{40}H_{80}NO_8P$ con una masa molecular de $734,05 \text{ g mol}^{-1}$. Debe almacenarse a una temperatura de -20°C. El grupo glicerol de la molécula queda unido en la posición 3 a la cabeza polar (fosfocolina), y en la posición 1 y 2 al ácido palmítico (C16:0). Presenta una temperatura de transición de fase de 41,5 °C (Marsh, D., 1990).

Fosfatidilcolina de soja hidrogenada (H-SPC): De origen semisintético se presenta con una apariencia de sólido aglomerado con un color ligeramente amarillo. Suministrado por Lipoid, con una pureza contrastada, y una masa molecular de 762.1 g mol^{-1} . Debe almacenarse a una temperatura de -20°C. En esta molécula, el grupo glicerol queda unido en la posición 3 a la cabeza polar (fosfocolina), y en la posición 1 y 2 a ácidos grasos saturados en un porcentaje de un 13% de ácido palmítico (C16:0) y un 86% de ácido esteárico (C18:0). Presenta una Tc semejante a la Tc de 54,5 °C de la DSPC (1,2 – Diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), (Marsh, D., 1990).

- Otros componentes de la bicapa lipídica

1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] sal sódica (DPPG.Na): Fosfolípido que confiere carga negativa a la bicapa lipídica . Polvo blanco-grisáceo de origen sintético suministrado por Chemi con una pureza contrastada. Su fórmula molecular es $C_{38}H_{74}O_{10}NaP$ con una masa molecular de 745 g mol^{-1} . Debe almacenarse a una temperatura de -20°C . En esta molécula, el grupo glicerol queda unido en la posición 3 a la cabeza polar (fosfoglicerol), y en la posición 1 y 2 al ácido palmítico ($C_{16:0}$), presentando una T_c de $41,5^{\circ}\text{C}$ (Marsh, D., 1990).

Estearilamina (SA). Sustancia lipídica que confiere carga positiva a la bicapa lipídica constituido por una amina unida covalentemente al ácido esteárico ($C_{18:0}$). Sólido cristalizado suministrado por Sigma con una pureza contrastada. Su fórmula molecular es $C_{18}H_{39}N$ con una masa molecular de $269,5 \text{ g mol}^{-1}$. Debe almacenarse a temperatura ambiente.

Colesterol (COL): Lípido que modifica la fluidez de la bicapa lipídica caracterizado por la presencia de un grupo 3β hidroxilo, un núcleo plano esteroídico y una cadena alifática, componentes esenciales en su comportamiento característico en la bicapa lipídica (New, R.R.C., 1990a). Se presenta como una sustancia pulverulenta de color blanco. Suministrado por Sigma con una pureza contrastada, su fórmula molecular es $C_{27}H_{46}O$ con una masa molecular de $386,64 \text{ g mol}^{-1}$. Debe almacenarse a temperaturas inferiores a 0°C .

III.1.2.2. Soluciones acuosas

Se usó siempre agua purificada MilliQ® (> de 18 MΩcm) (Millipore Molsheim France).

- Solución amortiguadora HEPES (N-[2-hidroxi-etil] piperazina-N'-[2-ácido etanosulfónico]), sustancia sólida que fue suministrada por Sigma-Aldrich Ibérica con una pureza mínima del 99,5% y una masa molecular de 238,3 g mol⁻¹. Las soluciones amortiguadoras se prepararon en agua ajustando a un pH de 6.

- En determinados casos se utilizó una solución amortiguadora HEPES- Salino, añadiendo cloruro sódico (NaCl) para obtener así una solución amortiguadora de pH de concentración 150 mM /300Mm en NaCl y una osmolaridad de 300/600 mOsm Kg⁻¹ respectivamente. El cloruro sódico fue suministrado por Panreac con una pureza mayor del 99% y una masa molecular de 58,44 g mol⁻¹ Las medidas de osmolalidad se realizaron en un osmómetro Knauer. Esta solución amortiguadora Hepes-salino se usaba cuando se buscaba la misma osmolaridad en el interior acuoso del liposoma y la solución acuosa externa en la que estaban dispersos.

- Solución amortiguadora fosfato salina (PBS) (0,005M KH₂PO₄, 0,005M K₂HPO₄, 0,138M NaCl, 0,0027M KCl) con un pH 7,4 y una osmolaridad de 290 mOsm Kg⁻¹, fue suministrado por Sigma-Aldrich Ibérica. Todas las soluciones de tampón fosfato se prepararon en agua MilliQ. Las medidas de osmolalidad se realizaron en un osmómetro Knauer.

III.1.2.3. Excipientes empleados en la elaboración de geles

- Carbopol® (o Carbomer ®) (carboxipolimetileno): constituido por polímeros sintéticos de ácido acrílico, de alto peso molecular, de cadenas entrecruzadas y copolimerizados con alilsucrosa o éteres de pentaeritritol. Se presenta como un polvo blanco, higroscópico, ácido, de aspecto sedoso, con un ligero olor característico. Contiene entre un 56 y un 68% de grupos de ácido carboxílico (COOH) respecto a su base seca. Es soluble en agua, y una vez neutralizado, en etanol (95%) y glicerina. El punto de fusión es de 260 °C. Tiene un pH entre 2,7 y 3,5 en dispersiones acuosas al 0,5% (p/v) y un pH entre 2,5 y 3 en dispersiones acuosas al 1% . La densidad aparente del producto es de 1,7 g/cm³ y la apelmazada es 1,4 g/cm³. El contenido normal de humedad es inferior al 2% (p/p). Sin embargo, el Carbopol® es un compuesto higroscópico y el contenido de humedad a la temperatura de 25°C y 50% de humedad relativa es del 8-10% (p/p). El tamaño medio de las partículas primarias es alrededor de 0,2 µm de diámetro y de las partículas floculadas está entre 2 y 7 µm, las cuales no se pueden descomponer en las partículas primarias. Se utiliza como agente gelificante (0,5-2%) (aumentando viscosidad), suspensor (0,5-1%), emulsificante (0,1-0,5%) y aglutinante (5-10%) en formulaciones farmacéuticas (Koleng, J.J, *et al.*, 2006).

El Carbopol ® al dispersarse en agua forma soluciones ácidas coloidales de baja viscosidad. Tras la neutralización se origina un incremento en la viscosidad dando lugar a una red tridimensional que constituye la estructura de gel (**Fig. 6**). Como agentes neutralizantes se utilizan ciertos aminoácidos, el borato sódico, hidróxido de potasio, bicarbonato sódico, hidróxido sódico y aminas polares orgánicas, como la trietanolamina, laurilamina y estearilamina. Una vez neutralizado, el gel acuoso Carbopol® presenta la máxima viscosidad a un pH entre 6 y 11 siendo la misma considerablemente reducida si el pH es menor que 3 o mayor que 12 o en presencia de electrolitos fuertes. Los geles pierden rápidamente viscosidad al ser expuestos a la luz ultravioleta, minimizándose esta reducción por la adición de un antioxidante o por la utilización de trietanolamina como agente neutralizante (Koleng, J.J, *et al.*, 2006).

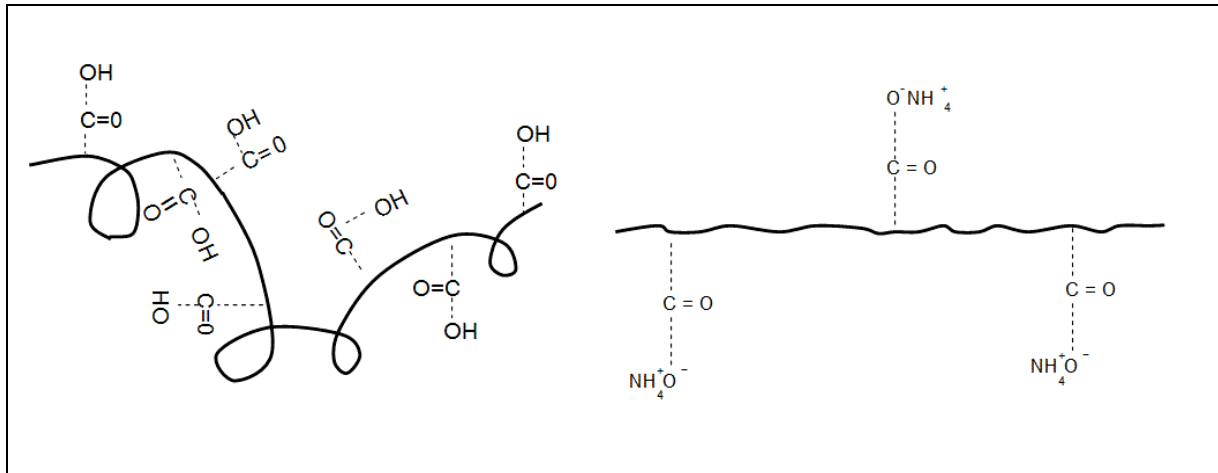


Fig. 6. Representación esquemática del polímero de Carbopol® antes y después de la neutralización.

Las dispersiones acuosas de Carbopol® constituyen un soporte de fácil crecimiento de microorganismos siendo necesario la adición de conservantes apropiados. En este sentido, los geles acuosos pueden esterilizarse por autoclave. A temperatura ambiente y en condiciones adecuadas, las dispersiones de Carbopol® mantienen su viscosidad durante periodos de tiempo largos. El polvo de Carbopol® debe ser almacenado en un recipiente hermético y resistente a la corrosión en un lugar frío y seco (Koleng, J.J., *et al.*, 2006).

Se encuentran comercializados diferentes tipos de Carbopol®, los cuales varían en su peso molecular, grado de entrecruzamiento de las cadenas, estructura polimérica y componentes residuales. Estas características dan lugar a las propiedades reológicas particulares de cada producto. El benceno es el solvente utilizado normalmente en la polimerización, sin embargo, existen formas de Carbopol® preparados únicamente con etilacetato o mezcla de etilacetato/ciclohexano (Koleng, J.J., *et al.*, 2006). En nuestro estudio seleccionamos el Carbopol® 980, suministrado por BF Goodrich que presenta una viscosidad de 22,95 cps a una concentración de 0,2% (p/v en agua) y de 49,8 cps a una concentración del 0,5% (p/v en agua) y un porcentaje de etilacetato y ciclohexano, únicos solventes utilizados en la fabricación del producto, del 0,21 y 0,03 respectivamente.

- Kathon® CG: Conservante, suministrado por Rhöm and Haas, utilizado en la preparación de gel de Carbopol®. Es una formulación específica de ingredientes activos (5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona (1,15%) y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (0,35%)) y sales inertes de magnesio (cloruro y nitrato) (23%) en solución acuosa. Se presenta como un líquido claro de color APHA ≤ 50 y de olor moderado con un pH entre 1,5 y 3. Su estabilidad es al menos de un año

a temperatura ambiente y por lo menos de 6 meses a 50°C. Es totalmente miscible en agua, alcoholes y glicoles inferiores y tiene baja solubilidad en hidrocarburos. La concentración de uso máxima recomendada es de 0,1% en peso de producto (15 ppm de ingrediente activo) en los productos de enjuague y de un 0,05% (7,5 ppm de ingrediente activo) en los productos sin enjuague. Debe evitarse su uso en productos destinados al contacto directo con membranas mucosas. Entre las recomendaciones para la formulación con el conservante Kathon® CG se encuentra evitar temperaturas superiores a 50°C una vez incorporado el conservante y la presencia de un pH ligeramente ácido aunque es estable hasta pH = 8.

- Trietanolamina: Agente neutralizante, suministrado por Merck, utilizado en la preparación del gel de Carbopol®. Se presenta como un líquido con una pureza superior al 99%. Su fórmula molecular es $N(CH_2CH_2OH)_3$ poseyendo una masa molecular de 149,19g/mol. Se almacena entre 15 y 25°C.

III.1.3.

Formulación comercial

En el presente trabajo se ha utilizado como formulación de referencia Zovirax® crema (Titular de la autorización de la comercialización GlaxoSmithkline, S.A y Responsable de la fabricación Glaxo Wellcome Operations) que pertenece al grupo de medicamentos llamados antivirales. Cada gramo de crema contiene 50 mg de aciclovir. Los demás componentes de esta formulación son Poloxámero 407, alcohol cetosteárico, laurilsulfato de sodio, parafina blanca blanda, parafina líquida, propilenglicol, dimeticona 20, arlacel 165 y agua purificada. Su fórmula patentada contiene un 40% de propilenglicol frente a otras fórmulas que contienen un máximo del 30%. Diversos autores (Trottet, L., *et al.*, 2005) demostraron en sus estudios de difusión en piel una mayor penetración del ACV en piel a partir del Zovirax, conteniendo un 40% de propilenglicol, frente a formulaciones comerciales genéricas de ACV con un contenido en su formulación de propilenglicol del 15% o menor.

Zovirax® crema está indicada en el tratamiento de infecciones de piel producidas por el virus del *Herpes simplex* incluyendo herpes labial y herpes genital inicial y sus recaídas. No se recomienda el uso cutáneo de ACV en membranas mucosas como boca, ojo o vagina, ya que puede ser irritante. Se debe aplicar cinco veces al día, aproximadamente cada cuatro horas omitiendo la aplicación de la noche, en las lesiones o en las lesiones inminentes lo antes posible tras el comienzo de la infección. Es importante comenzar el tratamiento de los episodios recurrentes durante el periodo durante el cual todavía no han aparecido las lesiones o cuando las lesiones aparecen por primera vez. El tratamiento se debe continuar durante cinco días, o en el caso de no producirse la curación, puede prolongarse hasta un total de 10 días. Puede tener efectos adversos poco frecuentes, como quemazón o picazón pasajeros tras la aplicación de la crema, leve sequedad o descamación de la piel y sensación de picor, efectos adversos raros como eritema y dermatitis de contacto o efectos adversos muy raros como reacciones de hipersensibilidad inmediata incluyendo angioedema. Zovirax® crema no debe conservarse a una temperatura superior a 25°C, ni debe refrigerarse.

III.2.

LA VÍA TÓPICA COMO RUTA DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

III.2.1.

Descripción general de la piel

La piel es el órgano más extenso del organismo cuya principal función es proteger el cuerpo contra la pérdida de material endógeno al exterior, así como, del impacto físico y químico del ambiente externo. No presenta una superficie uniforme, el área superficial expuesta aumenta aproximadamente un 30% por la presencia de pequeñas arrugas (inexistentes en las palmas de las manos y los pies), de modo que en las aplicaciones tónicas no se cubre uniformemente la superficie aplicada. La piel está constituida por tres capas superpuestas: la epidermis, formada por el estrato córneo y la epidermis viable, la dermis y la hipodermis. Debido a que las células en el estrato córneo son células muertas, la epidermis sin el estrato córneo se denomina epidermis viable (Schaefer, H. *et al.*, 1996a), (El Maghraby, G.M, *et al.*, 2008). La estructura general se muestra en la **Fig. 7**.

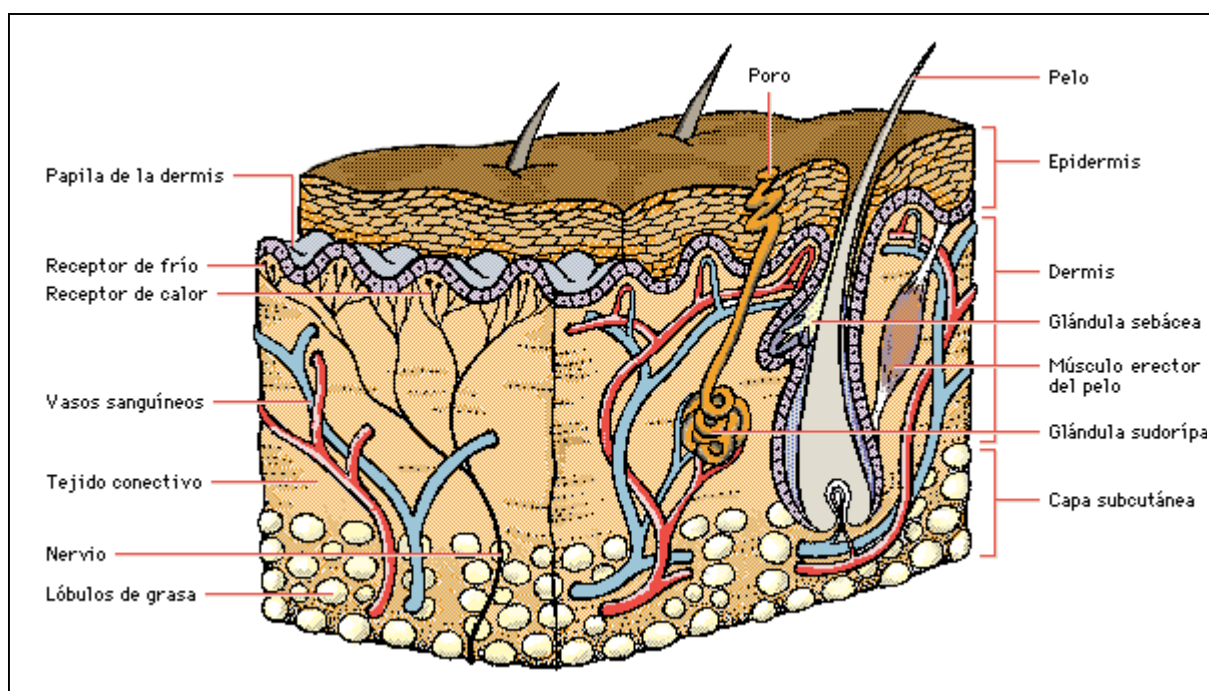


Fig. 7. Esquema general de la piel.

La estructura y función de las diferentes zonas de la piel son las siguientes:

- Estrato córneo: constituye la principal barrera frente a la absorción de xenobióticos. Es la capa más delgada y superficial de la piel presentando un bajo grado de hidratación, donde los lípidos localizados en los espacios intercelulares desempeñan un papel muy importante en la resistencia que se ofrece a la penetración (Schaefer, H. *et al.*, 1996a), (Schaefer, H. *et al.*, 1996b), (Wertz, P.W *et al.*, 1998), (Bouwstra, J.A., *et al.*, 2003), (El Maghraby, G.M, *et al.*, 2008). Esta capa de la piel se trata de forma más extensa en el apartado **III.2.2**.

- Epidermis viable: Subyacente al estrato córneo es la capa responsable de la formación de la barrera de la piel constituida por un epitelio estratificado (de dentro a afuera estrato basal, espinoso y granuloso), queratinizado y no vascularizado que descansa sobre la dermis. Interpuesta entre la dermis y la epidermis se encuentra una membrana extracelular, denominada lámina basal, que mantiene la unión entre ellas, y cuya superficie ondulada, aumenta la superficie de contacto. Debido a la ausencia de una red vascular en la epidermis las células vivas de este epitelio reciben sus nutrientes desde los capilares dérmicos (situados en la parte alta de la dermis, junto a la epidermis) por la difusión pasiva de sustancias a través de la membrana basal al fluido intersticial (Elias, J.J, 1989), (Schaefer, H. *et al.*, 1996a). Cabe destacar en el contexto del presente trabajo que el lugar de acción del ACV es la capa basal de la epidermis, donde se localizan las células diana en la infección del VHS (Spruance, S.L, *et al.*, 1990).

- Dermis: Se trata de la capa más voluminosa de la piel. Condiciona la elasticidad y tensión de la piel mediante una malla de fibras, y tejido conectivo amorfo. Además, proporciona un soporte físico a la red vascular (vasos sanguíneos y linfáticos) y red nerviosa que la constituye (Schaefer, H. *et al.*, 1996a), (Foldvari, M., 2000).

- Hipodermis: Es la región más profunda de la piel y se encuentra constituida por una malla de células grasas (adipocitos) dispuestas en lóbulos. Dicha región presenta un importante papel en el almacenamiento de energía y metabolismo, así como, en el aislamiento y protección contra los golpes (Schaefer, H. *et al.*, 1996a).

- Anexos cutáneos de la piel: distinguimos entre folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas. Se originan en la dermis e hipodermis y perforan el estrato córneo constituyendo zonas de discontinuidad en la integridad del estrato córneo. Son responsables de varias funciones, en las que se incluyen un control térmico y una cubierta de protección en la piel (Schaefer, H. *et al.*, 1996a).

- Glándulas sudoríparas: están constituidas por una porción secretora, tubo muy contorneado sobre sí mismo, y un canal secretor. Este anexo cutáneo secreta una solución casi isotónica donde los electrolitos son reciclados activamente por la glándula dando lugar a la hipotonicidad del sudor. La evaporación de esta secreción en la superficie de la piel tiene un

papel importante en la regulación de la temperatura (Poirier, J., *et al.*, 1985), (Elias, J.J, 1989), (Schaefer, H. *et al.*, 1996a).

- Folículos pilosos: formados a partir de una invaginación tubular de la epidermis que se hunde en la dermis y tejido subcutáneo, constituyendo la vaina epitelial externa. La invaginación epidérmica se abulta, en su parte más profunda, formando una masa de células matrices que rodean y cubren una papila de tejido conectivo muy vascularizada. Las células matrices proliferan y son empujadas hacia la superficie diferenciándose en el pelo propiamente dicho que se rodea por la vaina epitelial interna (Poirier, J., *et al.*, 1985), (Elias, J.J, 1989), (Schaefer, H. *et al.*, 1996a).

- Glándulas sebáceas: La mayoría se encuentran asociadas al folículo piloso, a nivel dérmico, a través de su corto canal secretor constituyendo la unidad pilosebácea. Esta glándula alveolar de tipo holocrino secreta sebo dentro del canal del folículo el cual fluye hacia la superficie como resultado de la lisis de los sebocitos dentro de las glándulas. Dicha secreción presenta una composición lipídica característica de cada especie (Poirier, J., *et al.*, 1985), (Elias, J.J, 1989), (Schaefer, H. *et al.*, 1996a), (Wertz, P.W. *et al.*, 1998), (Lauer, A.C, 1999).

III.2.2.

El estrato córneo y su función **barrera**

Debido a la importancia del estrato córneo, en el contexto del presente trabajo, como principal barrera limitante de absorción de xenobióticos se describe de forma detallada la estructura y composición de dicha capa de piel.

El estrato córneo, constituido por células rellenas de queratina (corneocitos) embebidas en una matriz de lípido, presenta una estructura que ha sido comparada a un modelo bicompartimental representado (**Fig. 8**) de forma simplificada por un muro de ladrillos, que representan los corneocitos, y por la argamasa, que representa los lípidos intercelulares, los cuales, forman un dominio continuo cuya disposición proporciona un camino tortuoso para la difusión de las moléculas (Elias, J.J, 1989), (Schaefer, H. *et al.*, 1996b), (Wertz, P.W *et al.*,1998), (Foldvari, M., 2000), (El Maghraby, G.M, *et al.*, 2008).

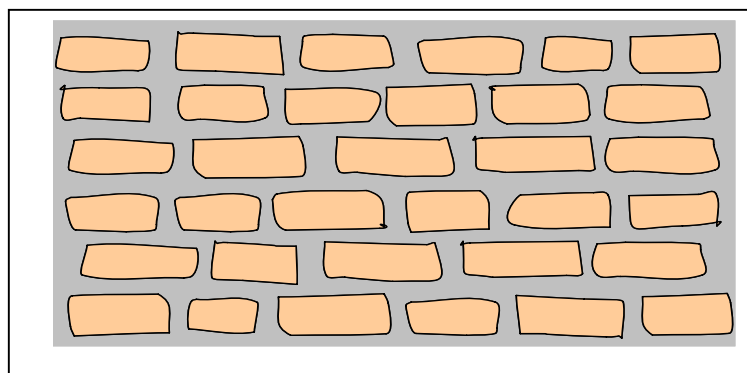


Fig. 8. Representación esquemática del estrato córneo (Schaefer, H. *et al.*, 1996b).

El estrato córneo posee un 15% de agua, un 70% de proteínas y un 15% de lípido aproximadamente, lo que le confiere unas propiedades diferentes de las de la epidermis, dermis u otros tejidos viables. Presenta un pH en torno a 5,5 (Schaefer, H. *et al.*, 1996b), (Sznitowska, M. *et al.*, 2001), y se ha demostrado la capacidad tamponante que posee, lo cual influye en el estado de ionización de compuestos en el estrato córneo y la absorción percutánea de xenobióticos con carácter ácido o base débil (Schaefer, H. *et al.*, 1996b).

Los corneocitos son células poliédricas planas no nucleadas formadas, principalmente, por haces de queratina rodeados por una envoltura celular compuesta por proteínas entrelazadas y limitada por lípidos ligados covalentemente a la misma. Los corneocitos se encuentran interconectados entre sí por estructuras polares, como los corneodesmosomas, que

contribuyen a la cohesión de los mismos (Schaefer, H. *et al.*, 1996a), (Schaefer, H. *et al.*, 1996b), (Wertz, P.W *et al.*, 1998), (Bouwstra, J.A., *et al.*, 2003).

La principales lípidos intercelulares que se han encontrado en el estrato córneo son ceramidas, colesterol, ácidos grasos libres y pequeñas proporciones de sulfato de colesterol composición que difiere de la observada en las membranas celulares. La estructura de los espacios lipídicos intercelulares ha sido evaluada por numerosas técnicas que incluyen la microscopía electrónica freeze-fracture (criofactura) y de transmisión, difracción de rayos X y electrones, calorimetría diferencial de barrido y espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier. . Los lípidos intercelulares están organizados en lamelas dispuestas paralelamente a la superficie. La organización lipídica en fases preferentemente cristalinas y la presencia de una unidad lamelar de 13nm se han considerado aspectos cruciales en la función barrera de la piel. Tanto la composición química como la disposición física de los lípidos intercelulares en el estrato córneo es inusual y proporciona una mayor resistencia a la difusión que las membranas de lípido generales (Schaefer, H. *et al.*, 1996b), (Wertz, P. *et al.*, 1998), (Bouwstra, J.A., *et al.*, 2003).

Las capas más altas del estrato córneo contienen también lípidos derivados de las secreciones sebáceas. No hay evidencias de que influyan significativamente en la permeabilidad de la barrera de la piel ya que existen como fase líquida, y no son lípidos anfipáticos, no pudiéndose incorporar de una manera efectiva en la estructura lamelar del lípido intercelular (Schaefer, H. *et al.*, 1996b), (Wertz, P.W. *et al.*, 1998).

Una característica del estrato córneo es el bajo grado de hidratación que presenta. El compartimento interno de los corneocitos es la principal zona de atrapamiento del agua. La cantidad de agua en el estrato córneo está influenciada por la humedad del ambiente, presencia de sustancias hidratantes, emulgentes, condiciones fisiológicas como la edad y condiciones patológicas. Con niveles fisiológicos de agua, no parece haber cambios en la estructura de los dominios del lípido intercelular, en el grosor del estrato córneo o en su función como barrera. En cambio se sabe que, cuando el estrato córneo se hidrata experimentalmente sobre el 30 y 40%, la función de barrera de la piel disminuye progresivamente (Schaefer, H. *et al.*, 1996b). Este hecho debe ser tenido en cuenta en los estudios de difusión a través de la piel ya que unas condiciones de trabajo oclusivas pueden

alterar las características de hidratación del estrato córneo y modificar los resultados del experimento.

La síntesis fisiológica del estrato córneo a partir de la epidermis viable se realiza a través de un proceso de diferenciación celular donde los queratinocitos pasan por diferentes estados, desde la profundidad hasta la superficie de la piel, que se corresponden con el estrato basal, espinoso, granuloso y córneo. En este proceso, las células se mueven hacia la superficie, a partir de la capa basal de la epidermis, y se aplanan y queratinizan progresivamente hasta que los núcleos y orgánulos intracelulares desaparecen dando lugar a los corneocitos (queratinocitos no vivos) (Poirier, J., *et al.*, 1985), (Elias, J.J., 1989), (Schaefer, H. *et al.*, 1996a), (Foldvari, M., 2000), (Bouwstra, J.A., *et al.*, 2003). El espacio intercelular entre los corneocitos es rellenado por lípidos cuyo origen se encuentra, principalmente, en la exocitosis de los cuerpos lamelares presentes en el estrato granuloso durante la diferenciación terminal de los queratinocitos. En el estrato córneo, los corneocitos y dominios de lípido intercelular son considerablemente diferentes de los queratinocitos localizados en la capa granular en los últimos estados de diferenciación, lo que implica que existe una importante actividad metabólica en la interfaz con el estrato granuloso (Elias, J.J., 1989), (Schaefer, H. *et al.*, 1996a), (Wertz, P. *et al.*, 1998), (Bouwstra, J.A., *et al.*, 2003). Las diferentes capas que constituyen el estrato córneo representan varios estados de maduración de los corneocitos y del lípido intercelular. Las capas más superficiales forman el stratum disjunctum, las cuales sufren un proceso continuo de descamación; en cambio, capas más profundas se corresponden con el stratum compactum, que presentan un grosor mayor y un empaquetamiento más denso (Schaefer, H. *et al.*, 1996a).

La función barrera del estrato córneo está regulada por mecanismos homeostáticos. La descamación representa la interrupción controlada de los factores responsables de la cohesión del estrato córneo liberándose escamas individuales de la superficie de la piel. El control de este proceso requiere actividad proteolítica. El grosor del estrato córneo depende de un balance entre el grado de cornificación y de descamación. De este modo, siempre que la barrera de la piel se vea alterada, el grado de síntesis del estrato córneo se ve aumentado hasta que se restablece el equilibrio normal (Schaefer, H. *et al.*, 1996a), (Reddy, M.B., *et al.*, 2000), (Bouwstra, J.A., *et al.*, 2003).

El estrato córneo, además de ser la principal barrera a la penetración de compuestos xenobióticos, actúa como reservorio de los mismos. La cantidad de material presente en la capa más externa de la piel y que se encuentra disponible para la absorción es atribuido al reservorio del estrato córneo. En este sentido, se piensa que la localización predominante del reservorio en la capa córnea no es otro que el espacio lipídico intercelular (Rougier, A., *et al.*, 1983), (Schaefer, H. *et al.*, 1996c), aunque, también se relacionan con esta función los folículos pilosos y las arrugas de la piel. La localización física del reservorio en el estrato córneo es un tema de considerable conjetura según los diversos autores consultados. Factores como el coeficiente de reparto del principio activo (estrato córneo/ agua) y la naturaleza de la formulación influyen en la cantidad de xenobiótico que va a formar el reservorio. Además se sabe que los principios activos pueden permanecer en el reservorio durante varios días, incluso hasta quince días en algunos casos. La importancia de la función reservorio en la absorción percutánea es más significativa durante el primer día tras la aplicación cutánea, donde la concentración del compuesto retenido en el estrato córneo es más alto (Schaefer, H. *et al.*, 1996c).

III.2.3.

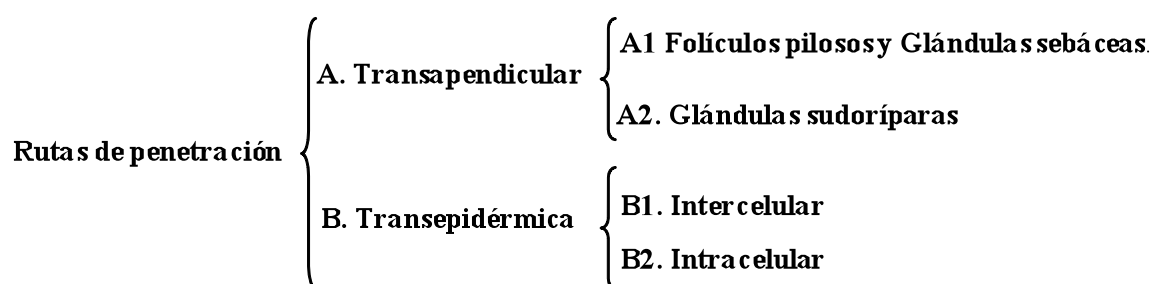
Metabolismo cutáneo

La piel presenta enzimas que confieren a este órgano la presencia de actividad metabólica. Se ha observado un metabolismo cutáneo significativo en una amplia variedad de compuestos como por ejemplo la nitroglicerina y el estradiol. Sin embargo, a pesar de la variedad de procesos metabólicos asociados a la piel la extensión del metabolismo es normalmente moderada. El metabolismo no solo está limitado por el corto periodo de tiempo que un compuesto pasa en las capas viables de la piel sino también por el nivel total de actividad enzimática (Schaefer, H., *et al.*, 1996c). El ACV es un principio activo que no presenta metabolización cutánea de manera significativa (Gonsho, A., *et al.*, 1990) característica que permite que la extrapolación de datos entre modelos de piel animal y humana no se vea afectada por diferencias de metabolismo cutáneo (Schaefer, H., *et al.*, 1996c) o, que el mantenimiento de la viabilidad de la piel no sea un requisito imprescindible en los ensayos de difusión *in vitro* (Bronaugh, R.L., 1989).

III.2.4.

Rutas de penetración de xenobióticos a través de la piel

En general distinguimos entre dos grandes tipos de rutas: a través de los anexos cutáneos (vía transapendicular) o a través de la epidermis (vía transepidérmica), siendo la principal barrera el estrato córneo. La importancia de cada una de estas rutas en la penetración de la piel, depende de factores como área de exposición y longitud del camino, así como, de la difusibilidad y solubilidad del compuesto en cada dominio. Cabe destacar que las diferentes rutas no son consideradas exclusivas unas de otras para un cierto compuesto (Schaefer, H. *et al.*, 1996b), (El Maghraby, G.M, *et al.*, 2008) y pueden resumirse en el siguiente cuadro y en la **Fig. 9**.



- Ruta transapendicular: El área ocupada en la superficie de la piel por los anexos cutáneos no es muy elevada, sin embargo, no debe despreciarse su consideración como posibles rutas de penetración. Los folículos pilosos, normalmente asociados a la glándula sebácea, son el anexo cutáneo más importante en términos de área superficial. En la administración tópica, la unidad pilosebácea puede actuar como vía para conseguir un reparto sistémico de principios activos debido a la red de capilares asociados al folículo piloso, o como órgano diana mediante un efecto localizado de los principios activos, importante en desórdenes dermatológicos asociados al anexo cutáneo. La secreción de sebo, a partir de las glándulas sebáceas crea un ambiente lipofílico en el canal folicular que podría influir en la absorción (Lauer, A.C., *et al.*, 1995), (Schaefer, H. *et al.*, 1996a), (Schaefer, H. *et al.*, 1996b), (Lauer, A.C., 1999). La importancia de los anexos cutáneos en cuanto a su contribución en el proceso de absorción percutánea es objeto de debate por diferentes autores. Se prevee que la ruta transfolicular puede ser importante para compuestos que presentan una baja absorción percutánea (iones, moléculas polares grandes) y durante los estados iniciales de la difusión antes de establecerse el estado continuo a través de los dominios de lípido intercelular. Diversos autores han observado un reparto específico de sistemas constituidos por partículas, que incluyen liposomas y microsferas, al folículo piloso. Sin embargo, se necesitan desarrollar modelos

animales y métodos cuantitativos apropiados para conocer la verdadera significación de la ruta transfolicular (Lauer, A.C., *et al.*, 1995), (Schaefer, H. *et al.*, 1996c), (Lauer, A.C., 1999).

- Ruta transepidérmica: El estrato córneo, no es solo reconocido como la principal barrera a la penetración en la piel de un compuesto, sino también como la principal ruta de absorción. En general, la absorción a través de la epidermis puede realizarse por dos vías:

- Ruta intercelular: Debido a que el espacio lipídico intercelular es el único dominio continuo formado dentro del estrato córneo, las sustancias aplicadas a la piel siempre tienen que pasar estas regiones. La excepcional composición lipídica y en particular, la disposición estructural de los lípidos del estrato córneo que la diferencian del resto de membranas biológicas hacen pensar en esta ruta como el paso limitante a la absorción de compuestos. (Schaefer, H. *et al.*, 1996b), (Wertz, P. *et al.*, 1998), (Barry, B.W., 2001), (Moser, K. *et al.*, 2001), (Bouwstra, J.A., *et al.*, 2003), (El Maghraby, G.M, *et al.*, 2008). Cambios en los lípidos intercelulares se correlacionan con un aumento del agua transepidérmica, observaciones que indican que el paso limitante a la penetración del agua implica a dichos los lípidos. Se ha calculado que el camino de difusión del agua a través del estrato córneo es 50 veces más largo que el grosor de la capa córnea, lo que sugiere que la penetración de los compuestos a través de los lípidos intercelulares siguen un camino tortuoso, modelo que ha sido ampliamente aceptado (Schaefer, H. *et al.*, 1996b).

- Ruta intracelular: La penetración de compuestos a través de los corneocitos no puede ser excluida de las posibles rutas de penetración en la piel. En diversas investigaciones realizadas se han localizado cantidades significativas de compuestos en los corneocitos, principalmente en el stratum disjunctum (capa del estrato córneo más superficial), sugiriéndose que los corneocitos que sufren descamación pudieran ser relativamente permeables. Así como, la oclusión o inmersión de la piel en un baño conduce al hinchamiento de los corneocitos originado por la penetración del agua. Desafortunadamente, existe poca información sobre si estas células poliédricas limitan la difusión de los compuestos dentro del estrato córneo (Schaefer, H. *et al.*, 1996b).

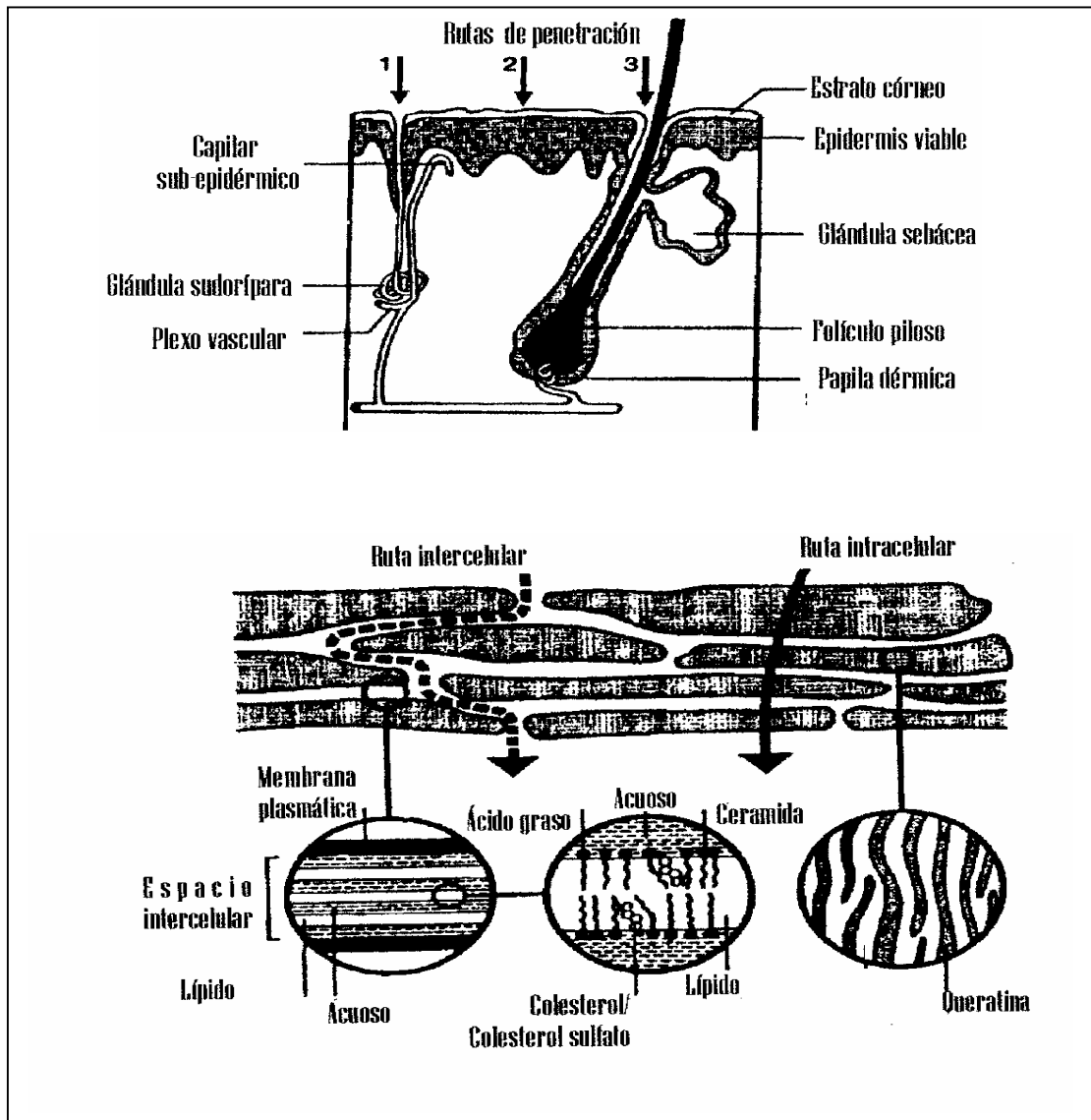


Fig. 9. Rutas de penetración de la piel. En la parte de arriba del diseño se representa un esquema de las rutas de penetración; los números 1 y 3 se refieren a la ruta transperpendicular y el número 2, a la ruta transperidémica. En la parte de abajo del diseño se detalla la ruta transepidémica (Barry, B. W, 2001).

III.2.5.

Optimización de una formulación de administración tópica

Entre los aspectos en los que se basa la optimización de una formulación para administración cutánea de medicamentos, destacan en lo referente al desarrollo del presente trabajo experimental, las interacciones del principio activo y vehículo, el uso de vesículas, el desarrollo de estrategias que alteran las propiedades de la barrera y la promoción de la ruta transfolicular (Barry, B.W., 2001).

Interacciones del principio activo y vehículo

Hay que considerar diversos factores basados en el principio activo y en el vehículo para la optimización de una formulación de aplicación cutánea. De entre ellos destacan la selección de un fármaco o profármaco adecuado con unas características fisicoquímicas que le permita difundir bien en el estrato córneo, el ajuste del potencial químico al máximo obteniéndose flujos mayores de penetración en piel, la formación de pares de iones lipofílicos y complejos de coacervación que permitan una difusión mejor a las moléculas cargadas, y el uso de sistemas eutécticos que presentan mejores propiedades de penetración en el estrato córneo que los compuestos aislados (Barry, B.W., 2001).

Uso de vesículas

Se han desarrollado diferentes tipos de vesículas como vehículos de principios activos en el estudio de optimización de formulaciones tópicas (Katare, O.P, *et al.*, 2010), siendo los liposomas, partículas coloidales constituidas principalmente por fosfolípidos, colesterol y otros componentes dispuestos en bicapas concéntricas, las vesículas utilizadas en la memoria de trabajo actual. Diversas investigaciones citan un efecto localizado de estas partículas, sin embargo, el mecanismo por el cual las vesículas transportan los principios activos a través de la piel está siendo estudiado y existen diversas teorías (Barry, B.W., 2001), (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2006), (El Maghraby, G.M, *et al.*, 2008). La composición de las vesículas y su método de preparación influye en sus propiedades fisicoquímicas (como tamaño, carga, lamellaridad, estado termodinámico) y por lo tanto en su eficacia como sistemas de reparto. Otros tipos de vesículas se obtienen al incorporar distintos componentes en las membranas lipídicas como agentes superficiales, o etanol, dando lugar a la formación de transfersomas (Cevc, G., *et al.*, 1992), o etosomas (Touitou, E., *et al.*, 2000) respectivamente, así como, aquellas vesículas constituidas por tensoactivos no iónicos constituyen los niosomas (Schreier, H., *et al.*, 1994).

Estrategias que alteran las propiedades de la barrera

Existe un continuo interés en el desarrollo de estrategias que alteran la barrera de la piel dirigidas a la absorción percutánea de compuestos y cuyos requerimientos generales son similares a los descritos para cualquier componente de la formulación dermatológica. Así, los compuestos utilizados para este fin, no deben conferir propiedades organolépticas desagradables a la preparación y ser cosméticamente aceptables, deben ser química y físicamente estables, presentar un coste adecuado y no provocar irritación ni sensibilización. Además, la actividad de los agentes que actúan sobre la barrera de la piel debe poder controlarse fácilmente causando siempre efectos reversibles (Schaefer, H. *et al.*, 1996c).

Únicamente se habla del efecto promotor en el presente trabajo experimental, término con el que Schaefer y colaboradores nombran a aquellos compuestos o procesos que reducen la función de barrera de la piel. La oclusión del estrato córneo, y el uso de promotores químicos, son alguna de las estrategias para conseguir una disminución de la barrera de la piel (Schaefer, H. *et al.*, 1996c).

- Oclusión: El efecto de oclusión eleva la absorción percutánea en diversas sustancias al reducir o bloquear la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) y la evaporación de solventes volátiles o compuestos de la superficie de la piel. De este efecto, resulta un aumento profundo del contenido de agua en el estrato córneo (300-400%), transitorio y localizado principalmente en los corneocitos, que hinchados por el agua contenida en su interior alteran, posiblemente, la función de barrera de la piel; sin embargo, las bases moleculares de este cambio es un tema de conjetura. La mayoría de los sistemas transdérmicos son parcial o completamente oclusivos. Se puede obtener también una oclusión parcial a partir de formulaciones basadas en petrolatum, pomadas o cremas (Schaefer, H. *et al.*, 1996c).

- Promotores químicos de penetración: Son aquellas sustancias que disminuyen temporal y reversiblemente la capacidad de barrera de la piel y aumentan el flujo de principios activos a través de ella. Barry introdujo el concepto de clasificación de promotores de la penetración de acuerdo a si su efecto principal era: (1) la desorganización de los lípidos del estrato córneo, (2) la interacción con las proteínas intracelulares y (3) la mejora en el reparto de un compuesto, combinando estos tres mecanismos algunos de ellos (por ejemplo dimetilsulfóxido (DMSO) al 60% aprox.). Se da la circunstancia de que muchos de los

promotores químicos son irritantes e interfieren con células viables de las membranas por lo que se limita el uso de estos compuestos a aquellos que son benignos para la piel (Foldvari, M., 2000), (Barry, B.W., 2001).

- Acción sobre los lípidos: El promotor actúa rompiendo la organización lipídica del estrato córneo y creando microcavidades donde un mayor volumen libre disponible para la difusión del principio activo aumenta el coeficiente de difusión del mismo. Por este camino operan la azona, terpenos, ácidos grasos, dimetilsulfóxido (DMSO) y alcoholes.
- Acción sobre las proteínas: Los tensioactivos iónicos, el decimetilsulfóxido y el DMSO interaccionan con la queratina en los corneocitos abriendo la densa estructura proteica, haciéndola más permeable y aumentando el coeficiente de difusión de los principios activos. Aunque la ruta intracelular no es normalmente muy importante en la penetración de las sustancias en piel, reducciones drásticas a la resistencia de esta ruta podrían abrir un camino alternativo.
- Acción sobre el coeficiente de reparto: Muchos solventes penetran en el estrato córneo cambiando las propiedades de solución de esta capa de la piel al alterar el ambiente químico, y de este modo, aumentando el reparto de una segunda molécula dentro de la capa córnea; esta molécula podría ser un principio activo, un copromotor o un cosolvente. El propilenglicol es un promotor muy utilizado, particularmente proporcionando mezclas sinérgicas con moléculas como azona, ácido oléico y terpenos ya que eleva la concentración de los mismos en el estrato córneo.

Ruta transfolicular

La unidad pilosebácea proporciona, por sí misma, una ruta que pasa el estrato córneo intacto, la ruta ransfolicular (Ver III.2.4.). Diversos estudios han sugerido que el reparto folicular está influenciado por las propiedades físicoquímicas de los principios activos o el vehículo. La manipulación de factores de la formulación como el empleo de solventes (por ejemplo etanol) que delipidizan o reorganizan el sebo o agentes humectantes que favorecen la formación de emulsiones disminuyendo la tensión interfacial entre los agentes hidrofílicos y el sebo se han empleado con el objeto de favorecer el reparto folicular, así como, el empleo de sistemas

liposómicos, o por otra parte, sistemas transportadores con un tamaño de partícula determinado (Lauer, A.C. *et al.*, 1995).

III.3.

LOS LIPOSOMAS COMO RECURSO DE FORMULACIÓN

III.3.1.

Planteamiento general

El empleo de liposomas como agentes transportadores de principios activos es una de las estrategias utilizadas en la optimización de una formulación tópica (Sharma, A., *et al.*, 1997), (Barry, B.W, 2001), (Bouwstra, J.A. *et al.*, 2003). Los liposomas son vesículas microscópicas compuestas de una o más bicapas lipídicas dispuestas concéntricamente que encierran igual número de compartimentos acuosos (**Fig. 10**). La influencia de los liposomas en las características de reparto de principios activos depende y se basa en propiedades físico-químicas y coloidales como composición, tamaño, eficiencia de carga y estabilidad, así como, en sus interacciones biológicas con las células (Egbaria, K. *et al.*, 1990a), (New, R.R.C., 1990a), (Sharma, A., *et al.*, 1997), (Lasic, D.D., 1998), (Brandl, M., 2001), (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2006). Las ventajas que presenta este sistema de administración tópica residen principalmente en la capacidad de reducir los efectos adversos e incompatibilidades que aparecen tras una indeseable alta absorción sistémica del principio activo, el aumento significativo de la molécula en el lugar de administración, la facilidad para incorporar una gran variedad de principios activos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, su baja toxicidad y ser biodegradables (Egbaria, K. *et al.*, 1990a).

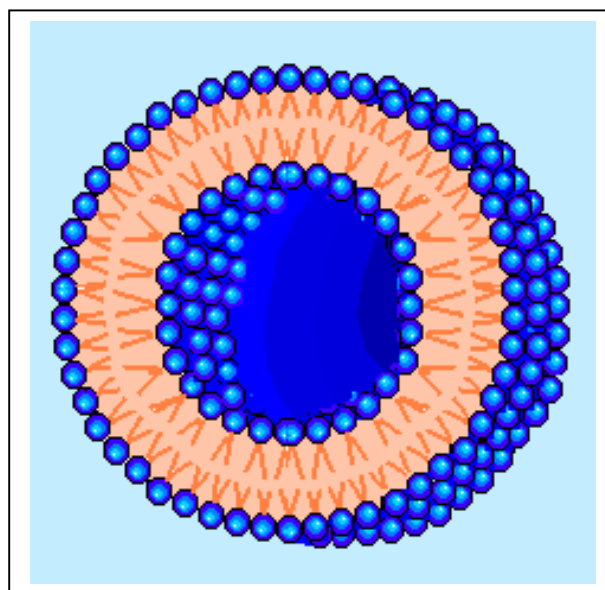


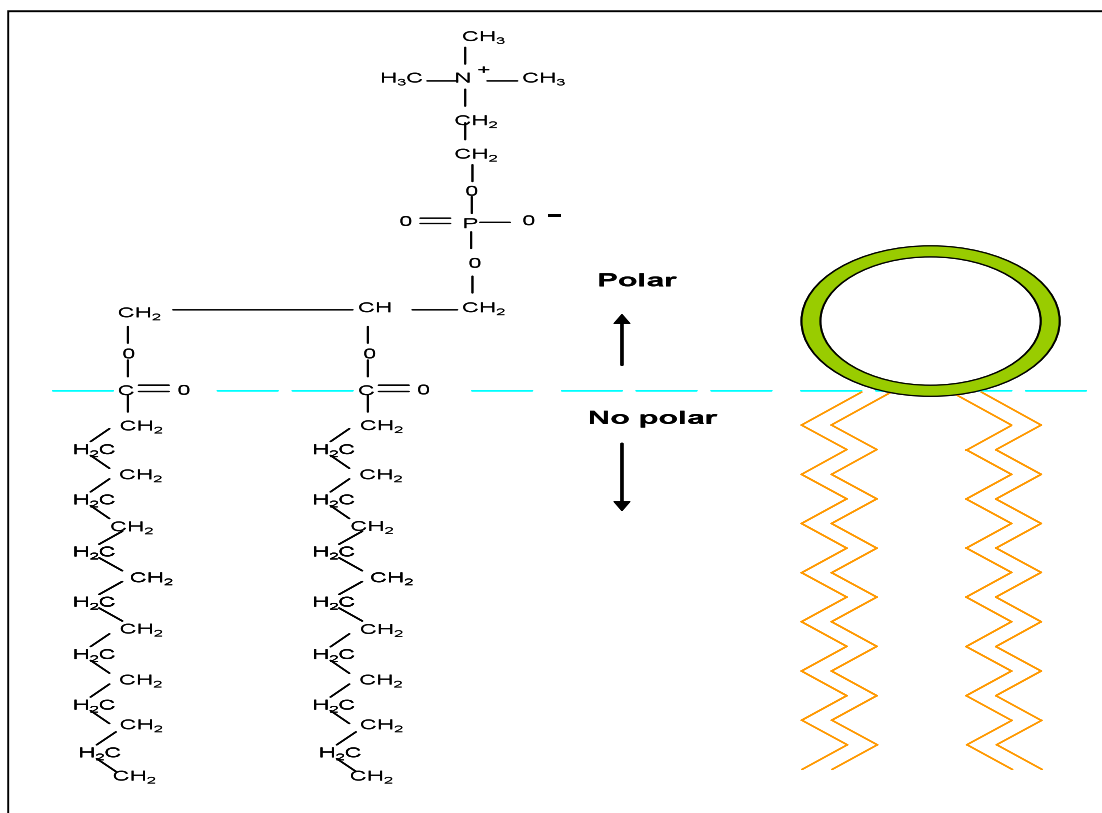
Fig. 10. Corte transversal de un liposoma unilamelar.

III.3.1.1. Composición lipídica

La elección de los lípidos que constituyen la bicapa de las vesículas se relaciona con la estabilidad deseada en la formulación liposómica, tanto *in vivo* como *in vitro*, y el principio activo cargado dentro de los liposomas (Brandl, M., 2001). El principal lípido utilizado en la

preparación de los liposomas es el fosfolípido fosfatidilcolina (PC), (descrita en apartado **III.1.2.1**), (**Fig. 5** y **Fig. 11**) debido a sus características: su relativo bajo coste comparado con otros fosfolípidos, su carga neta neutra y su elevada biocompatibilidad. Las fosfatidilcolinas, también llamadas lecitinas, pueden provenir tanto de fuentes naturales como sintéticas. Se extraen fundamentalmente de la yema de huevo y de la semilla de soja, y son mezclas de fosfatidilcolinas con cadenas de diferente longitud y diversos grados de insaturación. En cambio, los fosfolípidos de origen sintético se caracterizan por presentar una zona apolar constituida por ácidos grasos con la misma longitud e insaturaciones en su cadena (New, R.R.C., 1990a), (Brandl, M., 2001).

Fig. 11. Estructura de un tipo de fosfatidilcolina y representación esquemática de la molécula.



La composición lipídica en la bicapa de los liposomas tiene un gran impacto en propiedades de la membrana como la elasticidad (Gutiérrez, R, 1998), (Torre-Enciso, M., 2004) permeabilidad y propiedades de enlace con principios activos (Brandl, M., 2001). El estado de organización principal de la fosfatidilcolina una vez hidratada es en forma de bicapas, donde los grupos que contienen la cabeza hidrofílica de las moléculas lipídicas son orientados hacia la fase acuosa mientras que las cadenas alquílicas de las dos monocapas se juntan hacia el centro de la membrana (**Fig. 12**). La disposición en forma de bicapa de las moléculas de fosfatidilcolinas está favorecida por la forma tubular que presentan a diferencia de otras

moléculas cuya forma de cono invertida o cónica inducen la formación de micelas o micelas invertidas (**Fig. 13**) (New, R.R.C., 1990a), (Lasic, D.D., 1998), (Brandl, M., 2001).

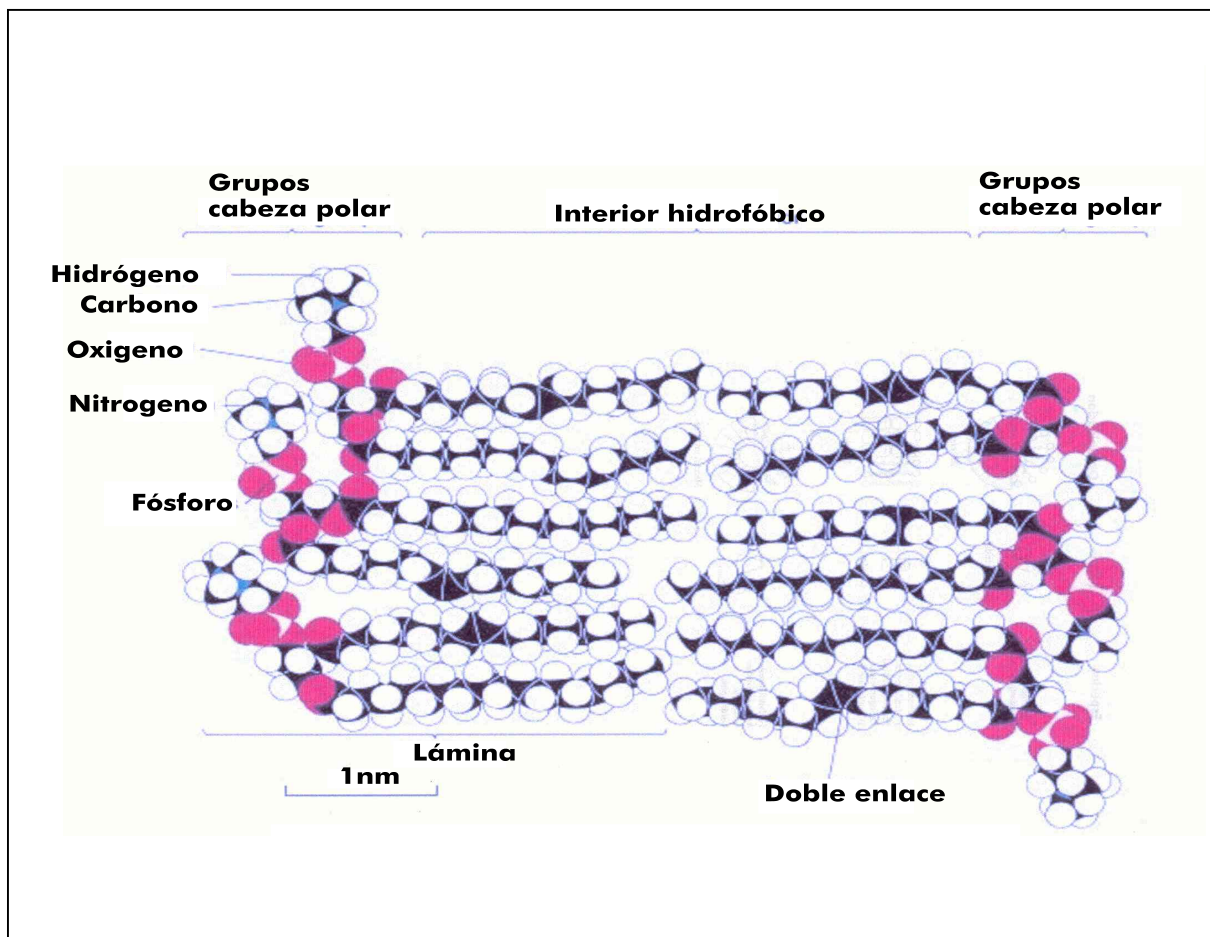


Fig. 12. Sección transversal de bicapa de fosfolípido.

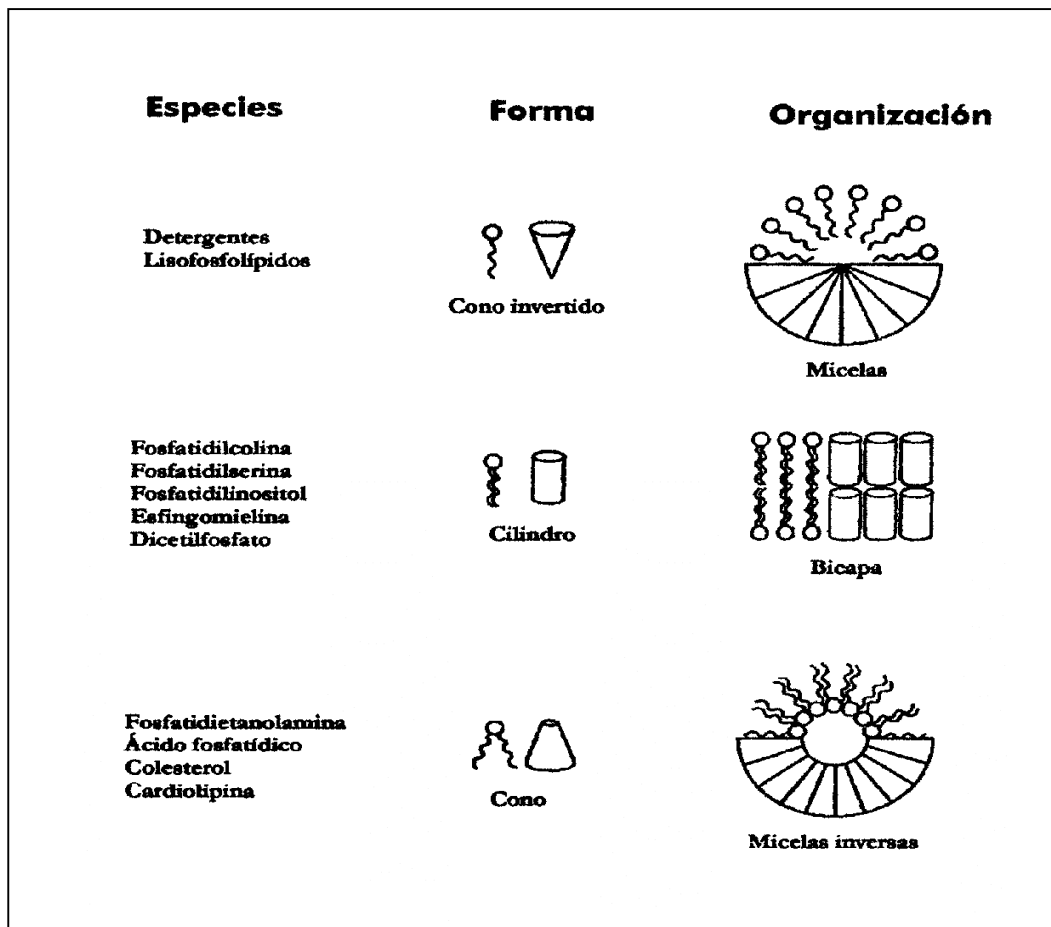


Fig. 13. Efecto de la forma molecular en la estructura agregada (Lasic, D.D., 1998).

La fosfatidilcolina se caracteriza por presentar una temperatura de transición de fase (T_c) (New, R.R.C., 1990a), (Sharma, A., *et al.*, 1997), (Lasic, D.D. 1998), (Alarcón, A., 2001), (Brandl, M., 2001), por encima de la cual, la bicapa lipídica pasa de un estado de gel o sólido muy ordenado a un estado de cristal líquido, donde la libertad y el movimiento de las cadenas hidrocarbonadas es mayor. A medida que la temperatura aumenta, se producen modificaciones estructurales en las cadenas hidrocarbonadas, al pasar de la conformación *trans* a la conformación *gauche*, por la rotación de enlaces simples C-C, expandiéndose el área ocupada por las cadenas al mismo tiempo que se reduce la longitud de las mismas. Las moléculas de fosfatidilcolina, en el estado de cristal líquido, presentan las cadenas de ácidos grasos perpendiculares al plano de la membrana, desapareciendo, la inclinación existente de las mismas en el estado de gel donde dicha inclinación de las cadenas en el plano de la membrana permite una mayor aproximación de las moléculas adyacentes (Fig. 14). El aumento de la longitud de las cadenas, o bien del número de saturaciones conlleva un aumento de la temperatura de transición de fase de dichas moléculas (New, R.R.C., 1990a).

Las fosfatidilcolinas de origen sintético, a diferencia de las de origen natural, tienen una temperatura de transición de fase determinada al tener todas ellas las mismas cadenas hidrocarbonadas en su composición. La presencia de fosfatidilcolinas con una alta T_c ($T_c > 37^\circ\text{C}$) dan lugar a vesículas con bicapas menos fluidas y menos susceptibles de pérdida del principio activo encapsulado a la temperatura fisiológica, sucediendo la situación inversa con fosfatidilcolinas de baja T_c ($T_c < 37^\circ\text{C}$). Cabe destacar que la fluidez de las bicapas podría influir en la interacción de los liposomas con las células (Sharma, A., *et al.*, 1997).

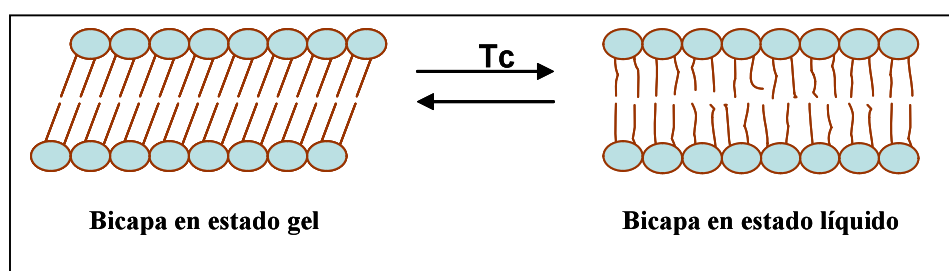


Fig. 14. Transición de fase en la bicapa gel –estado líquido (Brandl, M., 2001).

Se recurre a mezclas de PC con otros lípidos con el fin principal de mejorar la estabilidad *in vitro-in vivo*, por ejemplo, introduciendo una carga eléctrica superficial en la bicapa o incluyendo componentes que modifican el empaquetamiento de la misma. La carga superficial puede ser introducida reemplazando parte de la PC con fosfolípidos cargados, los cuales, mediante la repulsión electrostática generada inducen a la estabilización y reducen tanto el tamaño como el número de lamelas concéntricas debido a la repulsión entre las láminas de lípido hidratadas (Brandl, M., 2001). El fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilserina y fosfatidilinositol son ejemplos de fosfolípidos que confieren carga negativa a la bicapa (New, R.R.C., 1990a). Existen otros agentes inductores de carga como la estearilamina que confiere carga positiva a la membrana lipídica (Law, S.L., *et al.*, 1998), (Ogiso, T. *et al.*, 2001), (Bhatia, A., 2004). La naturaleza y densidad de carga en la superficie del liposoma son parámetros que además de influir en la estabilidad liposómica pueden condicionar el mecanismo y extensión de la interacción liposoma- célula (Sharma, A., *et al.*, 1997).

La incorporación del colesterol en la bicapa lipídica, afecta la fluidez de las membranas. Los esteroides son importantes componentes de las membranas naturales, siendo el colesterol, el esteroide predominante dentro de los mamíferos. El colesterol no forma, por sí mismo, estructuras de bicapa, pero puede ser incorporado dentro de las membranas del fosfolípido. Al

ser una molécula anfifílica, se inserta dentro de la membrana con su grupo hidroxilo orientado hacia la superficie acuosa y la cadena alifática alineada paralelamente a las cadena de ácidos grasos (**Fig. 15**). La inclusión de colesterol en la bicapa altera la fluidez de la membrana por debajo y por encima de la Tc, y en algunos casos puede llegar a abolir esta fase de transición cuando se encuentra en altas concentraciones (50 mol%). De este modo, por debajo de la Tc la presencia de colesterol aumenta la fluidez de la bicapa, en cambio por encima de la Tc la incorporación del colesterol origina una reducción de la libertad de movimiento de las cadenas y causa una mayor condensación en la bicapa (New, R.R.C., 1990a), (Corderch, L., *et al.*, 2000).

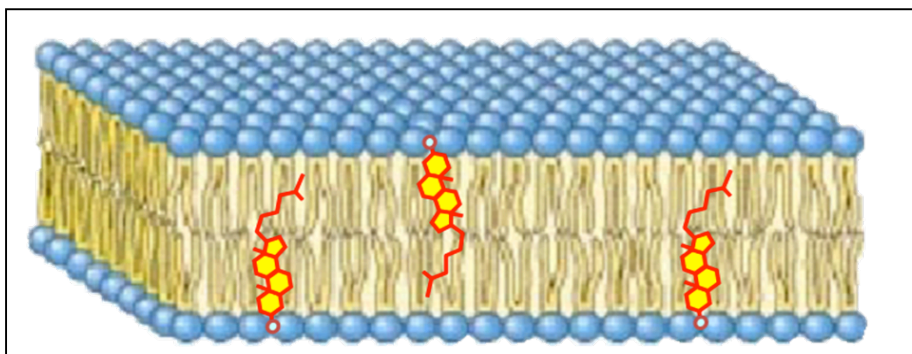


Fig. 15. Incorporación del colesterol en la bicapa lipídica.

III.3.1.2. Estructura física

Aparte de por sus constituyentes químicos, los cuales determinan propiedades como fluidez de membrana, carga superficial y permeabilidad, los liposomas están caracterizados por su tamaño y forma. El intervalo del tamaño de los liposomas va desde un diámetro en torno a los 0,025 μm para liposomas pequeños hasta los 2,5 μm en liposomas grandes. A su vez, las vesículas se limitan por una única bicapa o bien por múltiples lamelas concéntricas dispuestas una entorno a la otra. Los liposomas se pueden clasificar en función del tamaño y número de bicapas lipídicas en (New, R.R.C., 1990a), (Sharma, A., *et al.*, 1997), (Brandl, M., 2001) (**Fig. 16**).

- Liposomas multilamelares (MLV) constituidos por más de una bicapa lipídica. Si las vesículas están compuestas de pocas bicapas concéntricas se denominan oligolamelares (OLV).
- Liposomas unilamelares constituidos por una única bicapa. Según su tamaño se dividen en liposomas pequeños unilamelares (SUV) y liposomas grandes unilamelares (LUV).

Junto con el tamaño del liposoma, la distribución del tamaño y lamelalidad no son variables independientes. Así, un tamaño de vesícula más grande, normalmente esta asociado a una distribución de tamaños heterogénea y un alto número de lamelas concéntricas (**Fig. 17**), (Brandl, M., 2001). Tanto el tamaño como el número de lamelas influyen en la cantidad de principio activo encapsulado (Sharma, A., *et al.*, 1997).

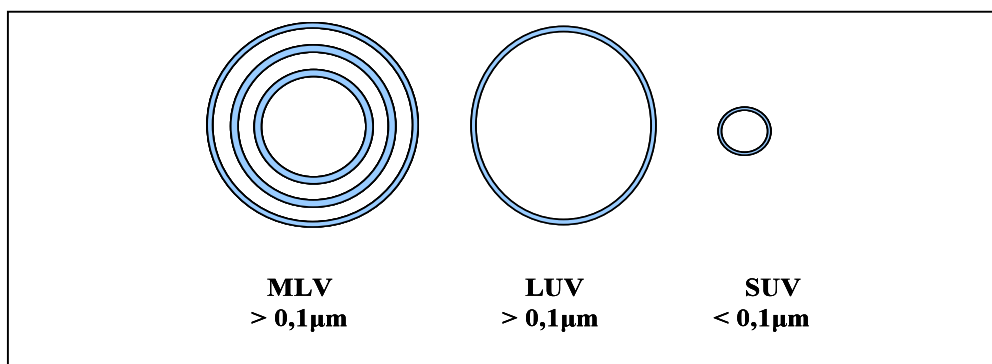


Fig. 16. Tipos de liposomas según tamaño y número de lamelas (Sharma, A., *et al.*, 1997).

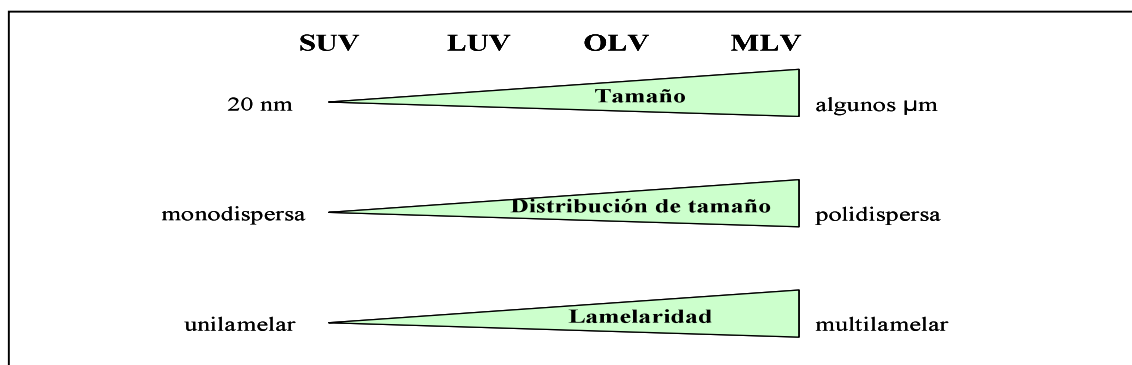


Fig. 17. Esquema de interdependencia tamaño, distribución tamaño, lamelalidad (Brandl, M., 2001).

III.3.1.3. Preparación de liposomas como vehículos de principios activos

Liposomas de diversos tamaños y características se consiguen a partir de diferentes métodos de preparación. La formación de liposomas es un proceso autorealizable sostenido por agitación mecánica o el uso intermitente de solventes orgánicos o detergentes. En general, el proceso comprende 3 fases: la hidratación de los lípidos resultando la formación de los liposomas, adaptación del tamaño de la vesícula y la dosificación del ingrediente activo dentro del liposoma. Estos tres pasos pueden llevarse a cabo de forma consecutiva o de forma simultánea (Brandl, M., 2001).

La preparación de los liposomas en la memoria de tesis actual se ha basado en el método simple y ampliamente utilizado conocido como “Handshaking” el cual consiste en la formación de una fina película lipídica sobre una superficie de vidrio a partir de una solución de los componentes de dicha película en un solvente orgánico, y su posterior hidratación agitando de forma mecánica los lípidos en un medio acuoso. Dicha técnica de preparación se basa en el estudio de diversos autores (Bangham, A.D. *et al.*, 1965), que observaron que cuando una fina capa de fosfolípido se pone en contacto con el medio acuoso, se produce una formación de estructuras tubulares, siendo suficiente un ligero aporte de energía mecánico para romper los tubos formando burbujas, esferas lipídicas denominadas liposomas. Se utiliza comúnmente la denominación MLV para referirse a los liposomas preparados por dicho método debido al amplio intervalo en tamaño y lameralidad obtenidos en las partículas (New, R.R.C., 1990b), (Sharma, A., *et al.*, 1997), (Brandl, M., 2001).

Entre las técnicas empleadas para disminuir el tamaño de los liposomas MLV se encuentra la el método de extrusión (Olson, F., *et al.*, 1979), (Hope, M.J., *et al.*, 1985), el cual se ha utilizado en el presente estudio experimental para obtener liposomas con un tamaño definido, homogéneo y reproducible. Mediante dicha técnica, tras ejercer una presión, los liposomas se reducen de tamaño al pasar a través de membranas de policarbonato con un diámetro de poro definido. Sobre el mecanismo de reducción de tamaño se sugiere que incluye una ruptura de las vesículas y su posterior reformación espontánea resultando liposomas más pequeños con menor polidispersidad y con un menor número de lamelas (Olson, F., *et al.*, 1979), (Mayer, L.D., *et al.*, 1986), (Jousma, H., *et al.*, 1987), (Berger, N., 2001). La extrusiones de vesículas pueden ser secuenciales en cascada, mediante filtros de poro decreciente (Olson, F., *et al.*, 1979), (Berger, N., 2001) o múltiples (o cíclicas) (Jousma, H., *et al.*, 1987), (Elorza, B., *et al.*, 1993) a través de una membrana con el mismo tamaño de poro obteniendo una mayor reducción en el número medio de lamelas que una simple extrusión. Torre-Enciso (Torre-Enciso, M., 2004) con objeto de obtener vesículas de tamaño definido, con un distribución de tamaños homogénea y reproducible estudió los parámetros de extrusión, siendo estas variables el tipo de extrusión, el diámetro de poro, el número de pases a través del filtro y la presión de trabajo. La velocidad según la cual una suspensión de liposomas atraviesa una membrana de poro determinado depende del tamaño, concentración y composición de las vesículas. Así, la extrusión de las vesículas presenta mayor dificultad si se parte de altas

concentraciones de lípido y se realiza el proceso por debajo de la T_c, pudiéndose obstruir la membrana (Olson, F., *et al.*, 1979), (New, R.R.C., 1990b), (Brandl, M., 2001).

Generalmente, es preferible obtener una alta incorporación de principios activos en los estudios que se llevan a cabo tanto a nivel clínico como de investigación (Yamamoto, T., *et al.*, 2007). Por ello, se debe estudiar el método de encapsulación que se debe utilizar en el desarrollo de una formulación liposómica que depende principalmente de las características fisicoquímicas del principio activo. Existen diferentes métodos de encapsulación en liposomas, por atrapamiento pasivo o activo. Las sustancias solubles en agua se encapsulan en la fase acuosa del liposoma (en el centro y/o los espacios acuosos interlamelares), las lipofílicas se encapsulan en la fase lipídica (bicapas lipídicas), y las anfifílicas se encapsulan en ambas fases según el coeficiente de reparto de la molécula (**Fig. 18**), (Sharma, A., *et al.*, 1997), (Brandl, M., 2001). A partir de la encapsulación por atrapamiento pasivo o encapsulación pasiva el principio activo se encapsula durante el proceso de formación del liposoma, bien disolviendo el principio activo junto a los lípidos en el solvente orgánico (en caso de agentes lipofílicos), o bien disolviendo el principio activo en la solución de hidratación (en caso de agentes hidrofílicos). A partir de este método no siempre se consiguen niveles de encapsulación adecuados, principalmente en el caso de moléculas hidrofílicas. Estos problemas de escasa eficiencia de encapsulación pueden revertirse utilizando la encapsulación por atrapamiento activo o encapsulación activa por gradiente de pH o iónico y por gradiente de concentración donde el principio activo se encapsula una vez formados los liposomas (Brandl, M., 2001). En el caso de la encapsulación basada en gradientes de pH (Dos Santos, N. *et al.*, 2005), (Qiu, L., *et al.*, 2008) o iónicos (Abraham, S.A, *et al.*, 2004), (Fritze, A., *et al.* 2006), el principio activo no ionizado penetra en el liposoma y queda ionizado dentro de la vesícula. En la encapsulación por gradiente de concentración, el principio activo penetra la membrana lipídica por encima de la T_c hasta que se establece un equilibrio entre el interior de las vesículas y el medio externo.



Fig. 18. Moléculas encapsuladas en el liposoma.

Normalmente no es necesario retirar el principio activo extraliposomal en el caso de sustancias encapsuladas en la bicapa porque la mayoría del principio activo se encuentra incorporado al liposoma. En cambio, para las sustancias hidrofílicas encapsuladas, normalmente la bicapa representa una barrera de difusión una vez retirado el principio activo no atrapado manteniéndose al menos durante un tiempo un gradiente de concentración. La necesidad de retirar el principio activo depende de la eficiencia de carga obtenida en la encapsulación y el perfil de eficacia y toxicidad del principio activo libre en comparación con el encapsulado (Brandl, M., 2001). Debido a las diferencias de tamaño entre los liposomas y el principio activo no encapsulado, en la separación del material no atrapado se emplean técnicas como cromatografía en gel (cromatografía de exclusión molecular) o diálisis. Por otra parte, en los casos donde la separación del principio activo se fundamenta en diferencias de densidad se utilizan técnicas de centrifugación (New, R.R.C., 1990b), (Brandl, M., 2001).

III.3.1.4. Caracterización fisicoquímica de los liposomas

En el comportamiento de los liposomas, tanto en sistemas físicos como biológicos, influyen factores como composición química, tamaño, cantidad de soluto atrapado, permeabilidad de membrana (New, R.R.C., 1990c) y potencial de superficie (Estelrich, J. *et al.*, 2000).

La determinación cuantitativa de los fosfolípidos que constituyen los liposomas se puede realizar mediante distintos métodos analíticos (Edwards, K.A., *et al.*, 2006) basados en el análisis del fósforo de los fosfolípidos (Bartlett, G.R. 1959), o basados en reacciones enzimáticas del grupo colina (Takayama, M., *et al.*, 1977) como el método desarrollado en el trabajo actual, y en técnicas cromatográficas como cromatografía en capa fina (TLC) (Essig, S., *et al.*, 2001).

Entre los métodos utilizados en la determinación de tamaño se encuentran técnicas basadas en la dispersión de la luz, en técnicas de microscopía, en cromatografía de exclusión por tamaño, en la técnica de fraccionamiento campo-flujo (FFF, field-flow fractionation), y en centrifugación analítica (Edwards, K.A., *et al.*, 2006). En la memoria de tesis actual experimental se determinó el tamaño de los liposomas mediante la técnica de espectroscopía de correlación fotónica (PCS). Dicha técnica se basa en el análisis de las fluctuaciones en el tiempo de la intensidad de la luz dispersada por la muestra, debido al movimiento Browniano que presentan las partículas en suspensión. Dichas fluctuaciones se relacionan con el tamaño de partícula; el movimiento de partículas grandes en un medio fluido es más lento que para partículas pequeñas, siendo consecuentemente las fluctuaciones en la intensidad de la luz más lentas. La instrumentación consiste en una fuente de luz (helio, neón o argón) que se enfoca en una cubeta colocada en una célula controlada termostáticamente, y un fotomultiplicador que detecta la luz dispersada por la muestra en un ángulo determinado. El sistema de medida utiliza un correlador que calcula la función de correlación. Dicha función se establece al multiplicar la intensidad dispersada en un tiempo determinado t , $I(t)$, por la intensidad dispersada un instante τ más tarde ($I(t + \tau)$), repitiendo este procedimiento para un gran número de tiempos t antes de tomar un valor medio de productos. El valor resultante no depende de t sino del intervalo de tiempo τ . El resultado es una curva que decae exponencialmente hasta un valor medio a una velocidad que depende de la rapidez de las fluctuaciones de la señal y por lo tanto del tamaño de la partícula dado (**Fig. 19**) (New, R.R.C., 1990c), (Ostrowsky, N., 1993), (Edwards, K.A., *et al.*, 2006).

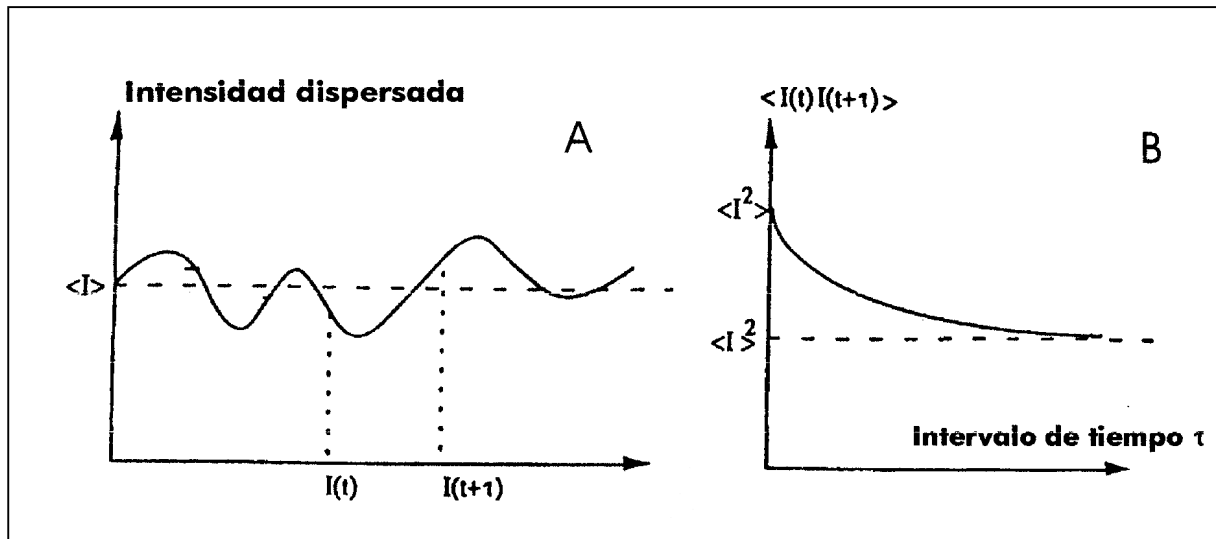


Fig. 19. (A) Intensidad dispersada respecto al tiempo. (B). Función de autocorrelación (Ostrowsky, N., 1993).

La función de correlación para cualquier intervalo de tiempo se expresa matemáticamente como

$$G(\tau) = \langle N \rangle^2 (1 - B \cdot e^{-\Gamma \tau}) \quad (\text{Ec. 1})$$

donde N es la intensidad media de las señales obtenidas de distintos intervalos de tiempo, B es una constante que viene determinada por las limitaciones del aparato y de la medida y Γ es la constante de decaimiento definida como $2DK^2$, siendo K el vector de dispersión (que depende del ángulo del detector, etc.) y D el coeficiente de difusión de la partícula. Conociendo el valor de D, el radio hidrodinámico medio de las partículas (\bar{R}_h) se calcula utilizando la ecuación de Stokes- Einstein (New, R.R.C., 1990c), (Edwards, K.A., *et al.*, 2006):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta\bar{R}_h} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde k es la constante de Boltzmann's, T es la temperatura absoluta y η la viscosidad del solvente.

Se pueden realizar distintos análisis de los datos en función del tratamiento de los resultados obtenidos en cada medida y el tipo de muestras en estudio (New, R.R.C., 1990c), (Torre-Enciso, M., 2004), (Edwards, K.A., *et al.*, 2006).

La carga superficial en los liposomas es un factor que afecta a su estabilidad previniendo fenómenos de agregación y fusión, así como las interacciones de las vesículas con membranas, principios activos u otras vesículas (Carrion, F.J., *et al.*, 1994), (Roy, M.T., *et al.*, 1998). La inmersión de una partícula sólida en un medio acuoso implica la creación de una carga eléctrica en su superficie. Suponiendo la superficie cargada del liposoma, un determinado número de iones de signo opuesto (contraiones) quedan adheridos a través de fuerzas electrostáticas, en capa rígida, a dicha superficie. Esta capa rígida o capa de Stern, está en equilibrio dinámico con una capa difusa donde los contraiones y los iones de igual signo que la superficie (coiones) se distribuyen en la solución como resultado de las fuerzas electrostáticas y de la agitación térmica. El conjunto forma lo que se conoce como doble capa eléctrica que comprende dos partes, una capa rígida y una parte difusa ambas en equilibrio (Fig. 20). La capa de fluido adyacente a la superficie cargada está inmovilizada, refiriéndonos a la frontera que separa la zona móvil de la inmóvil como plano de cizalla. El potencial en el plano de cizalla se conoce como potencial Zeta (ζ) (Estelrich, J. *et al.*, 2000), (Le Roy Boehm, A-L., *et al.*, 2000). Dicho parámetro es un buen índice de la magnitud de la interacción repulsiva entre partículas coloidales y se utiliza para valorar la estabilidad coloidal. El potencial ζ no es un parámetro que se refiera exclusivamente a la partícula, sino que además depende también de las características del medio en el que se encuentra dispersada como por ejemplo, temperatura y pH del medio, tipo y concentración de electrolito presente (Makino, K *et al.*, 1991), (Estelrich, J., *et al.*, 2000).

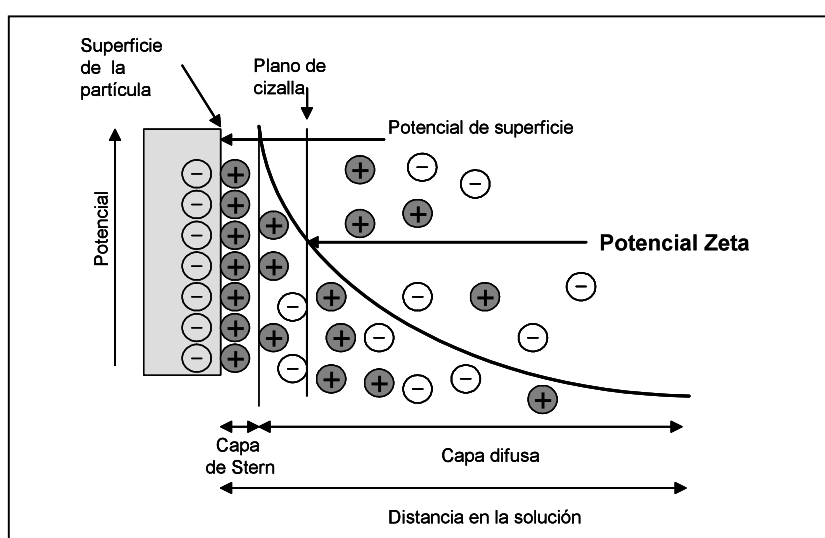


Fig. 20. Entorno iónico de una partícula. Modelo de Stern (Le Roy Boehm, A-L., *et al.*, 2000).

En el desarrollo del actual trabajo experimental se determinó el potencial ζ de los liposomas mediante microelectroforesis de efecto Doppler (Estelrich, J. *et al.*, 2000), (Le Roy Boehm, A-L., *et al.* 2000) basado en el movimiento de las vesículas al ser sometidas a un campo eléctrico. Las fuerzas de viscosidad que actúan sobre la partícula tienden a oponerse a este movimiento y cuando se llega a un equilibrio entre la atracción eléctrica y la resistencia debido a la viscosidad la partícula se mueve a velocidad constante. En el dispositivo instrumental, dos haces de radiación procedentes de una fuente láser se cruzan en un punto a nivel del plano estacionario de la célula de medición que contiene la muestra dando lugar a franjas de interferencia. Las partículas presentes en la célula de medición interactúan con las franjas dando lugar a una luz difusa cuya frecuencia de oscilación depende de la velocidad de las partículas en movimiento bajo la influencia del campo eléctrico. La radiación de luz dispersada es captada por un fotomultiplicador y transmitida a un correlador que establece una función de autocorrelación que es la transformada de Fourier del espectro de frecuencias. La medida de la función de autocorrelación proporciona el espectro de frecuencias y de aquí se obtiene la velocidad de las partículas (v). Conocido el campo eléctrico (E) se determina la movilidad electroforética (μ) mediante la siguiente relación.

$$\boxed{\mu = v / E} \quad \text{(Ec. 3)}$$

El potencial ζ se deduce de la movilidad electroforética al aplicar la ecuación de Henry

$$\boxed{\mu = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\pi\eta}} \quad \text{(Ec. 4)}$$

donde η es la viscosidad del medio, ε es la constante dieléctrica, y el factor $f(\kappa a)$, coeficiente de Henry, depende de la relación entre el radio de curvatura de la superficie de la partículas (a) y el parámetro de Debye-Hückel (κ). Dicho parámetro (κ) es directamente proporcional a la concentración de electrolito y a la valencia de los iones presentes en la solución y su valor recíproco es una medida del grosor de la doble capa (Jones, M.N., 1995), (Estelrich, J. *et al.*, 2000). En el caso de los liposomas, en el que su tamaño es relativamente grande en relación al espesor de la bicapa, el producto $ka \gg 1$, por lo que el potencial ζ puede ser calculado por la ecuación simplificada de Smoluchowski (Jones, M.N., 1995).

$$\xi = \frac{\mu\eta}{\varepsilon}$$

(Ec. 5)

Previo al estudio del comportamiento del soluto en sistemas físicos o biológicos, es importante conocer la cantidad de principio activo atrapado dentro de los liposomas, ya que los efectos observados experimentalmente pueden estar relacionados con este dato. Después de separar el material no encapsulado en la vesícula se asume que la cantidad de principio activo remanente está atrapada al 100%, aunque esta proporción puede variar tras un periodo de almacenamiento o manipulaciones posteriores (New, R.R.C., 1990c). La determinación del material encapsulado conlleva una destrucción de la bicapa lipídica y posterior cuantificación del principio activo liberado. El parámetro de encapsulación utilizado en el presente trabajo es la eficiencia de encapsulación (E.E) mediante el cual se relaciona la cantidad de soluto atrapado respecto a la cantidad de lípido que lo contiene en forma de vesícula (New, R.R.C., 1990c), (Torre-Enciso, M., 2004), (Edwards, K.A, *et al.*, 2006).

Las bicapas lipídicas de los liposomas son membranas semipermeables (New, R.R.C., 1990a) donde la velocidad de difusión de las moléculas e iones a través de ellas pueden variar considerablemente. Debido a la característica de semipermeabilidad de la bicapa, la diferente osmolaridad entre el medio interno y externo del liposoma origina bien un hinchamiento de las vesículas en caso de que el medio interno sea hipertónico (entrada de moléculas de agua), o aplastamiento de las mismas si el medio interno sea hipotónico (salida de moléculas de agua). El estado fluido de la bicapa lipídica es más flexible y permeable que el estado gel, por ejemplo, es susceptible a la formación de canales de agua transitorios que permiten el flujo de moléculas hidrofílicas a través de ella (Brandl, M., 2001). Por otro lado, en la T_c coexisten tanto la fase gel como la fase de cristal líquido en diferentes partes de la membrana, aumentándose como resultado, los defectos de empaquetamiento y la permeabilidad de la misma (New, R.R.C., 1990a), (Lasic, D.D., 1998). La carga eléctrica de la bicapa, pH del medio, (Law, S.L *et al.*, 1998), y el grado de lamellaridad de las vesículas (Mayer, L.D. *et al.*, 1986) son otros factores, a parte de la T_c, que pueden influir en la permeabilidad que presenta un soluto frente a la bicapa lipídica. En el presente trabajo se determina la permeabilidad de diversas bicapas lipídicas frente a la molécula encapsulado utilizando estudios de difusión *in vitro*.

III.3.1.5. Estabilidad

La estabilidad de una formulación liposómica se estudia desde el punto de vista de la estabilidad química y física. Respecto a la estabilidad química, las dos reacciones más importantes que afectan a la estabilidad de los fosfolípidos en una dispersión acuosa son la hidrólisis y la oxidación. La hidrólisis comienza con la rotura del enlace éster tanto en la posición 1 como 2 del glicerol que resulta en la formación de ácidos grasos libres y el 2-acyl o 1-acyl-lisofosfolípido. La estabilidad hidrolítica es pH- dependiente y tiene un valor óptimo alrededor del pH = 6,5 en el caso de fosfatidilcolinas. No se ha establecido qué grado de formación del producto de degradación, lisofosfolípido, el cual tiene un carácter tensoactivo, es aceptable. Diversos estudios han demostrado que cambios en el tamaño del liposoma y separación de fases aparecerían cuando la hidrólisis hubiera llegado a un grado del 60%. La reacción de oxidación de ácidos grasos insaturados y colesterol, caracterizada por un cambio en el color y olor de la suspensión liposómica es otra de las causas que afectan a la estabilidad química de las vesículas (Sharma, A., *et al.*, 1997), (Brandl, M., 2001).

La estabilidad física de las dispersiones liposómicas se ve afectada por los cambios de tamaño y distribución de tamaño de las partículas, así como por los cambios en el contenido del principio activo encapsulado (Sharma, A., *et al.*, 1997), (Brandl, M., 2001). Un cambio en el tamaño de la partícula originado por una fusión de vesículas representa un proceso irreversible, mientras que una agregación de las mismas puede ser reversible. Las vesículas con carga neta en la superficie son menos susceptibles de sufrir fenómenos de agregación, como sedimentación o flotación, en una preparación liposómica debido a la repulsión electrostática. Los principios activos encapsulados en los liposomas pueden difundir a través de la membrana una vez retirado el soluto extraliposomal. La velocidad y extensión de la salida depende tanto de las características del principio activo como de la composición de la bicapa lipídica. Por ello, se recurre a la formulación de membrana rígidas para mejorar la estabilidad del sistema (Brandl, M., 2001).

III.3.1.6. Incorporación de liposomas en formas farmacéuticas de aplicación tópica

Durante la administración tópica, la suspensión de liposomas debe presentar una consistencia tal, que le permita permanecer sobre la superficie de la piel, efecto que puede conseguirse añadiendo agentes gelificantes (Esposito, E., *et al.*, 1998), (Pavelić Ž, *et al.*, 2001), (Pavelić Ž

et al., 2005), (Mourtas, S., *et al.*, 2007), (Mourtas, S., *et al.*, 2008). En el diseño de una formulación liposómica la selección de la composición lipídica y de cualquier otro componente se realiza de forma que se garantice la integridad del producto final. Por ello, se recurre con frecuencia a la incorporación de suspensiones de liposomas en geles hidrofílicos, consiguiendo varios grados de viscosidad según las cantidades y características del agente gelificante (Esposito, E., *et al.*, 1998). Por otra parte, hay que considerar si la presencia de una estructura tridimensional tipo gel rodeando los liposomas constituye una barrera añadida a la difusión de principio activo (Esposito, E., *et al.*, 1998), (Pavelić Ž., *et al.*, 2001), (Glavas-Dodov, M., *et al.*, 2002), (Bhatia, A., 2004), (Fresno Contreras, M.J., *et al.*, 2005), (Pavelić Ž., *et al.*, 2005), (Budai, L., *et al.*, 2007), (Lee, S., *et al.*, 2007), (Mourtas, S., *et al.*, 2007). En la memoria de tesis actual, se ha utilizado como agente gelificante el polímero Carbopol® siguiendo los estudios realizados por otros autores donde demostraron la compatibilidad de los liposomas con el Carbopol® (Škalko, N., *et al.*, 1998), (Pavelić Ž., *et al.*, 2001), (Pavelić Ž., *et al.*, 2005).

III.3.1.7. Interacciones entre liposomas y piel

Uno de los métodos más controvertidos para aumentar el transporte de diversos principios activos a través de la barrera natural de la piel es el uso de vesículas lipídicas. Los liposomas pueden ejercer diferentes funciones tras una aplicación tópica, como mejorar la acumulación de principios activos en piel buscando un efecto localizado, proporcionar un reparto de principio activo dirigido a los anexos cutáneos, y potenciar el reparto transdérmico al incrementar las concentraciones sistémicas de la molécula en estudio (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2006), (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2008).

Las primeras publicaciones que hablaban sobre el uso potencial de los liposomas en las aplicaciones tópicas aparecieron en los años 1980 y 1982, donde se consideró un efecto localizado del principio activo triamcinolona acetónico en piel y una reducida absorción percutánea a partir de vesículas constituidas por dipalmitoilfosfatidilcolina y colesterol en suspensión (Mezei, M., *et al.*, 1980), o formuladas como gel (Mezei, M., *et al.*, 1982). Egbaria, K., y col. observaron un reparto tópico del principio activo interferón superior a partir de liposomas respecto a una solución de dicho principio activo, obteniéndose los mejores resultados con vesículas constituidas por lípidos con una composición similar a la del estrato córneo. En este mismo estudio liposomas con inulina encapsulada formados por

fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidilserina mejoraron la disposición en piel del marcador frente a una solución acuosa (Egbaria, K., *et al.*, 1990b). En otros estudios realizados por Touitou, E., y col, se observó un aumento en piel de la cafeína a partir de liposomas preparados por fosfatidilcolina y colesterol respecto a una solución acuosa que incluía promotores de la penetración (Touitou, E., *et al.*, 1994a). El Maghraby, G.M y col., demostraron un aumento de la acumulación cutánea del principio activo 5(FU) a partir de vesículas ultradeformables (de fosfatidilcolina y colato sódico) y vesículas no rígidas (de fosfatidilcolina), respecto a una solución acuosa, siendo lo resultados obtenidos de principio activo en piel mejores para las vesículas ultradeformables (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2001a).

A pesar de que la mayoría de los estudios que buscan un efecto localizado de los liposomas, se han basado en la acumulación de principio activo en el estrato córneo y epidermis viable, diversos autores han estudiado también el potencial de las vesículas en el reparto de principios activos a los anexos de la piel, fundamentalmente a la unidad pilosebácea (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2006). Estudios realizados con carboxifluoresceina, utilizando como modelo animal la oreja de hamster, demostraron un reparto selectivo del marcador fluorescente en la unidad pilosebácea tras la aplicación de liposomas (Lieb, L.M., *et al.*, 1992). Otros autores han observado a partir de liposomas en estado fluido y vesículas con tensoactivo resultados satisfactorios en el reparto de finasteride a la unidad pilosebácea en ensayos *in vitro* a través de piel de los flancos de hamster, y en la acumulación *in vivo* en piel de oreja de hamster (Tabbakhian, M., *et al.*, 2006).

También se han realizado estudios en los que se ha observado un reparto transdérmico de principios activos a partir de vesículas. Anticuerpos encapsulados en liposomas se distribuyeron rápidamente a las regiones cutáneas más profundas obteniéndose una mayor absorción percutánea en comparación con las soluciones acuosas en un modelo de piel de cerdo joven (Artman, C., *et al.*, 1990). Otros autores observaron que vesículas en estado fluido daban lugar a una alta absorción percutánea y distribución de tejidos, más que a una acumulación en piel (Fresta, M., *et al.*, 1996). Cevc, G., y col., afirmaron que ciertos tipos de vesículas lipídicas que incorporan agentes tensoactivos, (vesículas ultradeformables) penetran intactas a las capas más profundas de la piel y llegan a circulación sistémica, aunque deben ser aplicadas bajo condiciones no oclusivas (Cevc, G., *et al.*, 1992). El reparto transdérmico de principios activos a partir de vesículas ultradeformables fue demostrado en varios estudios (Cevc, G., *et al.*, 1998), (Jain, S., *et al.*, 2005), (Dubey, V., *et al.*, 2006). Los etosomas,

vesículas que contienen un alto porcentaje de alcohol, son también consideradas vesículas de elección en el reparto transdérmico según los estudios llevados a cabo por diversos autores (Touitou, E., *et al.*, 2000), (López-Pinto, J.M. *et al.*, 2005), (Dubey, V., *et al.*, 2007a), (Dubey, V., *et al.*, 2007b), (Mishra, D., *et al.*, 2008), (Zhou, Y., *et al.*, 2010).

Se han realizado diversos estudios sobre los mecanismos de interacción entre los liposomas y la piel (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2006), (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2008). La penetración del principio activo libre una vez fuera del liposoma fue defendida por Ganesan, M.G., y col. (Ganesan, M.G. *et al.*, 1984). Sin embargo diversos autores observaron en un estudio realizado con oestradiol encapsulado en liposomas, que el pico de flujo del principio activo a través de la piel se producía en un tiempo en el que la liberación del oestradiol de las vesículas no era significativa (El Maghraby, G.M., *et al.*, 1999).

Para que las vesículas actúen como promotores de la penetración, deben permitir la penetración de los componentes lipídicos en el estrato córneo y una alteración de los lípidos intercelulares dentro de la capa córnea (Honeywell-Nguyen, P.L., *et al.*, 2005). Cambios ultraestructurales de los lípidos intercelulares se observaron después de la aplicación de vesículas sugiriéndose un efecto promotor de la penetración (Hofland, H.E.J. *et al.*, 1995). En otros estudios de liposomas aplicados a piel, se observaron cambios en la entalpía relacionada con las transiciones de los lípidos del estrato córneo lo cual sugirió que las moléculas lipídicas de las vesículas podían interaccionar con la barrera lipídica del estrato córneo y penetrar la principal barrera cutánea (Zellmer, S., *et al.*, 1995). Otros autores revelaron en estudios con piel pretratada con fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina la actuación directa de los fosfolípidos en la permeabilidad de la barrera del estrato córneo promoviendo la penetración de principio activos (Yokomizo, Y., *et al.*, 1996). El Maghraby, G.M., y col. observaron en su estudio con oestradiol un efecto promotor al pretratar la piel con vesículas no rígidas de fosfatidilcolina, si bien se obtuvo un mayor reparto del principio activo al encapsularse. (El Maghraby, G.M., *et al.*, 1999). En otros estudios se demostró la importancia de la estructura liposoma, al obtener mejores resultados de reparto en piel del oestradiol a partir de liposomas con el principio activo encapsulado frente a la misma formulación como solución lipídica (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2000). Diversos autores han sugerido la adsorción de los liposomas a la superficie del estrato córneo, y una posible fusión o mezcla (Kirjavainen, M. *et al.*, 1996), (El Maghraby, G.M., *et al.*, 1999) que podría sugerir un efecto promotor de la penetración de los componentes de las vesículas.

La teoría de una penetración intacta de las vesículas fue defendida inicialmente por Mezei y col., (Mezei, M., *et al.*, 1980), (Mezei, M., *et al.*, 1982), y parcialmente por Lasch y col., que limitaban las vesículas al estrato córneo (Lasch, J., *et al.*, 1991). Otros autores (Egbaria, K., *et al.*, 1990b), (Fresta, M., *et al.*, 1996) observaron en liposomas que incluían doble marcador en sus componentes lipídicos, que el ratio de dichos marcadores se mantenía constante a través de distintos estratos de la piel. Estos resultados podrían sugerir una posible penetración en piel de la vesícula. Otros autores no encontraron en sus estudios evidencia de que las vesículas penetraran intactas (Du Plessis, J., *et al.*, 1994a), (Korting, H.C., *et al.*, 1995) (Zelmer, S., *et al.*, 1995). Respecto a las vesículas ultradeformables, Cev y col, defendieron en sus estudios que son capaces de penetrar la piel intacta, y ser absorbidas por el sistema circulatorio siendo la fuerza conductora el gradiente de hidratación transdérmico creado tras un aplicación no oclusiva (Cevc, G., *et al.*, 1992). Contrario a estos resultados, El Maghraby, G.M. y col, en base a la suposición de que la penetración cutánea es función del diámetro de la vesícula, observó un transporte transdérmico similar entre vesículas de pequeño tamaño y gran tamaño (El Maghraby, G.M. *et al.*, 1999). La ruta de penetración de las vesículas a través de los anexos cutáneos no parece desempeñar un papel importante en el reparto transdérmico del liposoma (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2001b), (Han, I., *et al.*, 2004), sin embargo una penetración en los anexos y no a través se ha demostrado claramente en numerosos estudios (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2006), (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2008).

En los diferentes estudios realizados sobre el uso de liposomas como vehículos de principios activos en la administración tópica se ha observado cómo puede influir o no en el transporte de principios activos a la piel según autores, el método de preparación de los liposomas (Weiner, N., *et al.*, 1989), las características fisicoquímicas de las vesículas como son: composición química (Kirjavainen, M., *et al.*, 1996), (Van Kuijk-Meuwissen, M.E.M.J. *et al.*, 1998), (Vrhovnik, K., *et al.*, 1998), (Coderch, L., *et al.*, 2000), (Pérez-Cullell, N., *et al.*, 2000), (Betz, G., *et al.*, 2001), tamaño, (Du Plessis, J. *et al.*, 1994a), (Esposito, E., *et al.*, 1998), (El Maghraby, G.M., *et al.*, 1999), (Kim, C., *et al.*, 2002), (Verma, D.D., *et al.*, 2003a), concentración lipídica (Esposito, E., *et al.*, 1998), (Kim, C., *et al.*, 2002), eficacia de atrapamiento (El Maghraby, G.M., *et al.*, 1999), (Coderch, L., *et al.*, 2000), y carga superficial (Kirjavainen, M., *et al.*, 1996), (Esposito, E., *et al.*, 1998), (Ogiso, T. *et al.*, 2001) y, el método de aplicación oclusivo-no oclusivo (Van Kuijk-Meuwissen, M.E.M.J. *et al.*, 1998), (Shimoyama Y., *et al.*, 2010).

Muchos de los debates originados son causados por la recopilación de datos obtenidos en los estudios los cuales son difíciles de comparar, porque envuelven diferentes condiciones experimentales, por ejemplo, fuentes de piel, composición y morfología de liposomas. Ya Hofland en 1995, señaló la necesidad de homogeneizar las variables de trabajo en este tipo de estudios ante la imposibilidad de comparar las diferentes fuentes de información disponibles. (Hofland, H.E.J. *et al.*, 1995).

III.3.2.

Preparación y caracterización de liposomas en nuestro estudio

II.3.2.1. Preparación de suspensiones liposómicas con principio activo encapsulado

III.3.2.1.1. Formación de vesículas MLV

La fabricación de MLVs se realizó por agitación mecánica “Handshaking” basándonos en el método de Bangham (Bangham, A.D., *et al.*, 1965). Una solución lipídica de composición y concentración determinada disuelta en un solvente orgánico adecuado (diclorometano o triclorometano/metanol (2:1), se preparó en un matraz de fondo redondo (cuyo tamaño era 50-100 veces el volumen final) y se evaporó hasta sequedad en un rotavapor bajo la aplicación progresiva de vacío (desde 800 mbar hasta 100 mbar) obteniendo una película fina y uniforme. Posteriormente, se añadió la solución acuosa de hidratación y por agitación mecánica se formaron las vesículas MLV. Durante el proceso de hidratación, los lípidos o al menos el fosfolípido mayoritario, debe estar en estado de cristal líquido (Jones, M.N., 1995). por lo que la temperatura de trabajo debe ser como mínimo 10 °C superior a la temperatura de transición de fase gel-cristal líquido de los lípidos empleados.

III.3.2.1.2. Método de preparación de vesículas OLV y LUV

Tras la preparación liposomas MLV, se obtuvieron mediante el método de extrusión (Hope, M.J., *et al.*, 1985), liposomas de tamaño definido y distribución poblacional homogénea. Para ello se utilizó un extrusor (Extruder lípex biomembranes Inc.) constituido por una cámara central que se sitúa sobre una base donde se asienta el soporte de filtros y un disco de drenaje, sobre el cual se colocan los filtros de policarbonato (PVP NUCLEPORE). El sistema de cierre superior tiene una apertura con cierre de válvula para disponer la muestra, y una tubuladura de entrada de gas que se conecta mediante una vía a un manoreductor para controlar la presión de entrada de N₂- en nuestro caso-, y que al tiempo incorpora una válvula para despresurizar la cámara. La dispersión extrudida se recoge a través de una tubuladura dispuesta en la base. El cuerpo del extrusor presenta una camisa de acero inoxidable que permite que el proceso se realice a temperatura controlada. En la memoria de tesis actual se prepararon liposomas OLV mediante una extrusión cíclica a través de filtros de diámetro de poro de 0,8 μ m, al hacer pasar una serie de veces los liposomas a través de la membrana de policarbonato. Los liposomas LUV se prepararon mediante una extrusión cíclica en cascada, realizando una extrusión cíclica a través de una membrana 0,8 μ m seguida de una extrusión cíclica a través de una

membrana de 0,2 μm . La presión de trabajo aplicada (Pa) varió según la composición de la bicapa de los liposomas y el diámetro de poro utilizado en la extrusión. La temperatura utilizada en la extrusión fue al menos 10 °C superior a la T_c del fosfolípido mayoritario.

III.3.2.1.3. Encapsulación del principio activo

En la memoria de tesis actual, la encapsulación del principio activo se llevó a cabo por los siguientes métodos:

- Encapsulación pasiva: este método se empleó en la preparación de liposomas donde el principio activo encapsulado presenta una elevada solubilidad en agua, tal es el caso de la sonda fluorescente CFNa, o el ACVNa. La molécula a encapsular se incorporó en la solución de hidratación de la película lipídica durante la formación de los MLV (III.3.2.1.1. y se completó el proceso durante la extrusión de dichas vesículas (III.3.2.1.2.).

- Encapsulación activa por gradiente de concentración: método que se utilizó en aquellas formulaciones donde se quería conseguir una mayor eficacia de encapsulación del principio activo ACV, debido a su baja solubilidad en agua. Se adicionó el principio activo sólido sobre los liposomas extrudidos, encapsulándose el ACV a partir del gradiente de potencial químico creado entre el medio externo e interno, completándose el proceso de encapsulación tras un periodo de agitación de las vesículas. Tanto en la adición del principio activo, como en el periodo de agitación, la suspensión de liposomas estuvo a una temperatura al menos 10 °C superior que la T_c del fosfolípido mayoritario.

III.3.2.1.4. Separación del principio activo no encapsulado

- Centrifugación de minicolumnas (Fry, D.W., *et al.*, 1978): se combinan dos técnicas, cromatografía de exclusión molecular y la centrifugación. Se utilizaron minicolumnas de 2,5 mL utilizando como fase estacionaria gel Sephadex® G-25 F o G-50F (Amersham Pharmazie Biotech) (según principio activo o sonda fluorescente), y como fase móvil o eluyente una solución amortiguadora fosfato isoosmolar con el medio interno del liposoma (pH 6 o pH 7,4). Cuando se hacen pasar a través del gel los liposomas, al ser más grandes que los poros, no quedan atrapados por el polímero que constituye la columna y eluyen antes que el principio activo. Para ello, se añadieron alícuotas de 200 μL o 100 μL de los liposomas (según principio

activo o sonda fluorescente repectivamente), y se centrifugó a 3000 rpm y 25°C durante 4' (Labofuge 400R Heraeus Instrument).

- Diafiltración: El equipo (Diafiltrador Labscale TFF System (Millipore) consta de: el tanque del diafiltrador, una bomba peristáltica, un controlador de presión, una membrana filtrante (Biomax 100, 50 cm². Pellicon XL (Millipore). Una vez montado el equipo y cerrado herméticamente con los liposomas colocados en el tanque, las vesículas recircularon por el sistema llegando nuevamente al contenedor de almacenamiento, y el principio activo no encapsulado se fue permeando al exterior a su paso por la membrana bajo un flujo tangencial. Para no modificar el volumen final de la suspensión, una solución libre de principio activo isoosmolar con el medio interno del liposoma, entraba en el tanque diafiltrador por el vacío creado a la misma velocidad que salía el permeado del sistema.

III.3.2.2. Preparación de liposomas vacíos con ACV libre en el medio de dispersión

Se prepararon suspensiones de liposomas vacíos con ACV disuelto en el medio de dispersión. Una vez formadas las vesículas (**III.3.2.1.1.**) y extrudidas (**III.3.2.1.2.**), se añadió el principio activo (ACV) en polvo sobre los liposomas agitándose la suspensión liposómica hasta la disolución del principio activo. La temperatura en este proceso debe de ser inferior a la T_c de la bicapa lipídica.

III.3.2.3. Preparación geles liposómicos

La preparación de los geles liposómicos, utilizando una concentración de agente gelificante 0,5% (p/p), se llevó acabo con la ayuda de un equipo compuesto, de reactor (250 mL) y agitador mecánico de varilla EUROSTAR digital (IKA LABORTECHNIK). Siempre bajo condiciones de agitación, una vez mezclado el conservante (Kathon® CG al 0,05 %) y la suspensión liposómica (**III.3.2.1**), se añadieron poco a poco cantidades de Carbopol®. Posteriormente, se incorporó el agente neutralizante trietanolamina llevando el pH hasta 6-7, (controlado por un pHmetro (ORION 920a)) formándose el gel viscoso. La velocidad de agitación se ajustó en cada paso con el fin de no incorporar aire.

III.3.2.4. Caracterización físicoquímica de los liposomas

Una vez preparados los liposomas se determinaron los parámetros físico-químicos de las vesículas.

III.3.2.4.1. Determinación del tamaño promedio y Potencial ζ

El diámetro de las vesículas se midió a través de la técnica de espectroscopia de correlación fotónica (PCS) empleando el instrumento de Malvern ZetaSizer 3000 HS (Malvern Instruments, Ltd). Este aparato está dotado de un láser de Helio-Neón de 10 mW, que emite una señal continua a $\lambda = 633\text{nm}$. Las medidas se han realizado a una temperatura de 25°C y con un ángulo de 90° entre el láser y el detector. Para la determinación del tamaño en la muestra se tomó un volumen pequeño (5-10 μl) de la suspensión de liposomas en la cubeta de medida, y se diluyó en el medio externo de las vesículas previamente filtrado por membranas nylon (Millex) de diámetro de poro de $0,2\mu\text{m}$. Una vez fijadas las condiciones de medida del análisis y estabilizada la temperatura, se realizaron las medidas. Los valores resultantes de diámetro promedio de las vesículas (z-ave) e índice de polidispersidad en la memoria de tesis actual son el resultado de un análisis monomodal de los datos obtenidos al analizar las muestras por el método cumulants (Koppel, D.E., 1972).

Las medidas del potencial ζ se realizaron mediante la técnica de microelectroforesis de efecto doppler empleando el instrumento Malvern ZetaSizer 3000 HS (Malvern Instruments, Ltd. Para la medida de potencial ζ se tomó una alícuota 25 μL de la suspensión de liposomas (retirado en su caso el principio activo no encapsulado) y se añadieron 10 ml de la solución de dispersión de las vesículas previamente filtrada por membranas nylon (Millex) de diámetro de poro de $0,2\mu\text{m}$. Se utilizó una solución patrón con un potencial ζ de $-50\text{ mV} \pm 5\text{ mV}$. Para cada muestra se realizaron nueve medidas de potencial ζ , y se calculó el valor medio.

III.3.2.4.2. Cuantificación del principio activo encapsulado en liposomas y/o libre en el medio de dispersión

- Cuantificación de 5(6)CFNa

El análisis de cuantificación de 5(6)CFNa se realizó por espectrofluorimetría. Previo a dicho análisis se procedió a la rotura de las vesículas (diluídas en la solución amortiguadora PBS pH 7,4) con una solución acuosa de DOC preparado al 10% (p/V) (desoxicolato sódico suministrado por Sigma-Aldrich Ibérica) sometiendo posteriormente la mezcla a sonicación. Se utilizó un espectrofluorímetro Perkin-Elmer 204 seleccionando una longitud de onda de excitación de 430 nm, y longitud de onda de emisión 525 nm. El intervalo de concentraciones del método fue de 0, a 2 µg/mL.

- Cuantificación de ACV

El análisis de cuantificación del ACV se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) siguiendo el método desarrollado por Caamaño y col. (Caamaño, M.M. *et al.*, 1999). Previo al análisis de cuantificación del principio activo se procedió a la rotura de las formulaciones liposómicas con metanol sometiendo posteriormente la mezcla a sonicación. El sistema consta de un cromatógrafo Alliance WatersTM 2690 Separations Module equipado con una columna Spherisorb ODS2 C18 de 250 x 4,6 mm y un Detector Fotodiodo Array (PDA) Waters 996. Las condiciones instrumentales establecidas fueron: fase móvil constituida por una mezcla (5:95 (V/V)) de metanol y una solución amortiguadora fosfato monopotásico (5mM H₂KPO₄) a la que se añade 100 µl L⁻¹ de hexilamina (7mM) y ácido fosfórico (c.s.p. pH 3,0) a un flujo isocrático de 1,3 ml/min, una longitud de onda de análisis de 254nm realizando un barrido entre 200 y 300 nm, un volumen de inyección de muestra de 20 µL y una temperatura del sistema de 40 °C. Como patrones se utilizaron soluciones de ACV en una mezcla de agua Milli-Q/metanol (1:1) de 0,5 a 0,05 µg mL⁻¹. Cada muestra se inyectó por duplicado registrándose el cromatograma y tomando el área como el parámetro de cuantificación. El pico correspondiente al ACV eluyó aproximadamente a los 6 minutos.

III.3.2.4.3. Cuantificación de fosfatidilcolina

El análisis cuantitativo de la fosfatidilcolina se realizó por espectrofotometría UV-visible al cuantificar un compuesto coloreado formado tras reacción enzimática con el grupo colina (Takayama, M., *et al.*, 1977). Mediante la adición de un reactivo enzimático (Fosfolipasa D, Colinoxidasa, Peroxidasa) a la muestra de liposomas, se produjo de forma consecutiva la hidrólisis de la fosfatidilcolina tras la acción de la fosfolipasa D, la liberación del agua oxigenada por acción de la colinoxidasa y la formación un complejo coloreado al reaccionar la 4-aminofenazona con el agua oxigenada mediante la acción de la peroxidasa. Este método de determinación de fosfolípidos de liposomas ha sido validado con anterioridad en el laboratorio (Bravo, A., 2001). Se utilizó un espectrofotómetro UV-visible Uvikon 940 Kontron Instruments y una longitud de onda de 500. El intervalo de linealidad del método fue de 1 a 12,9 mmol L⁻¹.

III.3.2.4.4. Cálculo de la eficiencia de encapsulación (EE)

La eficiencia de encapsulación (E.E.) se expresa como la cantidad de principio activo encapsulado por cada 100 gramos de lípido a través de la siguiente relación:

$$E.E = \frac{\text{Principio activo encapsulado}}{\text{Lípido total}} \times 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

La cuantificación tanto del principio activo como del lípido se realizó una vez separado el soluto no encapsulado.

III.4.

ESTUDIOS DE DIFUSIÓN *IN VITRO*

III.4.1.

Planteamiento general de los estudios de difusión *in vitro*

Existe un interés creciente en el estudio de la penetración de principios activos a través de la piel debido principalmente al desarrollo de las vías tópica y transdérmica como alternativas a los métodos tradicionales de administración de fármacos, y la valoración del riesgo y toxicidad de un amplio rango de compuestos potencialmente peligrosos y sus implicaciones en el uso doméstico y en los sectores agroquímico, químico, cosmético y farmacéutico. La necesidad de datos relevantes obtenidos bajo condiciones reproducibles y seguras han originado un desarrollo y estandarización de los métodos tanto *in vivo* como *in vitro* (Brain, K.R., *et al.*, 1998).

El procedimiento más utilizado en la evaluación de la absorción percutánea de fármacos es el diseño de estudios *in vitro* mediante la utilización de celdas de difusión (Bronaugh, R.L., 1989), (Schaefer, H., *et al.*, 1996d), (Brain, K.R., *et al.*, 1998), (Jiang, M., *et al.*, 1998). En este tipo de ensayos se consigue un control de las condiciones experimentales de una manera precisa, siendo las únicas variables la piel y el compuesto a estudiar (Brain, K.R., *et al.*, 1998). La simplicidad de la metodología de los experimentos permite la realización, de un gran número de ensayos con menos esfuerzo, (Bronaugh, R.L., 1989). Además, la metodología *in vitro*, proporciona información esencial adicional frente a las investigaciones *in vivo* sobre la velocidad de absorción de los compuestos directamente debajo de la membrana a estudiar (Bronaugh, R.L., 1989), (Brain, K.R., *et al.*, 1998), y lleva a cabo estimaciones del metabolismo cutáneo siempre que se mantenga la viabilidad de la piel a lo largo del experimento (Bronaugh, R.L., 1989), (Schaefer, H., *et al.*, 1996d), (Brain, K.R., *et al.*, 1998). También, proporciona información sobre la penetración y distribución del principio activo en las capas de la piel (Touitou, E., *et al.*, 1998), permite el estudio de sustancias potencialmente nocivas utilizando piel humana (Bronaugh, R.L., 1989), (Brain, K.R., *et al.*, 1998), (Schaefer, H., *et al.*, 1996e), y se han utilizado extensamente en trabajos que establecen una correlación entre las características estructurales de los compuestos y su permeabilidad a través de la membrana (Durrheim, H., *et al.*, 1980), (Schaefer, H., *et al.*, 1996d).

III.4.1.1. Tipos de celdas de difusión

Una celda de difusión con un diseño correcto debe reunir una serie de características (Brain, K.R., *et al.*, 1998):

- Estar fabricada a partir de materiales inertes.
- Resistencia mecánica.
- Fácil manejo.
- Permitir el uso de membranas de distinto grosor.
- Proporcionar una buena homogeneización del medio en el compartimento receptor.
- Asegurar un contacto total entre la membrana y la fase receptora evitando la presencia de burbujas de aire, etc.
- Mantener una temperatura constante y controlable.
- Poseer volúmenes y áreas de difusión calibrados de una manera precisa.
- Ser capaz de mantener la integridad de la piel, a lo largo del ensayo.
- Tener la posibilidad de muestreo sencillo y, si es posible, automatizable.
- Disponibilidad de la celda a un coste razonable.

Existen diversos tipos de celdas de difusión agrupadas como celdas estáticas o celdas dinámicas. Entre el compartimento donador y el compartimento receptor, se coloca una membrana bien de origen sintético o de origen natural.

- Celdas de difusión estáticas

- Celdas horizontales: su diseño, descrito en **Fig. 21.**, considera con exactitud los principios de la difusión según los cuales el compuesto en cuestión difunde a través de la correspondiente membrana desde el compartimento donador (en solución) al receptor (misma solución) manteniéndose en agitación ambas soluciones. La concentración del compuesto en el compartimento donador no disminuye significativamente a lo largo del experimento. La aplicación de este diseño es importante en aquellos estudios donde es relevante el establecimiento del estado estacionario. Se provoca una excesiva hidratación del estrato córneo y consecuentemente, una disminución de la función de barrera del mismo (Durrheim, H., *et al.*, 1980), (Bronaugh, R.L., *et al.*, 1985), (Bronaugh, R.L., 1989), (Schaefer, H., *et al.*, 1996d), (Brain, K.R., *et al.*, 1998).

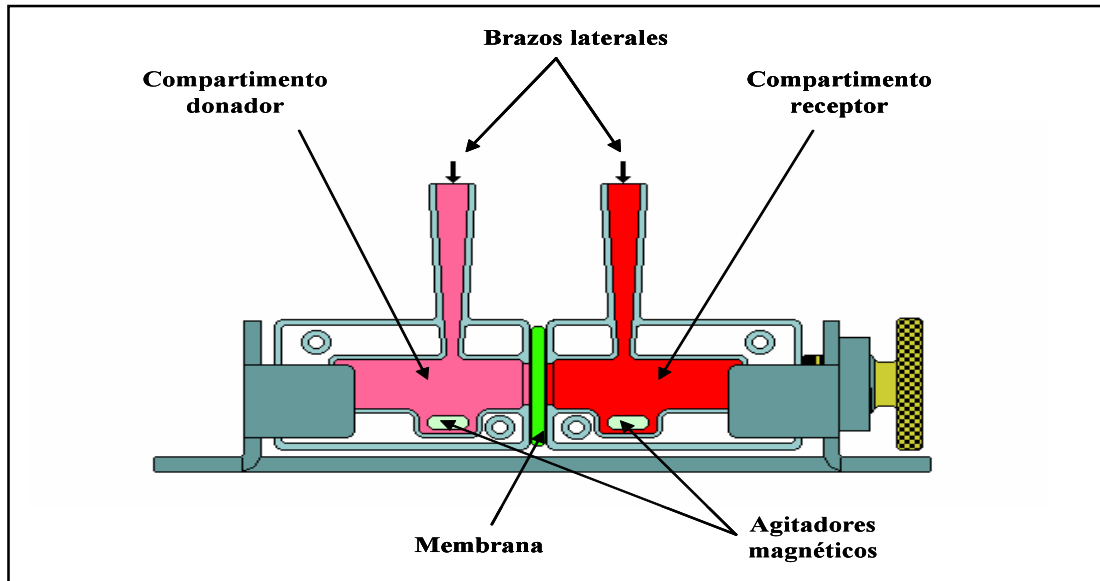


Fig. 21. Diseño celda horizontal.

- Celdas verticales : el principal exponente de este tipo de celdas lo constituye la celda de Franz, descrito en Fig. 22. Con el objetivo de estudiar la absorción en piel simulando las condiciones *in vivo*, Franz (Franz, T.J., 1975) diseñó una celda de difusión estática que se asemejaba a esta situación. Mediante este procedimiento, la piel por su lado epidérmico está expuesta a las condiciones ambientales y, por su lado dérmico, bañada por un fluido receptor en continua agitación dispuesto en un recipiente debajo de la piel (compartimento receptor), a partir del cual, se retiran alícuotas cuyo análisis permite la monitorización de la absorción de los compuestos que han atravesado la membrana (Bronaugh, R.L., *et al.*, 1985), (Bronaugh, R.L., 1989), (Schaefer, H., *et al.*, 1996d), (Brain, K.R., *et al.*, 1998).

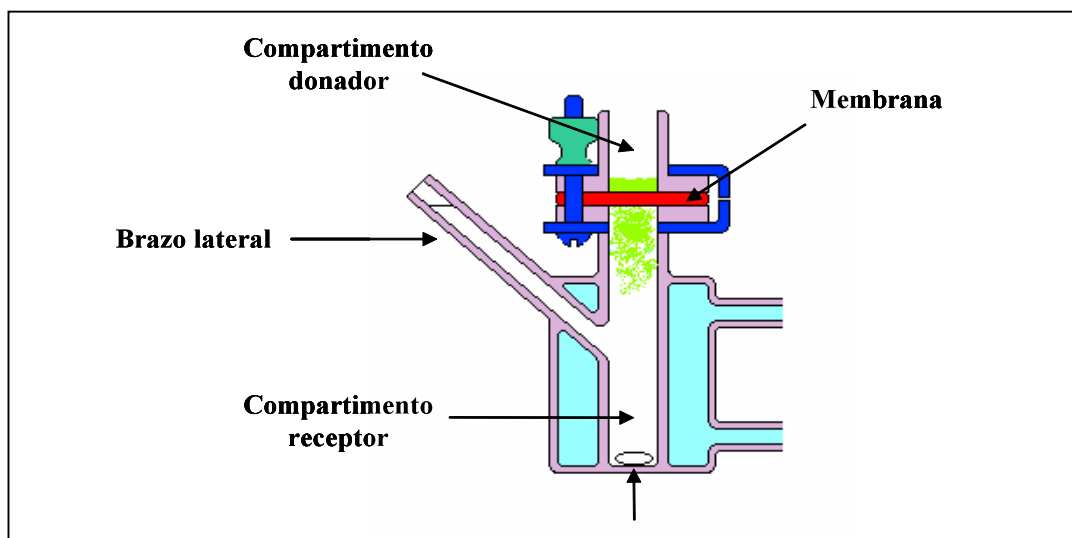


Fig. 22. Diseño celda de Franz.

- Celdas de difusión dinámicas:

Frente a la celda de difusión estática descrita por Franz (Franz, T.J., 1975), aparece la celda de difusión de flujo continuo (Bronaugh, R.L., *et al.*, 1985), descrita en **Fig. 23**, en la cual, el medio receptor fluye bajo la piel (lado de la dermis) recogiendo el material penetrado a través de la membrana al compartimento receptor y depositándolo en viales colocados en un colector de fracciones. Dentro de la cámara receptora existe una apropiada agitación al crearse una ligera presión de retorno cuando el fluido es forzado a salir por la pequeña conexión de salida, situación que además asegura un contacto íntimo del fluido con la piel. Este diseño de celda presenta una serie de ventajas de entre las que destacan (Bronaugh, R.L., *et al.*, 1985), (Bronaugh, R.L., 1989), (Schaefer, H., *et al.*, 1996d), (Brain, K.R., *et al.*, 1998), (Bronaugh, R.L., *et al.*, 1999):

- Facilidad de automatización.
- Mantenimiento de las condiciones sumidero imitando más fielmente las condiciones *in vivo*.
- Distribución de los compuestos hidrófobos desde la piel al compartimento receptor de una manera más fisiológica, debido al continuo reemplazamiento de fluido receptor.
- Posibilidad de mantener más fácilmente la viabilidad de la piel en experimentos de larga duración, usando soluciones fisiológicas como fluido receptor que se renueva constantemente.

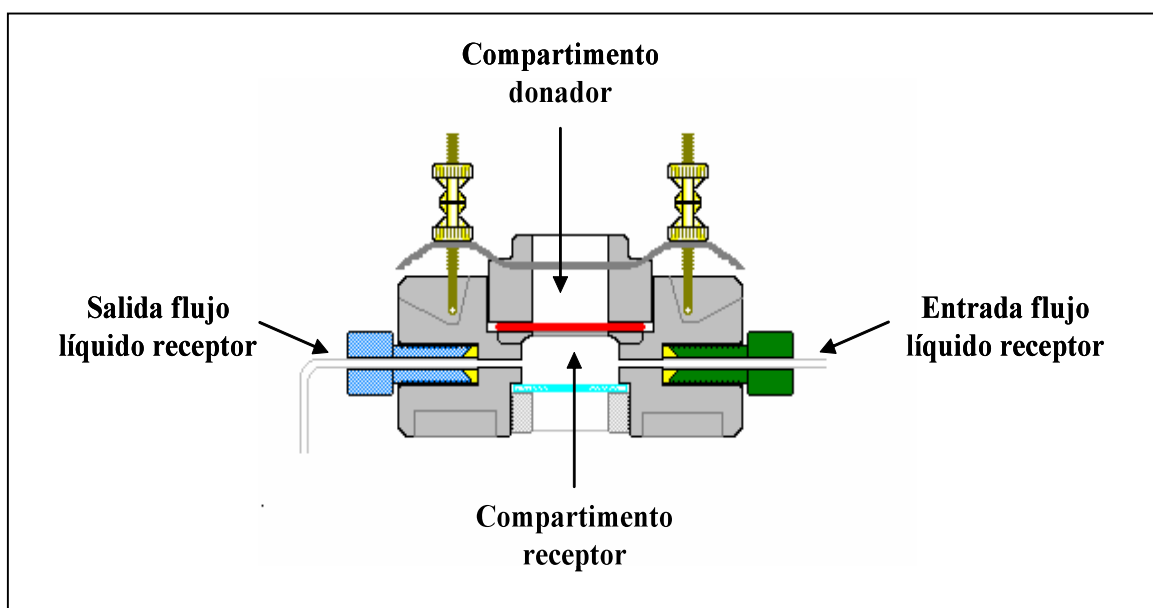


Fig. 23. Diseño celda de difusión de flujo continuo.

El fluido receptor ideal debe proporcionar una simulación exacta de las condiciones de penetración *in vivo* del compuesto a estudiar. Como regla general, la concentración del compuesto en el fluido receptor no debe exceder el 10% de la solubilidad máxima a la temperatura de trabajo (condiciones “shink” o sumidero); una excesiva concentración en la fase receptora conduciría a una disminución en la velocidad de absorción. En la elección del fluido receptor hay que tener en cuenta la posibilidad de interferencia con la barrera de la piel. Cualquier solución amortiguadora fosfato salina a un pH =7,4 es el líquido más comúnmente utilizado aunque, como se indica a continuación, no es siempre la elección más apropiada. Se ha determinado que en compuestos con una solubilidad en agua < 10 µg/ mL, puede ser necesario la adición de solubilizadores. Con el fin de inhibir el crecimiento microbiano se pueden añadir agentes antibacterianos al líquido receptor. Si se pretende mantener la viabilidad de la piel, el compartimento receptor debe contener una solución fisiológica con adecuadas proporciones de nutrientes (Bronaugh, R.L., 1989), (Brain, K.R., *et al.*, 1998), (Bronaugh, R.L., *et al.*, 1999).

III.4.1.2. Variables de trabajo en experimentos de difusión *in vitro*

- Tipos de membranas

La variable más importante en este tipo de ensayos es la naturaleza de la membrana. Se recomienda el uso de piel humana en este tipo de experimentos evitando la extrapolación de datos desde un modelo animal, sin embargo, y debido principalmente a las dificultades de su obtención, se sustituye frecuentemente por piel de origen animal (Bronaugh, R.L., 1989), (Brain, K.R., *et al.*, 1998). No existe ningún modelo animal que se asemeje completamente a la piel humana (Durrheim, H., *et al.*, 1980), presentando el estrato córneo humano características únicas en cuanto a su grosor y densidad folicular (Bronaugh, R.L., 1989). Las diferentes capas que constituyen la piel humana presentan unas determinadas dimensiones: el estrato córneo, tiene un espesor de 10-20 µm, la epidermis de 50 a 100 µm y la dermis e hipodermis ocupan 1- 2 mm (Schaefer, H., *et al.*, 1996a), (Bouwstra, J.A., *et al.*, 2003). El origen de este tipo de piel en los ensayos de difusión *in vitro* es, generalmente, procedente de autopsia de cadáver (dentro de las 24 horas de la muerte del donador) o quirúrgico (Schaefer, H., *et al.*, 1996d). Sin entrar a considerar la variabilidad interindividual, la piel de un mismo individuo presenta considerables diferencias en las distintas regiones anatómicas. Por ello se suele seleccionar la piel abdominal y del pecho

como representativo de la piel total, ya que la superficie de las áreas que presentan mayor permeabilidad son pequeñas (escroto, frente, área detrás de la oreja), mientras que las áreas con comparable o menor permeabilidad (espalda, extremidades) son mayores (Schaefer, H., *et al.*, 1996c).

Las pieles de mamíferos sin pelo son utilizadas como posibles aproximaciones por las similitudes que presentan a la piel humana en la escasa distribución de pelo y en las características de la epidermis. El ratón sin pelo es una de las especies más usadas como alternativa al uso de piel humana (Durrheim, H., *et al.*, 1980), (Bond, J.R., *et al.*, 1988) en los ensayos de difusión *in vitro* al ser un animal pequeño, cuya piel dorsal y abdominal, al no encontrarse adherida a las vísceras, permite retirar la membrana con un grosor uniforme siendo fácil su manejo. Un modelo de piel adecuado debe ser al menos cualitativamente, e idealmente cuantitativamente similar a la barrera que presenta la piel humana, comportamiento que algunos autores (Durrheim, H., *et al.*, 1980) comprobaron en los estudios de permeabilidad de diversas moléculas a través de piel de ratón sin pelo.

- Obtención y preparación de la piel

Dentro de la metodología *in vitro* la preparación de la piel es un paso crítico y se pueden emplear diferentes métodos (Brain, K.R., *et al.*, 1998) de acuerdo a factores como la naturaleza fisicoquímica de los agentes a penetrar, los datos que se quieren obtener o la disponibilidad del tejido. Se puede utilizar piel completa, piel a la que se le ha retirado el tejido subcutáneo, membranas epidérmicas obtenidas por tratamiento por calor compuestas de estrato córneo y epidermis viable, membranas de estrato córneo cuya obtención requiere tratamiento enzimático. Sin embargo, la preparación de secciones cutáneas requiere tiempo y aumenta la posibilidad de dañar la membrana, motivos, que inducen a valorar las razones de no usar piel completa.

Otro aspecto a tener en cuenta es el de comprobación de la integridad de la piel. Esta puede realizarse de una manera cualitativa por simple examinación visual y de una manera cuantitativa a través de diversos parámetros como la determinación de la constante de permeabilidad del agua (Bronaugh, R.L., *et al.*, 1986), (Schaefer, H., *et al.*, 1996d), (Brain, K.R., *et al.*, 1998), el porcentaje de agua absorbida en un período determinado (Bronaugh, R.L., *et al.*, 1986), la medida de la pérdida del agua transepidérmica (TEWL) (Schaefer, H.,

et al., 1996d), y la determinación de la resistencia de la piel al paso de iones (Trottet, L., *et al.*, 2005).

Dado que la disponibilidad que presenta la piel humana no permite utilizar piel fresca a menudo, es necesario desarrollar un método de almacenamiento adecuado (Babu, R.J., *et al.*, 2003). La congelación, puede no solo eliminar la viabilidad del tejido sino inducir alteraciones fisicoquímicas en la membrana (Durrheim, H., *et al.*, 1980), (Bronaugh, R.L., *et al.*, 1986). En este sentido Wester y colaboradores desarrollaron un método para mantener la viabilidad de la piel humana y sus características por períodos de hasta 8 días (Wester, R.C., *et al.*, 1998). Estos autores demostraron la viabilidad del tejido tras su conservación durante el tiempo señalado, manteniendo la piel a 4°C sumergida en Medio mínimo esencial de Eagles isotónico con sal de Earle (MEM-EBSS) conteniendo gentamicina como agente bacteriostático. Este fue el método de conservación utilizado en nuestros estudios con piel humana, tal y como se describe en el apartado correspondiente del presente trabajo (III.4.2.2).

Debido a los problemas de disponibilidad, variabilidad, etc que provoca la utilización de piel natural (de origen humano o animal), se plantea en diversos estudios la utilización de membranas sintéticas artificiales. En este sentido se han evaluado diversos tipos de membranas como modelos en estudios de absorción percutánea, ofreciendo la posibilidad de proporcionar un sistema menos variable. Las membranas de polidimetilsiloxano (PDMS) (elastómero no poroso, apolar y amorfo a temperatura ambiente con unas características de solubilidad cercanas a las del hexano) constituyen una barrera hidrófoba, no porosa, inerte y reproducible. Además requieren unas condiciones de manejo menos estrictas y pueden ser obtenidas en una variedad de formas y grosores presentando una lipofilia similar a la del estrato córneo (Twist, J.N., *et al.*, 1989), (Brain, K.R., *et al.*, 1998).

- Temperatura de trabajo

Los experimentos de difusión *in vitro* se llevan a cabo normalmente manteniendo una temperatura superficial de la piel de 32 °C (valor *in vivo*) (Schaefer, H., *et al.*, 1996d), (Brain, K.R., *et al.*, 1998). Estas condiciones se consiguen atemperando la solución receptora (Franz, T.J, 1975), sumergiendo las celdas en un baño de agua (Durrheim, H., *et al.*, 1980) o perfundiendo agua a una determinada temperatura a través de un sistema de

termostatación que cubre la celda (Bronaugh, R.L, *et al.*, 1985). Es necesario validar qué temperatura de trabajo debe seleccionarse en cada equipo para garantizar una temperatura en la superficie de la membrana de 32 °C (Córdoba-Díaz, M., *et al.*, 2000).

- Procedimiento de aplicación del principio activo

La manera en la que se aplica una sustancia sobre la superficie de la piel puede ser determinante en su posterior absorción. Deben considerarse diversos factores en la selección de un procedimiento adecuado, como: la naturaleza del vehículo, la concentración del principio activo, la cantidad de formulación aplicada, el mecanismo de aplicación, el tiempo de exposición y el sistema para retirar el vehículo aplicado, si es necesario (Brain, K.R, *et al.*, 1998).

En función de la de la dosis de principio activo aplicada, podemos hablar de sistemas con dosis finitas o con dosis infinitas . En un experimento con dosis finitas, se aplica una cantidad determinada de formulación mimetizando las condiciones “en uso” (Schaefer, H., *et al.*, 1996d), (Brain, K.R., *et al.*, 1998). Estas condiciones permiten la evaporación de los constituyentes volátiles de la formulación aumentando las concentraciones relativas del vehículo residual en la superficie de la piel al igual que sucede bajo condiciones reales “in vivo” (Schaefer, H., *et al.*, 1996d). A su vez, durante el experimento podría existir una marcada disminución de la dosis en el compartimento donador (Brain, K.R., *et al.*, 1998).

Cuando se trabaja a dosis infinitas, se dispone una cantidad suficiente de compuesto sobre la piel de modo que no exista, prácticamente, cambios en la concentración del compartimento donador durante el experimento (Brain, K.R, *et al.*, 1998). Debido a la gran cantidad de formulación aplicada se produce una oclusión de la piel siendo la evaporación de la muestra insignificante y creando condiciones no fisiológicas con velocidades de absorción exacerbadas (Schaefer, H., *et al.*, 1996d). Es un método apropiado si dentro de los objetivos. experimentales se incluye el cálculo de parámetros de difusión, como el coeficiente de permeabilidad, o la investigación de mecanismos promotores de la penetración (Brain, K.R, *et al.*, 1998).

- Tiempo de duración del experimento

Aunque algunos autores han extendido la duración de los experimentos de difusión *in vitro* hasta 120 horas se recomienda que se limiten a 24 o 48 horas. En ensayos realizados con dosis infinitas, 48 horas puede ser un tiempo corto para establecerse un estado estacionario pudiéndose alargar hasta 72 horas en tales casos (en presencia de agentes antimicrobianos) según la ECVAM (Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos). Los investigadores deben conocer la posible degradación de la piel por encima de los periodos de tiempo estructurados (Brain, K.R., *et al.*, 1998).

- Intervalo de muestreo en el compartimento receptor

En aquellos experimentos en los que la finalidad principal radica en la determinación de la cantidad total absorbida de un principio activo en el compartimento receptor, únicamente es necesario tomar una muestra al finalizar el experimento (Franz, T.J, 1975). Por el contrario, se establecen intervalos frecuentes de muestreo a lo largo de todo la experiencia cuando se quiere determinar parámetros de la difusión como por ejemplo el flujo, el tiempo de latencia, el estado estacionario (Franz, T.J, 1975), (Brain, K.R, *et al.*, 1998).

- Método de cuantificación del principio activo

A lo largo de lo años se han ido desarrollando diversos métodos para la cuantificación de los principios activos en piel como son las técnicas de extracción, sección horizontal en láminas, stripping, retirada de los folículos pilosos, autoradiografía cuantitativa y métodos espectroscópicos (Touitou, E., *et al.*, 1998). Todos estos métodos presentan sus ventajas e inconvenientes, en función de su mayor o menor accesibilidad, coste y rapidez en el desarrollo que detallamos a continuación.

Las medidas de cuantificación de principio activo a partir de su extracción en piel representa una fácil y rápida metodología que requiere un solvente adecuado y la aplicación de una técnica analítica sensible, como HPLC, que permita su cuantificación. La desventaja de este método es que no proporciona ninguna información sobre la localización del principio activo dentro de la piel (Touitou, E., *et al.*, 1998).

En cuanto a la sección horizontal de la piel en láminas esta se realiza mediante un criotomo, seccionándose paralelamente a la superficie en láminas y determinándose a través de una técnica analítica adecuada, la cantidad de principio activo en cada una de ellas. Entre los inconvenientes de esta técnica destacan la no diferenciación entre epidermis o dermis en las ondulaciones en la unión dermoepidérmica., así como, la falta de datos sobre la concentración de principio activo en las unidades pilosebáceas (Touitou, E., *et al.*, 1998).

Una estrategia complementaria a la técnica de seccionar la piel horizontalmente en láminas es la técnica del “stripping” que consiste en la retirada del estrato córneo presionando con una cinta adhesiva la zona de la piel en estudio y arrancándola posteriormente (Schaefer, H., *et al.*, 1996d), (Touitou, E., *et al.*, 1998), (Surber, C., *et al.*, 1999) (detalle **Fig. 24**). Se pueden retirar hasta las dos terceras partes de la capa córnea, pero no se consigue una completa eliminación de la misma, ya que tras realizar numerosos strippings, la superficie se vuelve húmeda y no se adhieren más células a la cinta adhesiva (Hojyo-Tomota, M.T., *et al.*, 1972). La cuantificación del principio activo en cada lámina, mediante un método analítico adecuado, permite establecer un perfil de concentración frente a la profundidad del estrato córneo (Touitou, E., *et al.*, 1998).

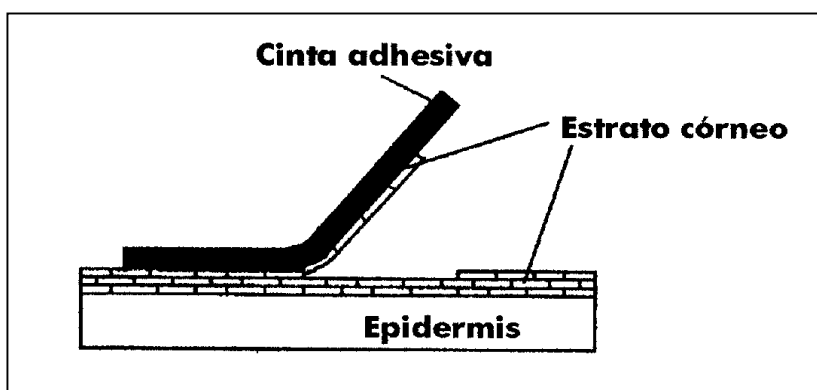


Fig. 24. Esquema de la realización de la técnica de stripping (Moser, K., K., *et al.*, 2001).

El “stripping” es un método muy utilizado tanto en la experimentación *in vivo*, como *in vitro*, aunque en el desarrollo experimental del presente trabajo únicamente nos interesa su aplicación a los ensayos de difusión *in vitro*. Esta técnica presenta una serie de inconvenientes relacionados con la distintas cantidades de estrato córneo retirado en cada cinta debido: a la influencia variable sobre las propiedades adhesivas de la cinta que tienen

los diferentes vehículos aplicados a la superficie de la piel, a la presencia de células procedentes de varias capas del estrato córneo por la presencia de arrugas en la membrana, la falta de descripción de un patrón que asegure la cantidad retirada de estrato córneo, y a la variación en la integridad de la membrana dependiendo de su origen (humana o animal), fuente (cadáver o cirugía), condiciones de almacenamiento y duración del experimento. Otro inconveniente es la cuantificación del principio activo por las posibles bajas concentraciones que se pueden encontrar en los stripping, especialmente cuando se aplican concentraciones similares a las reales, y por la dificultad en la extracción (Surber, C., *et al.*, 1999).

- Número de réplica

La recomendación más ampliamente citada respecto al número de réplicas realizadas en los estudios de difusión *in vitro* son doce, aunque se podría emplear un número menor si el coste, tiempo, o biodisponibilidad de la pieles supusiese un problema (Brain, K.R., *et al.*, 1998).

III.4.1.3. Mecanismos que rigen el proceso de difusión

La creencia de que el proceso de transporte a través de la piel de distintos compuestos se controla por mecanismos de difusión pasiva hace posible aplicar la leyes de difusión de Fick (Guy, R.H, *et al.*, 1989), (Hadgraft, J., 2001). El modelo matemático aplicado a los procesos de difusión considera cada capa de piel homogénea asumiéndose una función de barrera constante en cada una de ellas, y el establecimiento de un reparto del principio activo entre los distintos estratos (Guy, R.H, *et al.*, 1989).

-Primera Ley de Fick

La manera más sencilla de estudiar un proceso de absorción *in vitro* consiste en aplicar la primera ley de Fick la cual, podría ser una aproximación válida en algunos experimentos *in vitro*. Sin embargo, el estrato córneo es una barrera muy impermeable y por lo tanto, se requiere un largo tiempo para establecer las condiciones de estado estacionario (requisito para aplicar la primera ley de Fick), siendo improbable que se alcance en una aplicación terapéutica o cosmética. Por otra parte, este tipo estudios *in vitro* permite un análisis

general del fenómeno. El flujo de un compuesto a través del estrato córneo, membrana que se corresponde generalmente con el paso limitante a la difusión, puede ser descrito de forma simplificada a través de la primera ley de Fick mediante la ecuación:

$$\boxed{\frac{dQ}{dt} = \frac{DKC}{h}} \quad \text{(Ec. 7)}$$

donde dQ/dt es la velocidad de penetración en piel (flujo (J)), D es el coeficiente de difusión del principio activo en el estrato córneo, K es el coeficiente de reparto del compuesto entre la piel y el vehículo, C es la concentración del principio activo en el vehículo (se asume que la concentración del compuesto en la fase receptora es cero) y h es la longitud de camino difundido. Esta ecuación solo es válida en condiciones de estado estacionario y siempre que no existan interacciones significativas entre la sustancia activa y los componentes de la piel. (Guy, R.H., *et al.*, 1989), (Barry, B.W., 2001), (Hadgraft, J., 2001), (Moser, K., *et al.*, 2001).

Los parámetros fisicoquímicos principales que controlan la difusión de xenobióticos a través de la piel son: el coeficiente de reparto, el coeficiente de difusión y la solubilidad. No es fácil separar los valores de K y D , y el cálculo de su magnitud depende de h , que debido a la imprecisión que existe en la determinación de la tortuosidad de los canales intercelulares, no puede ser estimada de una manera correcta. Estas tres variables son agrupadas como una constante heterogénea denominada coeficiente de permeabilidad K_p ($= KD/h$) quedando la **Ec. 7** simplificada de la siguiente forma (Hadgraft, J., 2001):

$$\boxed{\frac{dQ}{dt} = J = K_p C} \quad \text{(Ec. 8)}$$

En función del fundamento matemático del proceso, existen una serie de parámetros que pueden ser utilizados en el desarrollo y optimización de una formulación dérmica desde el punto de vista teórico. Así, cambios en las características de una formulación pueden provocar modificaciones en las variables D , K y C que se relacionan entre sí según la **Ec. 7**, siendo estos parámetros, fundamentales a la hora de diseñar una formulación que busque una optimización de la penetración en piel de los principios activos (Guy, R.H., *et al.*, 1989). Un aumento de la difusión y solubilidad del principio activo en el estrato córneo, y

un aumento del grado de saturación del compuesto en el vehículo (referido a la concentración de principio activo disuelto en el vehículo respecto a la solubilidad del principio activo en dicho vehículo) son estrategias, basadas en la primera ley de Fick, cuyo objetivo es conseguir una mayor penetración en piel. La última estrategia está fundamentada en la interacción entre el principio activo y el vehículo, en cambio, las dos primeras, implican un efecto del vehículo en la función de barrera del estrato córneo (Moser, K., *et al.*, 2001).

- Segunda ley de Fick

Como antes se ha mencionado, es difícil que se lleguen a alcanzar las condiciones de estado estacionario en ensayos de difusión de principios activos, principalmente cuando se mimetizan las condiciones *in vivo*, siendo necesario aplicar la segunda ley de difusión de Fick para analizar los perfiles de flujo y concentración bajo estas condiciones. Esta 2ª ley de Fick se rige por la siguiente expresión general:

$$\boxed{\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}} \quad (\text{Ec. 9})$$

Soluciones a esta ecuación diferencial de segundo orden son complejas y dependen de las condiciones que limitan el experimento (Guy, R.H., *et al.*, 1989).

Diversos autores han aplicado un modelo matemático a un experimento de difusión *in vitro* basados en la 2ª ley de Fick (Parry, G.E., *et al.*, 1990), (Harrison, D.J., *et al.*, 1995), (Coceani, N., *et al.*, 2003). Diversos autores desarrollaron un modelo de difusión transdérmica en celdas de difusión de flujo continuo basado en una membrana constituida por dos capas, la primera capa se corresponde con el estrato córneo y la segunda capa con la epidermis viable- dermis. Cada capa se consideró homogénea y se caracterizó por un coeficiente de difusión efectivo que representa el transporte por todas las rutas de penetración y un coeficiente aparente de reparto que representa la absorción total del compuesto en todas las regiones dentro de cada capa de piel (Harrison, D.J., *et al.*, 1995). El modelo matemático referido se encuentra resumido en la **Tabla 1**.

Difusión en la membrana	
$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{ei} \frac{\partial^2 C_i}{\partial X^2}$ <p>cuando $x = 0$, $C_1 = K_1 C_{don}$ cuando $x = h$, $C_2 = K_2 C_{rec}$</p>	
<p>Bicapa: Flujo que sale de la capa 1 debe equilibrarse con el flujo que entra en la capa 2</p> $D_{e1} \frac{dC_1}{dx} = D_{e2} \frac{dC_2}{dx}$ <p>cuando $t = 0$, $C_1 = C_2 = 0$</p>	
Balance de masas en compartimento donador	Balance de masas en compartimento receptor
$\frac{\partial C_{don}}{\partial t} = \frac{A}{V_{don}} D_{e1} \frac{\partial C_1}{\partial x} \Big _{x=0}$ <p>Cuando $t = 0$, $C_{don} = C_{don}'$</p>	$\frac{\partial C_{rec}}{\partial t} = \frac{A}{V_{rec}} D_{e2} \frac{\partial C_2}{\partial X} \Big _{x=h} - \frac{F_{rec}}{V_{rec}} C_{rec}$ <p>Cuando $t = 0$, $C_{rec} = 0$</p>

Tabla 1. Descripción matemática del estado no estacionario en un experimento de difusión *in vitro* en celdas de difusión de flujo continuo. **C**: concentración del principio activo en una capa de la piel *i*. **x**: distancia a través de la piel. **h**: espesor efectivo de la piel. **D_e**: coeficiente de difusión efectivo. **K**: coeficiente de reparto aparente. **A**: área de piel disponible en la difusión. **V**: volumen del compartimento. **F_{rec}**: Flujo del líquido receptor a través de la cámara receptora. **1** se refiere a la capa de la piel constituida por el estrato córneo. **2** se refiere a la capa de la piel constituida por la epidermis viable-dermis. **don** se refiere a donador. **rec** se refiere a receptor.

El flujo intrínseco al compartimento receptor se determina a partir de la expresión (Harrison, D.J., *et al.*, 1995):

$$J_{intrin} = -D_e \frac{\partial C_2}{\partial X} \Big|_{x=h} \tag{Ec. 10}$$

El balance general de masas en el compartimento receptor de una celda de difusión de flujo continuo (celda de difusión utilizada en el trabajo actual), se describe según la relación:

$$V_{rec} \frac{dC_{rec}}{dt} = JA - F_{rec} C_{rec} \tag{Ec. 11}$$

donde V_{rec} es el volumen del compartimento receptor, C_{rec} = la concentración de compuesto en el compartimento receptor, J = el flujo de principio activo de la piel al compartimento receptor, A = el área de piel disponible en la difusión y F_{rec} = el flujo del líquido receptor a través de la cámara receptora. El término (dC_{rec}/dt) se refiere a la acumulación del compuesto en la celda del receptor.

Con el objetivo de simplificar el balance de masas, a menudo se ha asumido que la acumulación en la cámara receptora es tan pequeña que se considera despreciable. Esto en principio parecería razonable ya que el flujo de líquido receptor retira el principio activo, limitando físicamente su acumulación. En dicho caso el flujo aparente vendría expresado como (Harrison, D.J., *et al.*, 1995):

$$J_{ap1} = \frac{F_{rec} C_{rec}}{A} \quad (\text{Ec. 12})$$

Sin embargo, los resultados obtenidos por diversos autores indicaron que el J_{ap1} , generalmente, no es una buena estimación del flujo intrínseco principalmente en las fases tempranas del experimento de difusión, donde aparentemente la acumulación es mayor. Observaron, en ciertas condiciones experimentales que, aunque se asumiera que el término (dC_{rec}/dt) era pequeño, no era una razón suficiente para eliminarlo de la **Ec. 11**. Por otra parte, en el caso de principios activos de baja permeabilidad, o volúmenes de receptor muy pequeños combinados con flujos altos de líquido receptor, se conseguía una mejor estimación del flujo intrínseco a partir del J_{ap1} . Dichos autores, estudiaron un segundo flujo aparente (J_{ap2}) al tener en cuenta el término de acumulación en la **Ec. 11**, quedando la relación como (Harrison, D.J., *et al.*, 1995):

$$J_{ap2} = \frac{V_{rec} \frac{dC_{rec}}{dt} + F_{rec} C_{rec}}{A} \quad (\text{Ec. 13})$$

Se comprobó que la aproximación de J_{ap2} era una aproximación correcta del flujo intrínseco en todo el curso del experimento, excepto a tiempo cero (Harrison, D.J., *et al.*, 1995).

Diversos autores han estimado el flujo intrínseco a partir de los datos experimentales (C_{rec} frente al tiempo) obtenidos en los ensayos de difusión *in vitro* mediante el cálculo del flujo aparente a través de la Ec. 12 y Ec. 13 (Harrison, D.J., *et al.*, 1995), (Córdoba-Díaz, M. *et al.*, 2000).

En líneas generales la representación de la cantidad absorbida y acumulada de principio activo en función del tiempo, gráfica (Q - t) (Fig. 25) una vez atravesada la membrana, así como, el flujo establecido en función del tiempo, gráfica (J - t) (Fig. 25) presenta dos tipos de perfil diferentes según se hayan establecido condiciones de dosis infinitas o dosis finitas (Schaefer, H., *et al.*, 1996d).

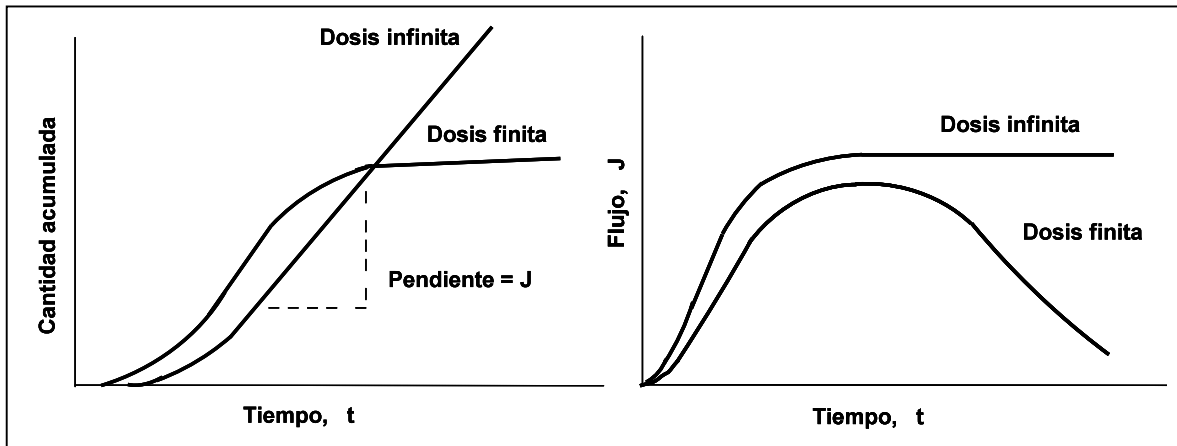


Fig 25. Perfiles de absorción expresados en cantidades acumuladas o en flujos con respecto al tiempo según tengamos un sistema de dosis finita o de dosis infinitas (Schaefer, H., *et al.*, 1996d).

En ensayos de difusión *in vitro* realizados bajo condiciones de dosis infinitas se establece un pseudo estado estacionario representado en la gráfica (Q - t) (Fig. 25) a través de una relación lineal, cuya pendiente se corresponde con el máximo flujo. Los valores de flujo cambian con el tiempo, observándose en la gráfica (J - t) (Fig. 25), como una vez que aparece el estado estacionario el valor del flujo máximo se mantiene constante. La K_p se calcula aplicando la primera ley de Fick (Ec. 8), a partir del valor de flujo en el estado estacionario (Schaefer, H., *et al.*, 1996d). La extrapolación de la porción lineal de la curva al eje “x” nos da el tiempo de latencia (Guy, R.H., *et al.*, 1989), (Parry, G.E., *et al.*, 1990), (Schaefer, H., *et al.*, 1996d) el cual, es una medida de la difusividad del compuesto relacionada con su volumen molecular y las propiedades de la barrera de la piel. Se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$D = \frac{h^2}{6L}$$

(Ec. 14)

En aquellos experimentos en los que se establecen condiciones de dosis finitas, al contrario de lo que sucede en condiciones de dosis infinitas, la cantidad acumulada en el compartimento receptor es limitada. El estado estacionario normalmente no se establece durante el periodo de exposición aplicado (reflejando las condiciones en uso) o es difícil de determinar (Schaefer, H., *et al.*, 1996d). Se observa un valor de flujo máximo en la gráfica (J – t) (**Fig. 25**) pero no se mantiene constante. Por todo ello es necesario estudiar cuidadosamente el diseño experimental de un determinado estudio de difusión para que se ajuste a un propósito específico y se obtengan parámetros relevantes (Brain, K.R., 1998).

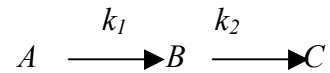
III.4.1.4. Comparación de resultados *in vivo-in vitro*

El objetivo primordial de la experimentación *in vitro* es la de realizar una estimación de la absorción percutánea *in vivo*. La dificultad en la realización de estudios con piel humana es la causa por la que la mayoría de los investigadores han utilizado el modelo animal para llevar a cabo las comparaciones *in vivo /in vitro*. En general los estudios realizados nos indican que las investigaciones *in vitro* proporcionan una buena predicción de la absorción percutánea *in vivo* siempre que los datos sean obtenidos teniendo en cuenta las variables apropiadas (Bronaugh, R.L, 1989), (Schaefer, H., *et. al.*, 1996d), (Hadgraft, J, *et al.*, 1998), (Simonsen, L, *et al.*, 2002).

III.4.1.5. Utilización de los sistemas de difusión *in vitro* para el análisis de permeabilidad de bicapas

En el desarrollo experimental del presente trabajo se han diseñado una serie de ensayos en celdas de difusión de flujo continuo a través de membranas hidrófilas, en las cuáles, se ha demostrado previamente que son impermeables al paso de liposomas pero no al paso de aciclovir. Se ha determinado la permeabilidad del principio activo encapsulado en vesículas con diferente composición lipídica. Estos estudios, siguen un modelo cinético representado por dos etapas claramente diferenciadas y caracterizadas respectivamente por las constantes de velocidad K_1 (constante de salida de los liposomas) y K_2 (constante de difusión a través de la membrana hidrófila). A dicho modelo cinético se le puede aplicar la

teoría de las reacciones consecutivas en el caso más simple donde en una serie de reacciones en cadena de primer orden, una sustancia A produce otra B , que a su vez produce una C , como se detalla a continuación:



siendo en el presente estudio $A = A_{in}$ (principio activo en el interior del liposoma), $B = A_{don}$ (principio activo cedido al compartimento donador), y $C = A_{rec}$ (principio activo cedido al compartimento receptor) como se observa en la **Fig. 26**.

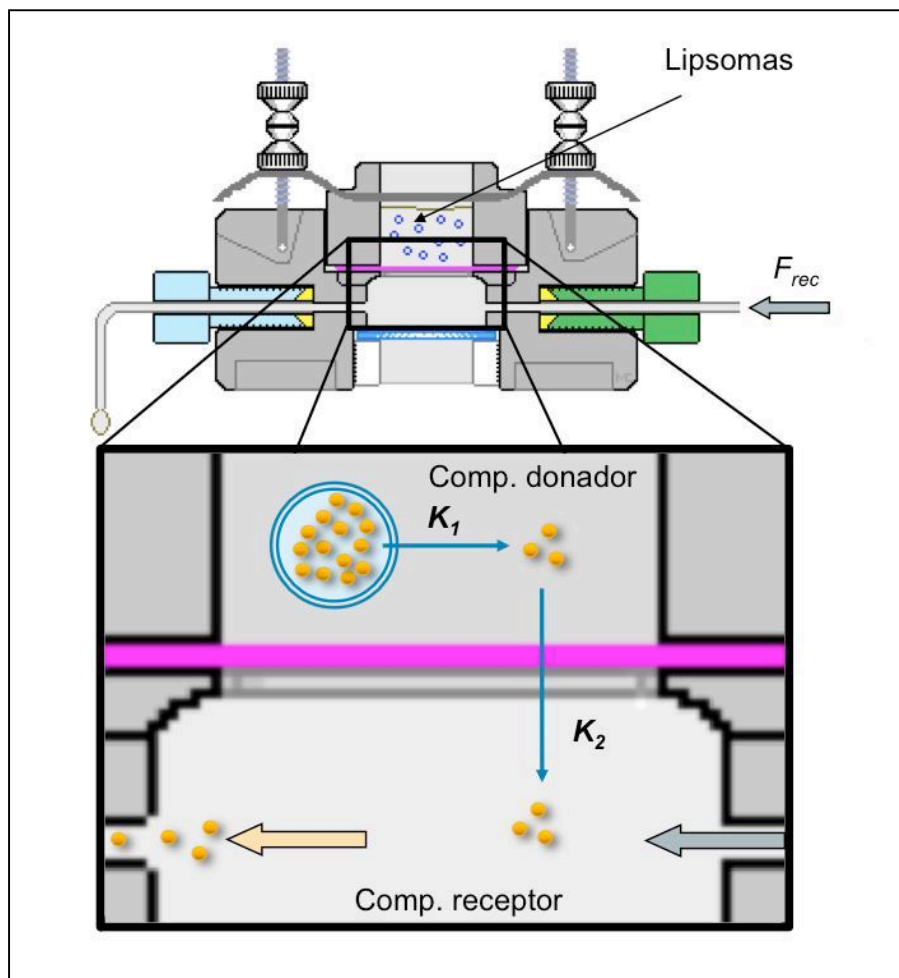


Fig. 26. Fundamento de la utilización de celdas de difusión *in vitro* en estudios de permeabilidad de bicapas liposómicas.

El objetivo del estudio es aplicar un ajuste matemático al modelo cinético previamente descrito, que permita a partir de los datos experimentales obtenidos (cantidad acumulada de principio activo en el compartimento receptor) calcular la K_1 . Para ello, se recurre a las

ecuaciones de velocidad (Peña, M.D., *et al.*, 1975), a través de las cuales se muestra como varía la concentración de una especie molecular con respecto al tiempo como función matemática de una constante de velocidad (K) y de las concentraciones de cada especie molecular que interviene en la reacción. El signo negativo indica que la concentración disminuye con el tiempo. Las ecuaciones diferenciales de velocidad ligadas a A_{in} , A_{don} y A_{rec} se describen a continuación:

$$-\frac{d[A]_{in}}{dt} = K_1[A]_{in} \quad (\text{Ec. 15})$$

$$\frac{d[A]_{don}}{dt} = K_1[A]_{in} - K_2[A]_{don} \quad (\text{Ec. 16})$$

$$\frac{d[A]_{rec}}{dt} = K_2[A]_{don} \quad (\text{Ec. 17})$$

En la **Fig. 27** se representan gráficamente las variaciones de $[A]_{in}$, $[A]_{don}$, y $[A]_{rec}$ con el tiempo. La concentración de A_{in} disminuye exponencialmente con el tiempo de acuerdo a la **Ec. 15**. La concentración de A_{don} empieza en cero, pasa por un máximo y vuelve a cero, ya que al final solo hay principio activo en el receptor (A_{rec}). La velocidad de formación de A_{rec} depende en todo momento de la concentración que haya de A_{don} por eso, al principio es cero, y alcanza su valor máximo (punto de inflexión de la curva) cuando la concentración de A_{don} es máxima.

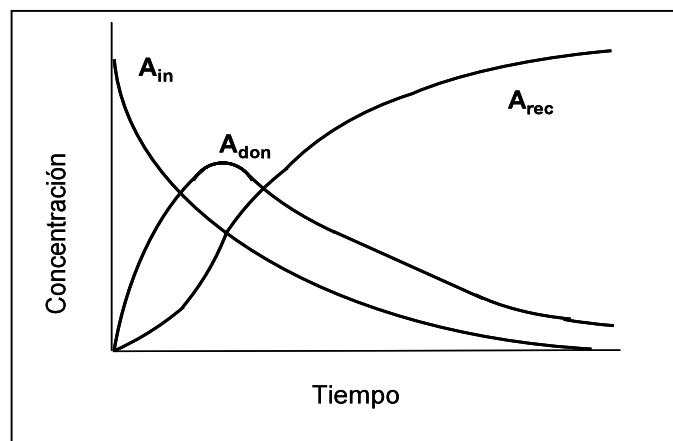


Fig. 27. Representación gráfica de las variaciones de $[A]_{in}$, $[A]_{don}$, $[A]_{rec}$ con el tiempo (Peña, M.D., *et al.*, 1975).

La **Ec. 15** se integra obteniéndose:

$$\boxed{[A]_n = [A]_n^0 \cdot e^{-K_1 t}} \quad (\text{Ec. 18})$$

donde $[A]_n$ es la concentración inicial en el interior del liposoma a $t = 0$. Sustituyendo este valor de $[A]_n$ en la **Ec. 16** resulta:

$$\boxed{\frac{d[A]_{don}}{dt} = K_1 [A]_n^0 e^{-K_1 t} - K_2 [A]_{don}} \quad (\text{Ec. 19})$$

que integrada (si $[A]_{don} = 0$) origina la siguiente expresión:

$$\boxed{[A]_{don} = [A]_n^0 \frac{K_1}{K_2 - K_1} (e^{-K_1 t} - e^{-K_2 t})} \quad (\text{Ec. 20})$$

En el balance total del proceso se cumple la siguiente igualdad:

$$\boxed{\frac{d[A]_n}{dt} + \frac{d[A]_{don}}{dt} + \frac{d[A]_{rec}}{dt} = 0} \quad (\text{Ec. 21})$$

por lo tanto,

$$\boxed{[A]_{in} + [A]_{don} + [A]_{rec} = cte. = [A]_{in}^0} \quad (\text{Ec. 22})$$

entonces,

$$\boxed{[A]_{rec} = [A]_n^0 - [A]_n - [A]_{don}} \quad (\text{Ec. 23})$$

o

$$\boxed{[A]_{rec} = [A]_n^0 \left[1 + \frac{1}{K_1 - K_2} (K_2 e^{-K_1 t} - K_1 e^{-K_2 t}) \right]} \quad (\text{Ec. 24})$$

Se puede simplificar más los cálculos de estimación de las constantes de velocidad, mediante la aplicación, en el estudio de las reacciones en cadena, de la aproximación del estado estacionario. En ella se supone que la concentración de los productos intermedios, en nuestro caso $[A_{don}]$, se mantiene constante durante el curso de la reacción. De este modo, suponiendo que:

$$\frac{d[A]_{don}}{dt} = 0 = K_1[A]_n - K_2[A]_{don} \quad (\text{Ec. 25})$$

resulta,

$$\frac{[A]_{don}}{[A]_n} = \frac{K_1}{K_2} \quad (\text{Ec. 26})$$

y, por tanto, siendo $[A]_n = [A]_n^p \cdot e^{-k_1 t}$ obtenemos,

$$[A]_{don} = [A]_n^p \frac{K_1}{K_2} e^{-K_1 t} \quad (\text{Ec. 27})$$

y,

$$[A]_{rec} = [A]_n^p - [A]_n - [A]_{don} = [A]_n^p \left[1 - \left(1 + \frac{K_1}{K_2} \right) e^{-K_1 t} \right] \quad (\text{Ec. 28})$$

Las ecuaciones (Ec. 27 y la Ec. 28) se comparan con las ecuaciones exactas (Ec. 20 y Ec. 24), siendo equivalentes si $K_2 \gg K_1$ y $t \gg 1/K_2$. La primera condición nos dice que la velocidad de paso del principio activo a través de la membrana hidrófila es mayor que la velocidad de salida del principio activo, mientras la segunda condición nos asegura que se ha pasado el periodo de inducción y que la concentración del principio activo en el donador está en estado estacionario. Por otra parte la aproximación $d[A]_{don}/dt = 0$ no quiere decir que la concentración de A_{don} sea constante durante la reacción (la Ec. 27, indica que disminuye con el tiempo), sino que debido al bajo valor de A_{don} dicha aproximación es buena.

Experimentalmente, sólo podemos acceder a los datos de concentración en el compartimento receptor ($[A]_{rec}$) a cada tiempo. Calculando en cada punto la cantidad acumulada cedida al compartimento receptor (Q_{rec}) y a partir de la **Ec. 28** llegamos a la siguiente expresión de trabajo:

$$Q_{rec} = Q_0 \left[1 - \left(1 + \frac{K_1}{K_2} \right) e^{-K_1 t} \right] \quad (\text{Ec. 29})$$

siendo Q_0 la cantidad inicial de principio activo encapsulada. Esta ecuación nos permite trabajar directamente con los datos experimentales de Q_{rec} con respecto a t según el modelo matemático de crecimiento monomolecular que presenta la siguiente forma:

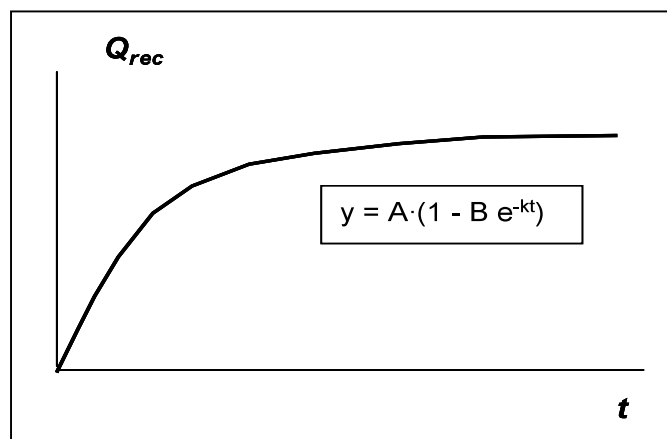


Fig. 28. Modelo cinético de crecimiento monomolecular.

La estimación mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados ajustando este modelo a nuestros datos experimentales nos permite calcular los parámetros A , B y K . Trasladando estas constantes a la **Ec. 29**, podemos calcular directamente el valor de los parámetros K_1 , K_2 y Q_0 .

III.4.1.6. Planteamiento general de los estudios de difusión in vivo/in vitro

Los ensayos clínicos en humanos confieren datos fidedignos sobre el estudio de una formulación tópica, pero su alto coste lleva al planteamiento de una alternativa mediante experimentos *in vitro* y / o *in vivo* a través de un modelo animal que presente unos límites razonables como alternativa a los estudios humanos.

Diversos autores desarrollaron un método *in vivo* con ratones sin pelo, que relacionaba cuantitativamente aspectos farmacocinéticos (flujo) y farmacodinámicos (eficacia), en la terapia antiviral de la infección cutánea por VHS-1. Para ello se emplearon sistemas de liberación (trans)dérmica con ACV (cinética de liberación de orden cero) sobre piel pretratada con Azona y se evaluó el patrón de lesión producido en la infección por VHS-1 (tras inoculación del virus) en el modelo animal seleccionado (piel de ratón sin pelo) según un protocolo de tratamiento, determinándose los niveles de eficacia tópica (0-100%) de dicha formulación para valores de flujo determinados (Gonsho, A., *et al.*, 1990), (Lee, P.H., *et al.*, 1992). Tras dichos estudios, se introdujo el concepto de C*, concentración del principio activo libre en el lugar de acción (capa basal de la epidermis), como medida de la eficacia de las formulaciones dermatológicas estudiadas (Imanidis, G. *et al.*, 1994).

Con el objetivo de valorar la C* a partir de los datos de flujo obtenidos en experimentos de difusión *in vitro* (con un modelo de piel de ratón sin pelo) y predecir la eficacia tópica del ACV en el tratamiento de infecciones cutáneas por VHS-1, Higuchi y colaboradores (Lee, P.H., *et al.*, 1993), (Patel, P.J., *et al.*, 1996), (Mehta, S.C., *et al.*, 1997), (Afouna, M.I., *et al.*, 1999) emplearon un modelo *in vivo/in vitro* donde se utilizó un régimen múltiple de dosis finitas (simulando la situación clínica) siguiendo un protocolo de tratamiento para determinar C* a partir de la siguiente ecuación:

$$C^* = \frac{J}{P_D}$$

(Ec. 30)

donde J es el flujo de ACV a través de la piel y P_D es el coeficiente de permeabilidad de la dermis (1,4 x 10⁻³ cm/s). La piel de ratón sin pelo no es estable más allá de 24 horas en las celdas de difusión de un experimento *in vitro* y, no se conocen métodos *in vivo* que determinen flujos en piel que proporcionen datos con suficientes precisión. De este modo se introdujo la combinación de un experimento *in vivo* – *in vitro* para obtener flujos *in vitro* relevantes. Se estableció la relación C*-eficacia (Lee, P.H., *et al.*, 1993), (Patel, P.J., *et al.*, 1996), (Mehta, S.C., *et al.*, 1997) a partir de los datos que relacionaban flujo- eficacia, calculados en estudios previos (Gonsho, A., *et al.*, 1990), (Lee, P.H., *et al.*, 1992).

III.4.2.

Descripción de los estudios llevados a cabo en nuestra memoria

III.4.2.1. Equipo de difusión

Se ha utilizado un equipo automático de difusión PermeGear® ILC- 07 (PermeGear® Riegelsville, PA) (**Fig. 29**), que incluye siete celdas de flujo continuo fabricadas de Kel-F® y colocadas en línea sobre un soporte, el cual, se conecta a un baño termostatzado de circulación Haake® - DC10 (Gebrüde Haake, Karlsruhe, Alemania) que mantiene la temperatura experimental de trabajo. El diseño de las celdas, desmontable, se describe en la **Fig. 30**. Está constituida por los siguientes componentes:

- Un compartimento donador (1) (Vol =1,10 cm³).
- Un soporte (2) con un orificio de 1cm de diámetro sobre el que se coloca la membrana (área de difusión efectiva 0,785 cm²).
- Un compartimento receptor (3) (Vol = 0,85 cm³) que presenta conexiones de entrada y salida para el fluido receptor y se cierra por la parte inferior con una tapa de cristal (4), ajustada mediante una contratuerca (5), que permite ver el contenido del interior.
- Todo el sistema se cierra herméticamente mediante una lámina de acero inoxidable (6), adaptada al compartimento donador, que se coloca sobre él encajándose a través de unas tuercas de cierre ajustable.

29.

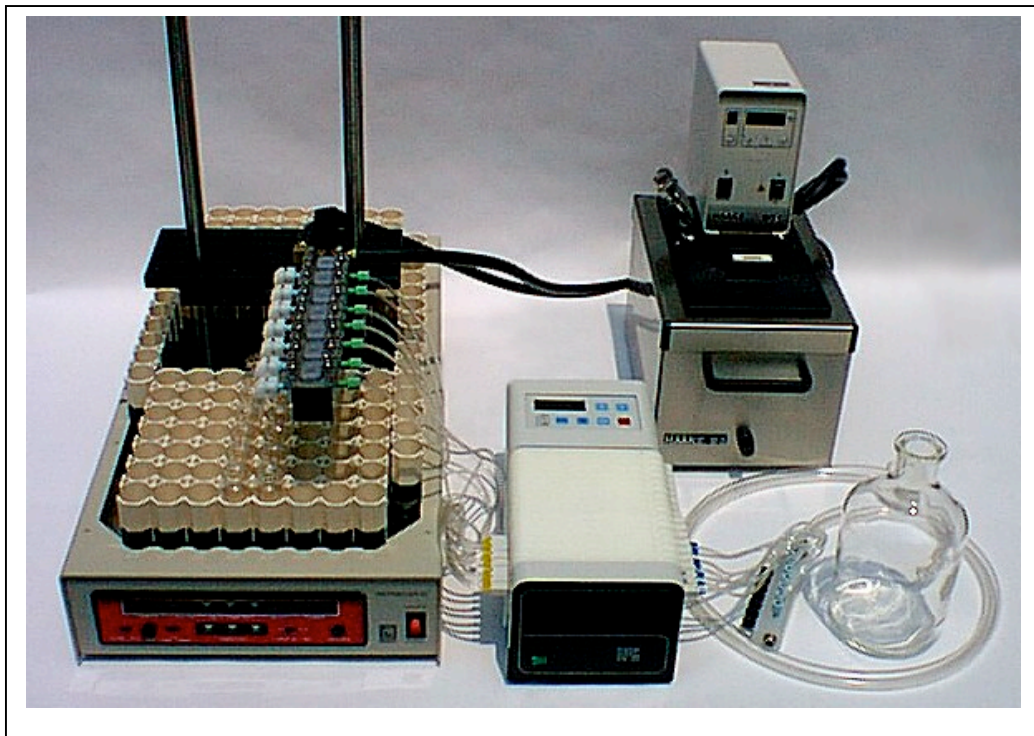


Fig.

Equipo de difusión de flujo continuo (PermeGear® ILC-07).

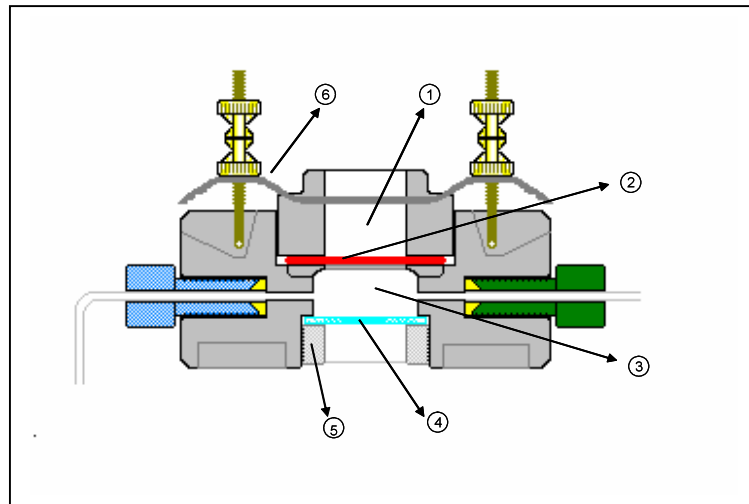


Fig. 30. Esquema de la celda de difusión de flujo continuo.

El medio receptor fluye a través del compartimento receptor mediante la incorporación de una bomba peristáltica programable de 16 canales Ismatec[®] IPC-16 (Ismatec, Zürich, Suiza) utilizando conductos de Tygon[™] conectados inicialmente al módulo de distribución, el cual se conecta a su vez a la botella reservorio de vidrio (Figs. 29 y 31). El fluido sale del compartimento receptor a través de un conducto de Tygon[™] hasta los tubos o viales dispuestos en un colector de fracciones Isco[®] Retriever IV (Isco, Lincoln, NE, USA). En los puntos de unión de los conductos de Tygon[™] al módulo de distribución y a las puertas de entrada y salida del compartimento receptor, se aplican conexiones 1/4-28 HPLC. El colector de fracciones se puede manejar de forma manual o mediante un controlador de muestreo programable (disponible por PermeGear[®]) (Fig. 29).

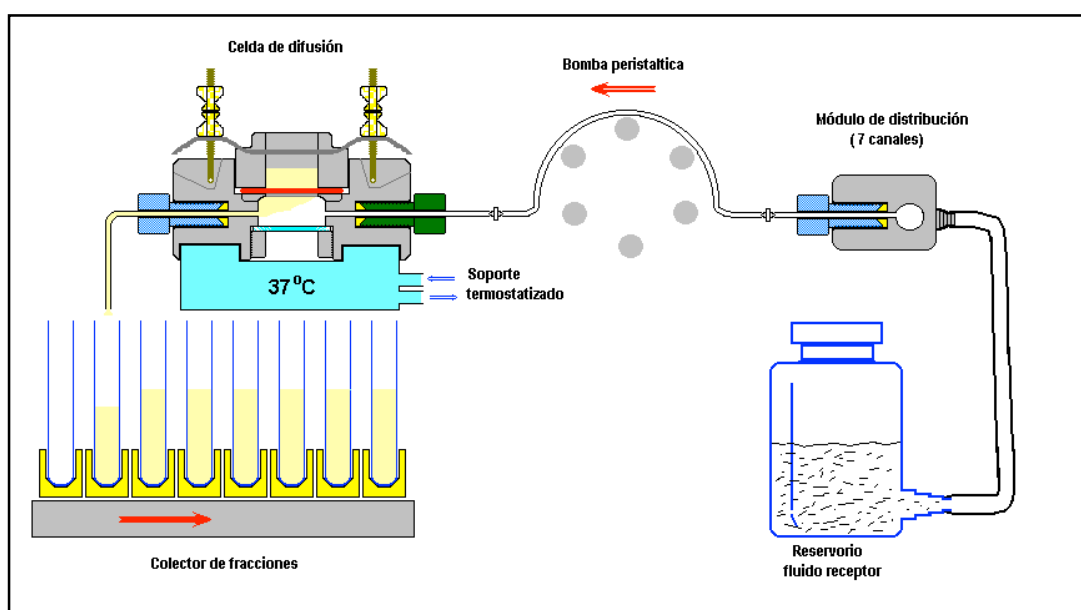


Fig. 31. Detalle funcionamiento aparato de difusión de flujo continuo.

Se realizó una validación previa de los elementos mecánicos del equipo de difusión automático de flujo continuo PermeGear[®] ILC-07 en nuestro laboratorio (Dpto Química-Física II, Facultad de Farmacia, UCM) (Córdoba-Díaz, M, *et al.*, 2000).

III.4.2.2. Preparación de membranas utilizadas

En el presente trabajo se han empleado distintos tipos de membranas de difusión de origen sintético o natural en función del diseño de cada experimento. Como membranas de origen sintético se utilizaron membranas hidrófilas, de colodión y de acetato de celulosa. Cabe destacar la utilidad del material derivado de la celulosa como membrana semipermeable en procesos de diálisis (Stamatialis, D.F. *et al.*, 2008). Y un modelo de Piel artificial, que constituía una membrana hidrófoba y no porosa denominada comercialmente Prolastic[™] (Pillar Surgical Inc.USA) de polidimetilsiloxano con características de lipofilia similares al estrato córneo que presentan un grosor de 127 μm .

Como membranas de origen natural se utilizaron piel de ratón sin pelo o piel humana. La piel de ratón sin pelo se obtuvo a partir de la piel dorsal de ratones albinos inmunocompetentes, hembras de edad comprendida entre 5 a 8 semanas, CLR: SKH1-HRBR (Charles River/Crifa). Los ratones fueron sacrificados con CO₂, extrayéndoles inmediatamente después mediante disección el trozo de piel dorsal. La piel humana, cuyo origen fue piel de cadáver de la zona abdominal, se almacenó hasta un máximo de 8 días a 4°C en una solución de conservación (Medio Mínimo Esencial de Eagles isotónico con Sal de Earle (MEM-BSS) y con gentamicina), manteniéndose en estas condiciones la viabilidad de la piel (Wester, R.C., *et al.*, 1998). Antes de utilizar tanto la piel humana como la piel de ratón se lavó con agua Milli-Q y se retiró por disección el tejido subcutáneo.

Se obtuvieron trozos cuadrados de aproximadamente 1cm de lado se montaron en las celdas de difusión como se observa en **Fig. 32**, orientando en el caso de piel natural siempre el estrato córneo hacia el compartimento donador y la dermis hacia el compartimento receptor.

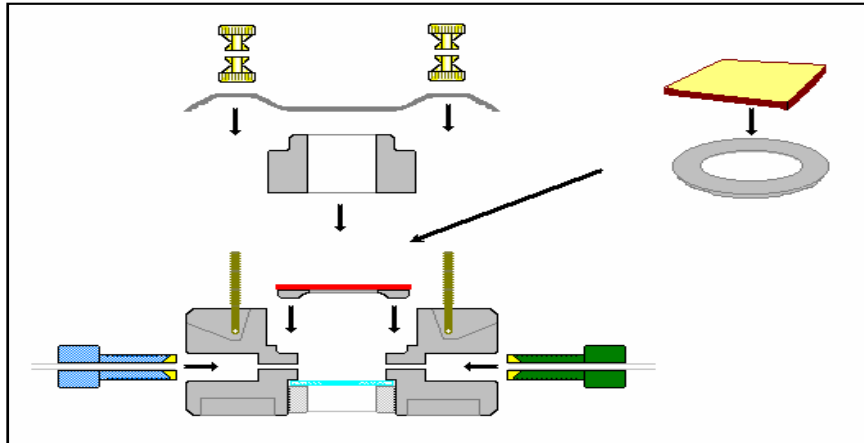


Fig. 32. Detalle del montaje de membrana o piel en las celdas de difusión.

III.4.2.3. Descripción de los estudios de difusión *in vitro* realizados

Una vez montadas las celdas con la membrana de difusión correspondiente, se llenaron los compartimentos receptores con una solución receptora asegurándose de que no quedaban burbujas de aire debajo de la membrana. En el caso de ensayos donde se utilizó piel de origen natural, tras un periodo de acondicionamiento de 30 minutos se recogían muestras de medio receptor a modo de blanco. El ensayo de difusión propiamente dicho comenzaba con la disposición de la muestra correspondiente en el compartimento donador y con la puesta en marcha de la bomba y el programador, ajustando así, el flujo de trabajo del medio receptor (F_{rec}) y los intervalos de muestreo.

III.4.2.3.1. Estudios de permeabilidad de bicapas

Se llevaron a cabo una serie de ensayos de difusión *in vitro* a través de una membrana de difusión hidrófila con el objeto de conocer la permeabilidad de diversas bicapas lipídicas, frente a la molécula atrapada en liposomas. En estos ensayos se utilizaron dosis finitas y condiciones oclusivas (se taparon las celdas con una lámina de cierre). Con el fin de seleccionar una membrana hidrófila que ofreciera baja resistencia a la difusión del principio activo e impermeabilidad al paso de las vesículas, inicialmente, se realizaron estudios a partir de una membrana de colodión y de acetato de celulosa. En dichos estudios se determinaron las cantidades cedidas acumuladas de principio activo en el compartimento receptor en función del tiempo (perfiles de cesión), y el coeficiente de permeabilidad (K_p). Tras seleccionar la membrana de difusión adecuada, se realizaron los

ensayos con vesículas donde se encapsuló una sonda fluorescente (5(6) carboxifluoresceína, suministrada por Eastman-Kodak) en liposomas de composición POPC y DOPC, y posteriormente el ACV en liposomas de composición POPC, DOPC y H-SPC/COL (60/40)(mol/mol). Como parámetros de estudio se calcularon la constante de la velocidad de salida del principio activo del liposoma (K_1) y el coeficiente de permeabilidad (K_p).

El parámetro K_1 se determinó a partir de la **Ec. 29**, una vez conocida la cantidad cedida acumulada de principio activo en el compartimento receptor (Q_{rec}) en función del tiempo. Para ello, tras cuantificar las concentraciones de la molécula cedida al compartimento receptor (C_{rec}) a un tiempo determinado, se calculó la Q_{rec} mediante una acumulación matemática de los datos, ya que no existe, en este tipo de celdas una acumulación real de principio activo en el receptor.

En los sistemas de difusión de dosis infinita puede calcularse K_p (cm/h) según la primera ley de difusión de Fick (**Ec. 8**), a partir del valor del flujo del principio activo en el estado estacionario. Sin embargo, los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo se realizaron en condiciones de dosis finitas, en los cuales no llega a alcanzarse de forma clara el estado estacionario. En estos casos se determina el K_p mediante el flujo máximo aparente (J_{max}) equivalente al flujo intrínseco en el estado estacionario. Para ello, el valor de flujo aparente (J_{ap}) para cada intervalo de tiempo, se obtuvo mediante la **Ec. 13**, calculándose el término de acumulación (dC_{rec}/dt) numéricamente a partir de los datos de C_{rec} frente al tiempo (Harrison, D.J., *et al.*, 1995). Como se observa en la **Fig. 25**, en condiciones de dosis finitas, el flujo experimental aumenta hasta llegar a un máximo y decrece a partir de este valor. Dicho comportamiento permitió ajustar el perfil del flujo obtenido experimentalmente a una función bi-exponencial como la expresada a continuación (Córdoba-Díaz, M., *et al.*, 2000):

$$J = B \left(e^{-v_1 t} - e^{-v_2 t} \right) + C \quad (\text{Ec. 31})$$

donde B es una constante relacionada con la cantidad de principio activo que ha penetrado desde cero a infinito y v_1 y v_2 son las constantes aparentes de velocidad crecientes y decrecientes del flujo. A partir de la primera derivada de la **Ec. 31** se obtuvo el valor del

tiempo en alcanzar el flujo máximo ($t_{j_{\max}}$) y flujo máximo aparente (J_{\max}). Se aplicó la primera ley de Fick (Ec. 8) lo que dió lugar a la siguiente expresión:

$$Kp = \frac{J_{\max}}{C_o} \quad (\text{Ec. 32})$$

donde C_o es la concentración de principio activo de partida en el vehículo.

El ajuste de los modelos cinéticos a los datos experimentales se llevó a cabo por regresión no lineal mediante ajuste estadísticos por mínimos cuadrados ponderados utilizando un programa estadístico adecuado SIMFIT.

Hay que reseñar que en estos ensayos de difusión la solución receptora era la misma que la solución amortiguadora utilizada en la formulación a estudiar.

III.4.2.3.2. Difusión de geles a través de membranas hidrófilas

Con el fin de preparar una formulación liposómica de consistencia adecuada en la administración tópica, se estudió la difusión del principio activo ACV en un gel liposómico a través de membranas hidrófilas, utilizando dosis finitas y condiciones oclusivas (se taparon las celdas con una lámina de cierre). Inicialmente, se investigó en geles de ACV con diferente concentración de agente gelificante (Carbopol®-980) (0,5%, 1%, 1,5 %) la influencia de la viscosidad del gel en la difusión del ACV al comparar las cantidades cedidas acumuladas de principio activo en el compartimento receptor en función del tiempo (perfiles de cesión), y el coeficiente de permeabilidad (Kp) determinado. Tras seleccionar aquella concentración de agente gelificante que ofrecía una menor resistencia a la difusión del principio activo, se prepararon geles liposómicos formados por vesículas con ACV encapsulado y disuelto en el medio de dispersión a partir de las bicapas lipídicas POPC y DOPC.

El comportamiento del principio activo ACV en este sistema liposómico se rige por dos constantes $K_{\text{mayoritaria}}$ y la $K_{\text{minoritaria}}$. La $K_{\text{mayoritaria}}$ interviene en mayor medida en el proceso siendo por tanto el factor limitante del sistema y engloba la difusión del principio activo a través de la bicapa lipídica y la estructura de gel. Por otra parte la $K_{\text{minoritaria}}$ se refiere a la

difusión del ACV a través de la membrana hidrófila. Se ajustaron los datos de Q_{rec} obtenidos experimentalmente a la siguiente función biexponencial:

$$\boxed{\%Cedido = B1(1 - e^{-k1t}) + B2(1 - e^{-k2t})} \quad (\text{Ec. 33})$$

El ajuste matemático de los datos experimentales y la determinación del K_p , se realizaron siguiendo las mismas pautas de estudio que en los ensayos previos de permeabilidad de bicapas. Igualmente, en estos ensayos de difusión la solución receptora era la misma que la solución amortiguadora utilizada en la formulación a estudiar.

III.4.2.3.3. Estudios de difusión a través de membranas lipófilas

Se realizaron una serie de estudios de difusión *in vitro* a través de membranas Prolastic™ de polidimetilxiloxano, utilizando dosis finitas y condiciones no oclusivas. Frente a la piel natural, la piel artificial es un sistema que presenta menor variabilidad y requiere unas condiciones de manejo menos estrictas. El objetivo de la realización de estos ensayos fue la de conseguir datos iniciales de acumulación de ACV en piel a partir de una suspensión liposómica, seleccionando en este estudio la bicapa lipídica de composición POPC. Los datos cuantificados de ACV en piel Prolastic™ a partir de las vesículas, se compararon con los obtenidos en los ensayos de difusión realizados con este tipo de membrana con la formulación comercial de referencia y con una solución del principio activo. Se obtuvieron datos de 6 pieles, para ello, en cada ensayo se aplicó la formulación a evaluar en 3 celdas ($n=3$), realizándose con cada formulación el ensayo por duplicado.

III.4.2.3.4. Estudios *in vitro* con piel de ratón sin pelo

Debido a los problemas de disponibilidad, manejo y variabilidad interindividual, que conlleva la utilización de piel humana se llevaron a cabo una serie de ensayos de difusión a partir de distintas suspensiones liposómicas utilizando como modelo animal piel de ratón sin pelo (SKH1-HRBR). En este tipo de estudios se utilizaron dosis finitas y condiciones no oclusivas. Tras finalizar los ensayos, se estudió la acumulación de ACV en piel y difundido a receptor con las distintas formulaciones en estudio. Se compararon los resultados cuantificados de ACV a partir de vesículas con los obtenidos con sistemas

convencionales de aplicación tópica en ensayos realizados, utilizando los mismos parámetros de trabajo, con una formulación de ACV crema y de ACV en solución, aplicando la misma concentración de principio activo que en las formulaciones liposómicas con el fin de que el parámetro concentración no fuera una variable experimental en estos ensayos. En todos los estudios donde se estudió la acumulación de ACV en piel viable (donde se localiza la capa basal de la epidermis, zona de acción del ACV), la cuantificación del principio activo se llevó a cabo una vez finalizado el ensayo al retirar el estrato córneo mediante 12 “stripping” y detectar de este modo el ACV que ha atravesado la capa córnea . Debido a los bajos parámetros de encapsulación por atrapamiento pasivo obtenidos con el aciclovir (ACV), se empleó la sal sódica del aciclovir (ACVNa) en todos los ensayos en los que aparece encapsulado en liposomas.

Con cada formulación se obtuvieron resultados, mínimo de 6 pieles procedentes de seis animales diferentes. Para ello, en cada ensayo se aplicó la formulación evaluada en tres celdas con piel, realizándose con cada formulación el ensayo al menos por duplicado (en días diferentes). Se realizó un estudio comparativo de los resultados obtenidos. En estas experiencias, se ha utilizado el análisis de varianza ANOVA de dos factores (tipo de formulación y ensayo) con varias muestras (celdas) por grupo en la comparación de los datos. De este modo, se tuvo en cuenta la variabilidad inter-animal (en cada celda se utiliza una piel procedente de un animal distinto) e inter-día (se obtuvieron datos de días diferentes pareados de tres en tres).

- Estudios con ACV libre

Con el fin de conocer la capacidad promotora de los liposomas, se realizó una batería de ensayos de difusión *in vitro* a partir de vesículas vacías con el principio activo ACV disuelto en el medio de dispersión. Se prepararon suspensiones de liposomas OLV y LUV a partir de diferentes composiciones y se estudió como influyen las características físicoquímicas de las vesículas, como la composición de la bicapa lipídica, tamaño y lamelaridad de la vesícula, sobre la acumulación cutánea del ACV. Se seleccionaron para estos ensayos las siguientes formulaciones que incluyen bicapas lipídicas puras o mixtas, cargadas o neutras, que presentan diferentes características de fluidez en la bicapa según su composición: DOPC, POPC, DPPC/COL (60/40) (mol/mol), DPPC/COL/SA (60/40/10) (mol/mol/mol), DPPC/COL/DPPG (60/40/10) (mol/mol/mol).

- Estudios con ACV encapsulado

En esta batería de ensayos se estudió el reparto a piel del ACV encapsulado en vesículas. Para ello, se prepararon suspensiones de liposomas OLV y LUV, con el principio activo encapsulado, de diferentes composiciones y se estudió como influyen las características físicoquímicas de las vesículas, como la composición de la bicapa lipídica, tamaño y lamelalidad de la vesícula, carga superficial y eficiencia de encapsulación en la acumulación cutánea del principio activo. Además en estos ensayos se estudió la influencia de la encapsulación del principio activo en el reparto a piel al comparar los resultados obtenidos de ACV en piel entre liposomas con ACV encapsulado y liposomas vacíos con ACV disuelto en el medio de dispersión. Se seleccionaron para estos ensayos las siguientes formulaciones que incluyen bicapas lipídicas puras o mixtas, cargadas o neutras, que presentan diferentes características de fluidez en la bicapa según su composición: DOPC, DOPC/DPPG (90/10)(mol/mol), POPC, POPC/DPPG (90/10) (mol/mol), DPPC/COL (60/40) (mol/mol), DPPC/COL/SA (60/40/10) (mol/mol/mol), DPPC/COL/DPPG (60/40/10) (mol/mol/mol).

- Acumulación en piel viable con formulaciones seleccionadas

En la siguiente batería de ensayos se investigó, a partir de suspensiones de liposomas LUV con ACV encapsulado, liposomas con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión, y liposomas vacíos LUV con ACV libre, la influencia de la encapsulación del principio activo en el reparto a piel viable y difusión a receptor del ACV. Las bicapas seleccionadas fueron la DPPC/DPPG/COL (60/40/10) (mol/mol/mol) y POPC, siendo esta última bicapa la que presenta mayores características de fluidez.

- Acumulación en piel viable: Influencia de la concentración de principio activo en compartimento donador con DPPC/COL/DPPG

El objetivo de los siguientes ensayos de difusión fue conocer la influencia de la concentración de principio activo encapsulado en la formulación donadora, en el reparto a piel viable y difusión a receptor del ACV. Para ello se prepararon suspensiones de liposomas LUV con diferente concentración de principio activo encapsulado. En función de los datos obtenidos en ensayos anteriores, la bicapa lipídica seleccionada para este estudio fue DPPC/DPPG/COL (60/40/10) (mol/mol/mol).

- Acumulación en piel viable: Influencia del tamaño y lamelaridad de vesícula en DPPC/COL/DPPG

Con el objeto de estudiar la influencia del tamaño y lamelaridad de la vesícula en el reparto a piel viable y difusión a receptor del ACV, se realizaron los siguientes ensayos de difusión a partir de suspensiones de liposomas tipo OLV y LUV con el principio activo encapsulado. La bicapa lipídica seleccionada para este estudio fue, al igual que en los estudios anteriores, la composición DPPC/DPPG/COL (60/40/10) (mol/mol/mol).

- Acumulación en piel viable: estudios de difusión *in vivo/ex vivo*

La realización de ensayos *in vivo* – *ex vivo* en el presente trabajo experimental tiene como fundamento la estimación de la concentración efectiva de principio activo ACV que se alcanza en el lugar de acción, la capa basal de la epidermis según la **Ec. 27**, y de este modo, según los niveles de eficacia establecidos por Higuchi y colaboradores (Lee P.H., *et al.*, 1993) en un modelo de piel de ratón sin pelo, predecir la eficacia antiviral de la suspensión liposómica caso de estudio (DPPC/DPPG/COL).

Cada ensayo de difusión se compone de dos fases: fase *in vivo* y fase *ex vivo*. En el siguiente esquema se representa de manera simplificada la metodología global del estudio:



1ª Fase (ensayo *in vivo*): se realizaron tres aplicaciones, de las formulaciones objeto de estudio, espaciadas en intervalos de tiempo previamente determinados (0, 8 y 24h) y en un área definida (1,96 cm²) de la piel dorsal de los ratones sin pelo. Previo a cada aplicación *in vivo*, lo animales se anestesiaron con Halotano por vía inhalatoria. La anestesia se prolongó durante 15 minutos desde el momento de la aplicación para facilitar la absorción de la muestra.

2ª Fase (fase *in ex vivo*): Finalizada la fase *in vivo* a las 32h, los animales se sacrificaron con CO₂ y la piel extraída se colocó en la celda de difusión y se procedió a la cuarta aplicación de la misma manera que en los ensayos de difusión *in vitro* (detallado previamente). Cabe destacar que en la fase *in vitro* las pieles presentan ACV absorbido durante la fase *in vivo*, por ello, durante el acondicionamiento de las pieles en la 2ª fase se recogió la solución receptora para la posterior cuantificación del ACV.

III.4.2.3.5. Estudios con piel humana

Una vez finalizados los ensayos de difusión a través de piel de ratón sin pelo, se realizó la última batería de ensayos de difusión de la memoria de tesis actual a través de piel humana, que presentaba la ventaja de evitar extrapolar datos desde un modelo animal. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando dosis finitas y condiciones no oclusivas. Basándonos en resultados obtenidos en ensayos anteriores, se seleccionaron en este estudio, suspensiones liposómicas y geles liposómicos (0,5% de Carbopol 9080) con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión, preparadas a partir de las bicapas lipídicas fluidas POPC y DOPC. Con el objetivo de conocer la profundidad a la que ha llegado el ACV en piel, una vez finalizado el ensayo de difusión se cortó la piel en láminas de 20 µm con un criotomo hasta 160 µm, espesor que nos asegura que englobamos el estrato córneo y la epidermis completa. Los resultados cuantificados de ACV acumulado en láminas de piel, se compararon con los obtenidos a partir de la formulación comercial de referencia en ensayos de difusión realizados utilizando piel humana.

Para cada día de ensayo se dispusieron en las celdas de difusión los fragmentos de piel abdominal obtenidos a partir de un mismo individuo. Debido a la baja disponibilidad que presenta este tipo de piel, estos estudios se diseñaron de tal modo que al menos cada formulación se probara en tres celdas de difusión.

III.4.2.4. Procesamiento y análisis de las muestras

La denominación de los distintos tipos de muestra a los que se hace referencia en los diferentes ensayos es la siguiente:

Remanentes en el compartimento donador: se refieren a los restos de formulación que quedan en el compartimento donador una vez finalizado el ensayo.

Membrana: cualquiera de las barreras, artificiales o naturales, colocadas entre el compartimento donador y receptor.

Muestras fluido receptor: atribuido al líquido receptor recogido en los viales del colector de fracciones durante la realización del ensayo en intervalos de tiempo determinados.

III.4.2.4. 1. Estudios de permeabilidad de bicapas

- Muestras remanentes en compartimento donador: se recogieron sobre la superficie de la membrana una vez finalizado el ensayo para su posterior análisis por espectrofluorimetría en los ensayos realizados con 5(6)CFNa o por HPLC en los ensayos realizados con ACV . En el caso de la 5(6)CFNa la muestras se recogieron en solución amortiguadora PBS pH 7,4 y se utilizó una solución de DOC 10% para la rotura de las vesículas previo a su análisis por espectrofluorimetría cuyo procedimiento está descrito en **III.3.2.4.2**. Para los ensayos realizados con ACV la muestras se recogieron en solución amortiguadora HEPES-salino (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6) y las vesículas se rompieron con metanol siguiendo el procedimiento descrito en **III.3.2.4.2** de cuantificación de ACV por HPLC.

- Muestras de fluido receptor: se analizaron por espectrofluorimetría en los ensayos realizados con 5(6)CFNa siguiendo el procedimiento descrito en **III.3.2.4.2**. En los ensayos con ACV estas muestras se analizaron por espectrofotometría de absorción UV/Vis. Para ello, se utilizó el espectrofotómetro Varian-Cary 300 a una longitud de onda de 254 nm. Se empleó un método analítico previamente desarrollado y validado para el ACV (Bravo, A., 2001). Como patrones se utilizaron soluciones de ACV en solución amortiguadora HEPES (pH = 7,4) de 1 a 15 µg mL⁻¹.

III.4.2.4.2. Difusión de geles a a través de membranas hidrófilas

- Muestras remanentes en compartimento donador: se recogieron sobre la superficie de la membrana con metanol una vez finalizado el ensayo para su posterior análisis siguiendo el procedimiento descrito en **III.3.2.4.2**. para cuantificación de ACV por HPLC.

- Muestras de fluido receptor: se analizaron por espectrofotometría de absorción UV/Vis cuantificándose el principio activo ACV siguiendo el método descrito previamente en el análisis de las muestras de fluido receptor obtenidas en los estudios de permeabilidad de bicapas.

III.4.2.4.3. Estudios de difusión a través de membranas lipófilas

- Muestras de piel: la extracción de ACV de la piel artificial, una vez cortada el área de permeación, se realizó en agua milli-Q a la Tª de 60°C . Las muestras resultantes se filtraban (nylon de 0,20 µm) para su posterior análisis siguiendo el procedimiento descrito en III.3.2.4.2. para cuantificación de ACV por HPLC.

III.4.2.4.4. Estudios *in vitro* con piel de ratón sin pelo

- Muestras de piel: Una vez desmontadas las celdas, se estiraba la piel sobre una tabla de disección, se secaban los fragmentos de piel y se realizaban dos “strippings” con una cinta adhesiva Scotch Maggic™ de 19 mm de ancho para eliminar posibles restos de lavado. En aquellos ensayos donde se cuantificó sólo el ACV en piel viable se realizaron “10 strippings” adicionales para asegurarnos que retiramos el estrato córneo completamente.

Extracción de ACV en piel: Tras realizar los “stripping”, se procedió al cortado del área permeada (círculo central) con un sacabocados de diámetro 1,3 cm (**Fig. 33**). El procesamiento de la membrana se realizó basándose en el método descrito por diversos autores (Parry, G.E., *et al.*, 1992). Brevemente, los discos de piel correspondientes se digerían y se extraía el ACV con solución de NaOH 0,5N a 50°C . En las muestras resultantes se realizaba una precipitación de proteínas con HClO₄ 5N mediante centrifugación y filtrado final (filtros nylon 0,2 µm) previo a su análisis por HPLC.

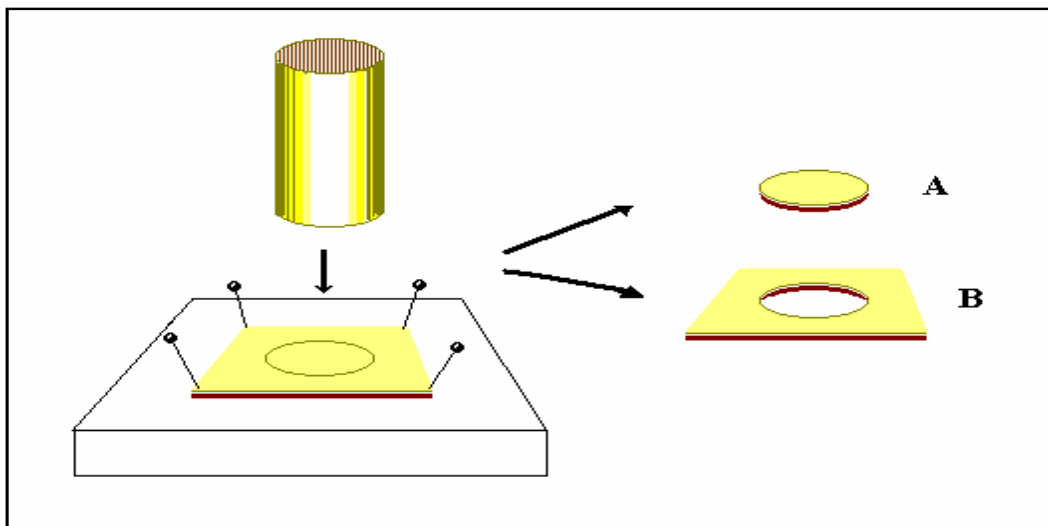


Fig. 33. Detalle de la obtención por cortado del disco de piel (A) correspondiente al área de difusión.

El método de análisis y cuantificación de ACV mediante separación cromatográfica por HPLC se basó en el desarrollado por varios autores (Volpato, N.M., *et al.*, 1997), al que se introdujeron ciertas mejoras para mejorar su resolución. Brevemente, se utilizó un Cromatógrafo Alliance WatersTM 2690 Separations Module equipado con una Columna Discovery[®] Amide C16 de 250 × 4,6 mm y 5 μm de diámetro de partículas (SUPELCO), una Guardacolumna SupelguardTM Discovery[®] Amide C16 de 20 × 4.0 mm y 5 μm de diámetro de partículas (SUPELCO), y un Detector Fotodiodo Array (PDA) Waters 996. Las condiciones instrumentales establecidas fueron: agua destilada como fase móvil a un flujo isocrático de 1,5 mL /min, una longitud de onda de análisis de 254nm realizando un barrido entre 200 y 300 nm, un volumen de inyección de muestra de 50 μL y una temperatura del sistema de 27 °C. Como patrones se utilizan soluciones de ACV en HClO₄ de 0,5 a 0,05 μg mL⁻¹. Cada muestra se inyectó por duplicado registrándose el cromatograma y tomando el área como el parámetro de cuantificación. El pico correspondiente al ACV eluyó aproximadamente a los 10 minutos.

- Muestras de fluido receptor : tras su evaporación hasta sequedad con un concentrador a vacío a 70°C (Speedvac[®]), las muestras se reconstituían en solución de HClO₄ 0,5N que precipitaba las proteínas, y posteriormente se filtraban (filtros de nylon 0,2μm) para su posterior análisis por HPLC siguiendo el método descrito previamente en el análisis de las muestras obtenidas de piel de ratón sin pelo.

III.4.2.4.5. Estudios con piel humana

- Muestras de piel: tras desmontar las celdas, se estiraba la piel sobre una tabla de disección, y se procedía al cortado del área permeación (círculo central) con un sacabocados de diámetro 1,3 cm (**Fig. 33**). El disco de piel resultante se incluía en un medio de inclusión de tejidos Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura Finetek Europe B.V. The Netherlands), y se congelaba inmediatamente con nitrógeno líquido conservándose a -20°C. Posteriormente, se realizaban cortes histológicos sobre el disco de la piel, utilizando un criotomo, (Slee Mainz MC) con el que se obtenían láminas de 20 µm de grosor hasta una profundidad de 160 µm. Extracción de ACV en piel: En los cortes histológicos se realizó una extracción individual con agua a 60°C (Volpato, N.M., *et al.*, 1997) y posterior precipitación de proteínas con HClO₄ 1N. Las muestras resultantes se centrifugaban y filtraban (nylon de 0,20 µm) para su posterior análisis por HPLC siguiendo el método descrito previamente en el análisis de las muestras obtenidas de piel de ratón sin pelo.

En este apartado se encuentran detalladas las condiciones de preparación de las formulaciones empleadas en los diferentes estudios llevados a cabo en la memoria de tesis actual.

III.4.3.

Condiciones de preparación de las formulaciones de estudio

III.4.3.1. Estudios de permeabilidad de bicapas

Durante los estudios de permeabilidad de bicapas lipídicas a partir de ensayos de difusión a través de una membrana hidrófila se emplearon como formulaciones en estudio soluciones de principio activo y suspensiones de liposomas con el principio activo encapsulado. Como principios activos se utilizaron la sonda fluorescente 5(6)CFNa y el ACV.

III.4.3.1.1. Estudios preliminares con carboxifluoresceína

- Selección de la membrana hidrófila

Suspensión de liposomas vacíos: preparadas según se detalla en apartados **III.3.2.1.1** y **III.3.2.1.2** a partir de las siguientes condiciones de preparación:

- Composición bicapa lipídica: DOPC
- Concentración teórica de lípido MLV: 0,040 M
- Solución de hidratación: solución amortiguadora fosfato salina PBS (290 mOsmKg⁻¹ pH 7,4)
- Extrusión cíclica en cascada a través filtros de 0,8 µm y 0,2 µm para obtener liposomas LUV

Solución de 5(6) CFNa: 5(6)CF en solución amortiguadora fosfato salina PBS (290mOsmKg⁻¹ pH 7,4) a una concentración de 6 µg/mL.

- Evaluación permeabilidad bicapas lipídicas

Suspensiones liposómicas con 5(6)CFNa encapsulada: preparadas según se detalla en apartado **III.3.2.1** a partir de las siguientes condiciones de preparación:

- Composición bicapa lipídica: DOPC, POPC
- Concentración lipídica: 0,040 M
- Solución de hidratación: 5(6)CF 0,050M en agua milliQ (titulada con NaOH 2N para formar la sal CFNa hasta alcanzar pH 7,4)
- Encapsulación pasiva
- Extrusión cíclica en cascada través filtros de 0,8 µm y 0,2 µm para obtener liposomas LUV
- Separación de la molécula no encapsulada mediante centrifugación por minicolumnas

(gel sephadex G-50F). Se utilizó como eluyente una solución amortiguadora fosfato salina PBS (290 mOsmKg⁻¹, pH 7,4)

III.4.3.1.2. Ensayos con ACV encapsulado

Suspensiones liposómicas con ACV encapsulado: preparadas según se detalla en apartado **III.3.2.1** a partir de las siguientes condiciones de preparación:

- Composición bicapa lipídica: DOPC, POPC, H-SPC/COL (60/40)(mol/mol)
- Concentración lípido MLV: 0,060 M
- Solución de hidratación: solución amortiguadora HEPES-salino (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6)
- Extrusión cíclica en cascada a través filtros de 0,8 μm y 0,2 μm para obtener liposomas LUV
- Encapsulación activa por gradiente de concentración. Se utilizó una T^a de 30°C y una concentración de principio activo en el medio de dispersión de los liposomas de 1,5 mg/mL
- Separación de la molécula no encapsulada mediante centrifugación por minicolumnas (gel sephadex G-25F). Se utilizó como eluyente una solución amortiguadora HEPES-salino (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6)

ACV en solución: ACV en solución amortiguadora HEPES-salino (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6) preparada a T^a 25°C a una concentración de 1,7 mg/mL.

III.4.3.2. Difusión de geles a través de membranas hidrófila

En estos estudios de difusión de geles a través de una membrana hidrófila se utilizaron como formulaciones de estudio, Geles de ACV no liposómicos, Geles liposómicos con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión y, solución de ACV.

III.4.3.2.1. Influencia de la viscosidad del gel

Geles de ACV (no liposómicos): se utilizó, al igual que para la preparación de geles liposómicos (**III.3.2.3**), equipo compuesto de reactor y agitador de varilla. El proceso se realizó a temperatura controlada (30°C) con la ayuda de un termostato Siempre bajo

condiciones de agitación, una vez mezclado el conservante (Kathon® CG al 0,05 %) y la solución amortiguadora HEPES (20 mOsm Kg⁻¹, pH 5, 2) se añadió el ACV sólido en una concentración de 2 mg/mL. Tras disolverse la molécula se añadió poco a poco cantidades de Carbopol® en tres proporciones de agente gelificante, 0,5%, 1%, y 1,5 % p:p con respecto a la formulación total. Posteriormente, se incorporó el agente neutralizante trietanolamina llevando el pH hasta 6-7 formándose el gel viscoso.

ACV en solución: ACV en solución amortiguadora HEPES (20 mOsm Kg⁻¹, pH 6) preparada a T^a 32°C a una concentración de 2,0 mg/mL.

III.4.3.2.2. Difusión de geles liposómicos con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión

Geles liposómicos con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión: preparados según método descrito en apartado **III.3.2.3** Con el fin de disminuir la fluidez de las bicapas lipídicas durante todo el proceso de formación del gel liposómico y ralentizar de este modo, la salida del ACV encapsulado, la elaboración del gel se realizó en una cámara de refrigeración a la temperatura de 4°C. Previo a la formación de gel, se prepararon las vesículas según se detalla en apartado **III.3.2.1** a partir de las siguientes condiciones de preparación:

- Composición bicapa lipídica: DOPC, POPC
- Concentración lípido MLV: 0,060 M
- Solución de hidratación: solución amortiguadora HEPES (20 mOsm Kg⁻¹, pH 5,2)
- Extrusión cíclica en cascada a través filtros de 0,8 µm y 0,2 µm para obtener liposomas LUV
- Encapsulación activa por gradiente de concentración: Se utilizó una T^a de 70°C y una concentración de principio activo en el medio de dispersión de los liposomas de 18 mg/mL. Una vez completada la encapsulación del principio activo, se retiró el ACV precipitado en el medio de dispersión de los liposomas a la temperatura de 4°C. Dicha separación se realizó mediante un sistema de filtración a vacío Millipore a través de una placa filtrante en una cámara refrigerada a 4°C

II.4.3.3. Estudios de difusión a través de membranas lipófilas

En la realización de los ensayos de difusión *in vitro* a través de una membrana lipófila, se utilizaron suspensiones de liposomas con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión, una solución de ACV y la formulación comercial.

Suspensiones liposómicas con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión:
preparadas según se detalla en apartado **III.3.2.1** a partir de las siguientes condiciones de preparación:

- Composición bicapa lipídica: POPC
- Concentración lípido MLV: 0,060 M
- Solución de hidratación: solución amortiguadora HEPES-salino (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6)
- Extrusión cíclica en cascada a través filtros de 0,8 µm y 0,2 µm para obtener liposomas LUV
- Encapsulación activa por gradiente de concentración. Se utilizó una T^a de 70°C y una concentración de principio activo en el medio de dispersión de los liposomas de 18 mg/mL . Una vez completada la encapsulación del principio activo, se centrifugaron las vesículas (1000 rpm, 2min) a la temperatura de 4°C y se retiró el principio activo precipitado en forma de cristales en el medio de dispersión a dicha temperatura

ACV en solución: ACV en solución amortiguadora HEPES-salino (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6) preparada a T^a 25°C a una concentración de 1,7 mg/mL.

Formulación comercial: (ver apartado **III.1.3**)

III.4.3.4. Estudios de difusión a través de piel de ratón sin pelo

Durante los estudios de difusión realizados a través de piel de ratón sin pelo, se emplearon como formulaciones en estudio suspensiones de liposomas vacíos con ACV libre en el medio de dispersión, suspensiones de liposomas con ACV encapsulado, soluciones de principio activo, y formulaciones de ACV crema.

III.4.3.4.1. Estudios con ACV libre en el medio de dispersión

Suspensiones de liposomas vacíos con ACV libre en el medio de dispersión: preparadas según se detalla en apartado **III.3.2.2** a partir de las siguientes condiciones de preparación:

- Composición bicapa lipídica: DOPC, POPC, DPPC/COL, DPPC/COL/SA, DPPC/COL/DPPG
- Concentración lípido MLV: 0,060 M, y 0,066 M en caso de bicapas con carga.
- Solución de hidratación: solución amortiguadora HEPES (22 mOsm Kg⁻¹, pH 6)
- Extrusión cíclica a través filtros de 0,8 µm para obtener liposomas OLV y extrusión cíclica en cascada a través de filtros de 0,8 y 0,2 µm para obtener liposomas LUV
- Adición de ACV al medio dispersión de la suspensión hasta una concentración de 1 mg/mL

ACV en crema: Formulación comercial (ver apartado **III.1.3**) diluida en solución amortiguadora HEPES (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6) hasta una concentración de 1 mg/mL.

ACV en solución: ACV en solución amortiguadora HEPES (22 mOsm Kg⁻¹, pH 6) a una concentración de 1 mg/mL.

III.4.3.4.2. Estudios con ACV encapsulado

Suspensiones de liposomas con ACVNa encapsulado: preparadas según se detalla en apartado **III.3.2.1** a partir de las siguientes condiciones de preparación:

- Composición bicapa lipídica: DOPC, DOPC/DPPG, POPC, POPC/DPPG, DPPC/COL, DPPC/COL/SA, DPPC/COL/DPPG
- Concentración lípido MLV: 0,060 M, y 0,066 M en caso de bicapas con carga.
- Solución de hidratación: ACVNa (50 mg/mL) en agua MilliQ® (325 mOsmol/kg, pH 11,5)
- Encapsulación pasiva
- Extrusión cíclica a través filtros de 0,8 µm para obtener liposomas OLV y extrusión cíclica en cascada a través de filtros de 0,8 y 0,2 µm para obtener liposomas LUV
- Separación de la molécula no encapsulada mediante diafiltración. Una vez eliminado el principio activo no encapsulado, se incorporó como medio de dispersión final de la suspensión una solución amortiguadora HEPES-salino (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6,0)

- Dilución de suspensión de liposomas en solución amortiguadora HEPES-salino (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6,0) hasta concentración en estudio

ACV en crema: Formulación comercial (ver apartado **III.1.3**) diluida en solución amortiguadora HEPES (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6) hasta una concentración de ACV 1 mg/mL.

Solución de ACVNa: ACVNa en solución amortiguadora HEPES (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6) a una concentración de 1 mg/mL.

III.4.3.4.3. Acumulación en piel viable con formulaciones seleccionadas

Suspensiones de liposomas con ACVNa encapsulado: preparadas según se detalla en apartado **III.3.2.1** a partir de las siguientes condiciones de preparación:

- Composición bicapa lipídica: POPC, DPPC/COL/DPPG
- Concentración lípido MLV: 0,060 M, y 0,066 M en caso de bicapas con carga.
- Solución de hidratación: ACVNa (50 mg/mL) en agua MilliQ® (325 mOsmol/kg, pH 11,5)
- Encapsulación pasiva
- Extrusión cíclica en cascada a través filtros de 0,8 µm y 0,2 µm para obtener liposomas LUV
- Separación de la molécula no encapsulada mediante diafiltración. Una vez eliminado el principio activo no encapsulado, se incorporó como medio de dispersión final de la suspensión una solución amortiguadora HEPES-salino (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6,0)
- Dilución de suspensión de liposomas en solución amortiguadora HEPES-salino (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6,0) hasta una concentración de ACVNa de 1 mg/mL

Suspensiones de liposomas vacíos con ACV libre en el medio de dispersión: preparadas según se detalla en apartado **III.3.2.2** a partir de las siguientes condiciones de preparación:

- Composición bicapa lipídica: POPC
- Concentración lípido MLV: 0,060 M
- Solución de hidratación: solución amortiguadora HEPES (22 mOsm Kg⁻¹, pH 6).
- Extrusión cíclica en cascada a través filtros de 0,8 µm y 0,2 µm para obtener liposomas LUV
- Adición de ACV al medio dispersión de la suspensión hasta una concentración de 1

mg/mL
<u>ACV en crema</u> : Formulación comercial (ver apartado III.1.3) diluida en solución amortiguadora HEPES (300 mOsm Kg ⁻¹ , pH 6) hasta una concentración de ACV 1 mg/mL

III.4.3.4.4. Acumulación en piel viable: Influencia de la concentración de principio activo en el compartimento donador con DPPC/COL/DPPG

<p><u>Suspensiones de liposomas con ACVNa encapsulado</u>: preparadas según se detalla en apartado III.3.2.1 a partir de las siguientes condiciones de preparación:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Composición bicapa lipídica: DPPC/COL/DPPG - Concentración lípido MLV: 0,066 M - Solución de hidratación: ACVNa (50 mg/mL) en agua MilliQ® (325 mOsmol/kg, pH 11,5) y ACVNa (100 mg/mL) en agua MilliQ® (600 mOsmol/kg, pH 11,5). - Encapsulación pasiva - Extrusión cíclica en cascada a través de filtros de 0,8 y 0,2 µm para obtener liposomas LUV - Separación de la molécula no encapsulada mediante diafiltración. Una vez eliminado el principio activo no encapsulado, se incorporó como medio de dispersión final de la suspensión una solución amortiguadora HEPES-salino (300 mOsm Kg⁻¹ ó 600 mOsm Kg⁻¹, pH 6,0) - Según la preparación dilución de suspensión de liposomas en solución amortiguadora HEPES-salino (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6,0) hasta una concentración de ACVNa de 5 mg/mL, o concentración de suspensión de liposomas mediante el diafiltrador hasta una concentración de ACVNa de 30 mg/mL
<p><u>ACV en crema</u>: según preparación, formulación comercial (ver apartado III.1.3) diluida en solución amortiguadora HEPES (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6) hasta concentración de ACV 5 mg/mL, o hasta concentración de 30 mg/mL.</p>

III.4.3.4.5. Acumulación en piel viable: Influencia del tamaño y lamellaridad de vesícula

Suspensiones de liposomas con ACVNa encapsulado
<u>Suspensiones de liposomas con ACVNa encapsulado</u> : preparadas según se detalla en

apartado **III.3.2.1** a partir de las siguientes condiciones de preparación:

- Composición bicapa lipídica: DPPC/COL/DPPG
- Concentración lípido MLV: 0.066 M
- Solución de hidratación: ACVNa (50 mg/mL) en agua MilliQ® (325 mOsmol/kg, pH 11,5).
- Encapsulación pasiva
- Extrusión cíclica a través filtros de 0,8 μm para obtener liposomas OLV y extrusión cíclica en cascada a través de filtros de 0,8 y 0,2 μm para obtener liposomas LUV
- Separación de la molécula no encapsulada mediante diafiltración. Una vez eliminado el principio activo no encapsulado, se incorporó como medio de dispersión final de la suspensión una solución amortiguadora HEPES-salino (300 mOsm Kg^{-1} , pH 6,0)
- Dilución de suspensión de liposomas en solución amortiguadora HEPES-salino (300 mOsm Kg^{-1} , pH 6,0) hasta una concentración de ACVNa de 5 mg/mL

ACV en crema: Formulación comercial (ver apartado **III.1.3**) diluida en solución amortiguadora HEPES (300 mOsm Kg^{-1} , pH 6) hasta concentración de ACV de 5 mg/mL.

III.4.3.4.6. Acumulación en piel viable: estudios de difusión *in vivo/ex vivo*

Suspensiones de liposomas con ACVNa encapsulado: preparadas según se detalla en apartado a **III.3.2.1** partir de las siguientes condiciones de preparación:

- Composición bicapa lipídica: DPPC/COL/DPPG
- Concentración lípido MLV: 0,066 M
- Solución de hidratación: ACVNa (100 mg/mL) en agua MilliQ® (600 mOsmol/kg, pH 11,5)
- Encapsulación pasiva
- Extrusión cíclica en cascada a través de filtros de 0,8 y 0,2 μm para obtener liposomas LUV
- Separación de la molécula no encapsulada mediante diafiltración. Una vez eliminado el principio activo no encapsulado, se incorporó como medio de dispersión final de la suspensión una solución amortiguadora HEPES-salino (600 mOsm Kg^{-1} , pH 6,0)
- Concentración de suspensión de liposomas hasta una concentración de ACVNa de 20 mg/mL mediante el diafiltrador

III.4.3.5. Estudios de difusión a través de piel humana

En la batería de ensayos de difusión *in vitro* a través de piel humana se utilizaron suspensiones y geles liposómicos con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión, y la formulación comercial.

Suspensiones de liposomas con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión:

Preparadas según se detalla en apartado **III.3.2.1** a partir de las siguientes condiciones de preparación:

- Composición bicapa lipídica: POPC y DOPC
- Concentración lípido MLV: 0,060 M
- Solución de hidratación: solución amortiguadora HEPES-salino (20 mOsm Kg⁻¹, pH 5,2)
- Extrusión cíclica en cascada a través de filtros de 0,8 y 0,2 µm para obtener liposomas LUV
- Encapsulación activa por gradiente de concentración. Se utilizó una T^a de 70°C y una concentración de principio activo en el medio de dispersión de los liposomas de 18 mg/mL. Una vez completada la encapsulación del principio activo, se centrifugaron las vesículas (1000 rpm, 2min) a la temperatura de 4°C y se retiró el principio activo precipitado en forma de cristales en el medio de dispersión a dicha temperatura

Geles liposómicos con ACV encapsulado y libre: se siguen las mismas pautas de preparación que las indicadas en el apartado (**III.4.3.2.2**) y se incorporan los liposomas con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión, preparados como se indica en el punto anterior en estos estudios de difusión a través de piel humana.

Formulación comercial: (ver apartado **III.1.3**)

III.5.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Generalmente se pueden distinguir dos fases en la realización de cualquier experimento. Una primera que consiste en la observación y análisis de los hechos que acontecen, y otra segunda, de interpretación y obtención de conclusiones. La población estadística es el conjunto de referencia sobre el cual van a recaer las observaciones. Las poblaciones podrán ser finitas o infinitas dependiendo del número de elementos que las forman. Cuando el estadístico o investigador toma información de todos y cada uno de los elementos de la población estadística se dice que está realizando un censo. Sin embargo, esto muchas veces no es posible. Este problema lleva al investigador a tomar la información de unos cuantos elementos de la población estadística, denominándose muestra al conjunto de elementos de los que se toma información y tamaño de la muestra al número de elementos que la componen. A veces es conveniente reducir la información obtenida a un solo valor o a un número pequeño de valores para facilitar la comparación entre distintas muestras o poblaciones. Estos valores, que de alguna manera centralizan la información, reciben el nombre de medidas de tendencia central (Quesada, V., *et al.*, 1982).

Promedio o media es una de las medidas de tendencia central más usual. Supongamos que de una población o de un universo se toma una muestra de n observaciones en la forma acostumbrada con el fin de determinar algunas de las características de esa población. La muestra de n determinaciones puede designarse por $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$. La media de la muestra, \bar{x} puede calcularse por:

$$\boxed{\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}} \qquad \text{(Ec. 34)}$$

donde i va de 1 a n . Esta media de muestra es una estimación de μ , la media real de la población. Las medidas de tendencia central reducen la información de una muestra a un solo valor, pero, en algunos casos, este estará más próximo a la realidad de las observaciones que otros. Las medidas de dispersión o concentración, como por ejemplo la desviación estándar y la varianza, nos van a cuantificar esa representatividad de los valores centrales (Quesada, V., *et al.*, 1982), (Randolph, L.K. *et al.*, 1987).

La desviación estándar es la medida de variación de uso más común. La desviación estándar de una población normalmente se designa por σ . La desviación estándar de la muestra por s , que es una estimación o cálculo aproximado de σ . La desviación estándar de

una muestra se calcula averiguando las diferencias de cada observación con respecto a la media y formando con ellas la siguiente fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 / n}{n-1}} \quad (\text{Ec. 35})$$

La expresión n-1 del denominador de la fórmula de desviación estándar representa los grados de libertad, y para la desviación estándar es el número de observaciones menos uno. La varianza es el cuadrado de la desviación estándar (Randolph, L.K. *et al*, 1987).

Hay muchos tipos de cuadros de variación en la naturaleza. La más común es la distribución normal en la cual casi todas las observaciones se acercan al promedio, y cuanto mayor es la distancia del promedio en cualquier dirección menos son las observaciones. Muchas fórmulas e interpretaciones estadísticas se basan en la suposición de una distribución de datos de curva de frecuencia normal. Otros tipos de curvas de distribución son las de Poisson, binomial, t de Student, Ji cuadrado, etcétera (Quesada, V., *et al.*, 1982), (Randolph, L.K. *et al*, 1987).

La Probabilidad (P) generalmente se usa en estadística para indicar las posibilidades de que un resultado dado aparezca por muestreo al azar de una población específica. Si se encuentra pocas veces (generalmente $P = 0,05$) se considera improbable que la muestra se haya tomado de esa población, y se dice que es significativamente diferente. Los límites de confianza se utilizan para indicar los límites alrededor de un promedio de muestras, \bar{x} , que abarcarían el promedio real de la población, μ . Los límites de confianza se obtienen usando el error estándar del promedio de muestras $s_{\bar{x}}$ ($s_{\bar{x}} = s/\sqrt{n}$), un valor t (t de student) que corresponde a los grados de libertad, n-1, y la probabilidad que se desea asociar a los límites de confianza. El estado de confianza puede escribirse como $\bar{x} - ts_{\bar{x}} < \mu < \bar{x} + ts_{\bar{x}}$ siendo el límite superior de confianza $\bar{x} + ts_{\bar{x}}$ y el límite inferior de confianza $\bar{x} - ts_{\bar{x}}$. Si t corresponde a $P = 0,05$, el promedio de población μ está entre estos límites de confianza el 95% de las veces (Randolph, L.K. *et al*, 1987).

En el estudio actual se ha aplicado el análisis de varianza ANOVA en la comparación de las muestras para la interpretación de análisis. El análisis de varianza es una técnica de análisis estadístico que se utiliza para corroborar si la significación de diferencias entre medias de dos o más grupos, son o no debidas al azar. La cifra estadística obtenida con el ANOVA es la razón F. Los test estadísticos a realizar se basan en comparar F contra un valor crítico de las tablas F_{α} (Función F tabulada por Snedecor). Se distingue entre análisis de varianza con un solo factor (ANOVA I) y análisis de varianza con dos factores de variación (ANOVA II) (Quesada, V., *et al.*, 1982), (Randolph, L.K. *et al.*, 1987).

Ajuste de modelos cinéticos a los datos experimentales

El ajuste de curvas surge cuando el investigador trata de interpretar los datos de un experimento. El objetivo de la modelización matemática es obtener ecuaciones que describan el comportamiento de los sistemas. Para ello tras predecir una ecuación que concuerde con el comportamiento cualitativo de los datos, se encuentran los valores de los parámetros que mejor ajustan la ecuación a los datos. Como definición de ajuste se utiliza normalmente el criterio de los mínimos cuadrados, que consiste en obtener aquellos valores de los parámetros que minimizan el sumatorio de los residuales al cuadrado, siendo los residuales las distancias verticales de los puntos a la curva de ajuste. Se denomina regresión al proceso general de ajustar una ecuación a unos datos, y cuando esto se hace mediante el criterio de los mínimos cuadrados se habla de regresión lineal y no lineal por mínimos cuadrados según que la ecuación a ajustar sea lineal o no lineal en los parámetros. En ambos casos el objetivo es el mismo, encontrar las mejores estimas de los parámetros y cuantificar la precisión de los mismos. En el caso de la regresión lineal la solución es única y el método es exacto, mientras que en la regresión no lineal la solución es aproximada y el método es iterativo (de búsqueda, de gradiente,...).

Para discernir acerca de la bondad de un ajuste se utilizan diferentes criterios en la regresión lineal. Unos se refieren a los residuales como son el valor del sumatorio de residuales al cuadrado (SSQ), varianza (s^2) y desviación estándar del ajuste (s), el coeficiente de correlación al cuadrado (R^2), la distribución gráfica de los residuales (al azar, con rachas,), el test estadístico de las rachas, etc. Y otros criterios se refieren a los parámetros como son las varianzas de los parámetros (dadas por la matriz de varianza-covarianza) y las correlaciones de los parámetros (matriz de correlación), los límites de

confianza, los coeficientes de variación, el test de redundancia de un parámetro etc. En la regresión no lineal la estadística asociada no es exacta y, por defecto, se acepta como aproximada la estadística de la regresión lineal. En este sentido se suele ser más flexible a la hora de interpretar los indicadores acerca de la bondad del ajuste. Así, por ejemplo, en regresión no lineal se suelen admitir coeficientes de variación de los parámetros de hasta un 50%. El criterio de mínimos cuadrados asume que el error al medir la variable dependiente es aditivo, que son independientes unos errores de otros y que en conjunto siguen una distribución de media cero y varianza constante. A este tipo de regresión se la denomina regresión sin pesos estadísticos. Cuando esta suposición no es cierta (la mayoría de las veces) se hace necesario dar más importancia (más peso) a los datos de menor error, frente a los de mayor error (más peso). Para ello, se corrigen los residuales con un factor llamado peso estadístico (W_i) que se define como el inverso de la varianza y que viene a ser un factor de normalización de residuales muy dispares. Cabe destacar que la mejor confirmación de que el ajuste no es bueno es representar los puntos experimentales junto a la función ajustada (Burguillo, F.J., 2004).

El ajuste de curvas realizado en el trabajo actual se llevó a cabo por regresión no lineal mediante ajustes estadísticos por mínimos cuadrados ponderados (considerando sus pesos) utilizando un programa estadístico adecuado (SIMFIT). A continuación se muestra un ejemplo obtenido al ajustar los valores de flujo experimental a una función biexponencial. Realizado el ajuste el programa presenta en pantalla los siguientes datos en relación a los parámetros y el análisis de residuales.

Parameter	Value	Std. error	.. 95% Con. Lim. ..	p
A(1)	1.124E+01	4.17E-01	1.02E+01 1.23E+01	0.000
A(2)	-1.124E+01	(fixed)		
k(1)	8.416E-02	1.43E-02	4.91E-02 1.19E-01	0.001
k(2)	1.287E+00	1.44E-01	9.35E-01 1.64E+00	0.000
C	-3.232E+00	5.37E-01	-4.55E+00 -1.92E+00	0.001

```

Analysis of residuals:  WSSQ = 1.704E+00
P(chi-sq. >= WSSQ)    = 0.945
R-squared, cc(theory,data)^2 = 0.956
Largest Abs.rel.res.   = 20.55 %
Smallest Abs.rel.res.  = 0.74 %
Average Abs.rel.res.   = 4.93 %
Abs.rel.res. in range 10-20 % = 10.00 %
Abs.rel.res. in range 20-40 % = 10.00 %
Abs.rel.res. in range 40-80 % = 0.00 %
Abs.rel.res. > 80 %   = 0.00 %
No. res. < 0 (m)      = 5
No. res. > 0 (n)      = 5
    
```

```

No. runs observed (r)           = 6
P(runs =< r : given m and n)    = 0.643
5% lower tail point            = 3
1% lower tail point            = 2
P(runs =< r : given m plus n)   = 0.746
P(signs =< least no. observed)  = 1.000
Durbin-watson test statistic    = 1.320 <1.5, +ve serial
correlation?
Verdict on goodness of fit     fantastic

```

En relación al análisis de los parámetros, se indica el valor de cada parámetro, el error estándar asociado a ese parámetro, los límites de confianza al 95% para dicho parámetro y el valor de “p” de redundancia de cada parámetro. Este último valor nos da la probabilidad de que el parámetro sea redundante, es decir que sea tan próximo a cero que no esté justificada su inclusión en la ecuación. Cuando $p < 0,05$ se considera que el parámetro es significativamente distinto de cero. En este caso ninguno de los parámetros es redundante. (Burguillo, F.J., 2004), (Bardsley, W.G., <http://www.simfit.man.ac.uk>), (Randolph, L.K., *et al.*, 1987).

Referente al análisis de los residuales, el WSSQ es la llamada suma de residuales al cuadrado con pesos estadísticos (weighted sum of squares) y viene determinado por:

$$WSSQ = w_i (y_i - f(x_i, \underline{\theta}))^2 \quad (\text{Ec. 36})$$

siendo W_i el peso estadístico calculado como el inverso de la varianza de la medida. Estos valores de varianza se suelen obtener a partir de réplicas de cada dato experimental. El método general de los mínimos cuadrados para estimar θ , consiste en calcular el valor de θ que minimize la suma de los cuadrados de los residuales.

A menudo los resultados obtenidos por muestreo no coinciden exactamente con los esperados teóricamente de acuerdo a las leyes de probabilidad. Supongamos que al tomar una muestra los sucesos posibles E_1, E_2, \dots, E_k se presentan con frecuencias o_1, o_2, \dots, o_k llamadas frecuencias observadas y que según las leyes de probabilidad se espera que aparezcan con frecuencias e_1, e_2, \dots, e_k llamadas frecuencias teóricas o esperadas. Una medida de la discrepancia entre las frecuencias esperadas y observadas viene proporcionada por el estadístico χ^2 definido por:

$$\chi^2 = \sum_i \left(\frac{o_i - e_i}{e_i} \right)^2 \quad (\text{Ec. 37})$$

Si $\chi^2 = 0$, las frecuencias observadas y teóricas coinciden completamente, mientras que si $\chi^2 > 0$, no coinciden exactamente. Cuanto mayor sea la diferencia entre lo esperado y lo observado, mayor es el valor de χ^2 . A través de la prueba del test ji cuadrado con v grados de libertad se trata de determinar si la hipótesis sobre qué tipo de distribución teórica rige el experimento es consistente con los datos obtenidos. En el ajuste mostrado las “p” del test ji-cuadrado para WSSQ vale 0,945 ($p > 0,05$) lo que indica un buen ajuste. (Burguillo, F.J., 2004), (Bardsley, W.G., <http://www.simfit.man.ac.uk>), (Randolph, L.K., *et al.*, 1987).

El valor de R^2 es el cuadrado del coeficiente de correlación entre los datos y el mejor ajuste de los puntos. Este parámetro debe ser interpretado con prudencia en modelos no lineales. También se obtiene el número de residuales positivos y negativos, el número de rachas y la p del test de rachas. La prueba de las rachas es una prueba de independencia que se utiliza para contrastar la hipótesis nula de que la secuencia de apariciones de uno a otro valor en el orden observado es aleatoria, o equivalentemente que las observaciones son independientes entre si. En este caso la p del test de rachas vale 0,643 ($p > 0,05$) lo que indica un buen ajuste (Burguillo, F.J., 2004), (Bardsley, W.G., <http://www.simfit.man.ac.uk>).

El test durbin watson es útil para detectar si existe una correlación serial de residuales, lo cual podría indicar datos correlacionados o modelo inapropiado. El valor esperado es de 2,0, sugiriendo valores menores a este dato una correlación positiva, mientras que valores más grandes de 2,5 sugieren una correlación serial. (Burguillo, F.J., 2004), (Bardsley, W.G., <http://www.simfit.man.ac.uk>).

IV.

PARTE EXPERIMENTAL:
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1.

CUADRO DE TRABAJO

ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FORMULACIONES LIPOSÓMICAS						
Fosfolípido	Fórmula molecular	Tc	Otros componentes	Fórmula molecular	Efecto en la bicapa	CARACTERIZACIÓN
DOPC	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	-19 °C	DPPG-Na	C ₃₈ H ₇₄ NO ₁₀ NaP	Carga (-)	▪ Tamaño promedio e IP
POPC	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	-4 °C	SA	C ₁₈ H ₃₆ N	Carga (+)	▪ Potencial ζ (mv)
DPPC	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	41,5 °C	CHOL	C ₂₇ H ₄₆ O	Fluidificación	▪ Lípido total
H-SPC	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	54,5 °C				▪ Eficiencia de encapsulación
ESTUDIOS DE DIFUSIÓN IN VITRO, IN VITRO /EX VIVO						
Descripción de los ensayos			Formulaciones		Objeto del estudio	
Estudios de permeabilidad de bicapas (con membranas hidrófilas)			- ACV en solución - LUV: DOPC, POPC, H-SPC-COL		- Permeabilidad de principio activo encapsulado: perfiles de cesión, K ₁ , K _p .	
- Estudios con CFNa - Ensayos con ACV						
Estudios de difusión de ACV en geles a través de membranas hidrófilas			- ACV en solución - Geles 0,5% , 1%, 1,5% agente gelificante - Gel LUV POPC, Gel LUV DOPC		- Permeabilidad de principio activo en gel liposómico: perfiles de cesión, K _p , constante de difusión.	
- Influencia de la viscosidad del gel(geles no liposómicos)						
- Difusión de geles liposómicos ACV encapsulado y libre						
Estudios de difusión a través de membranas lipófilas			ACV en solución, POPC, Comercial		- Datos iniciales de ACV acumulado en piel	
Difusión a través de piel de ratón sin pelo			- OLV y LUV: DOPC, DOPC/DPPG, POPC, POPC/DPPG, DPPC/COL, DPPC/COL/SA, DPPC/COL/DPPG		- Capacidad promotora del liposoma.	
- Estudios con ACV libre			- ACV en crema, - ACV en solución		- Influencia de características físico-químicas de las vesículas, y encapsulación de la molécula, en el reparto de principio activo a piel.	
- Estudios con ACV encapsulado			- LUV: POPC, DPPC/COL/DPPG - ACV en crema		- Influencia de la encapsulación de la molécula, en el reparto de principio activo a piel viable y difusión a receptor.	
Acumulación en piel viable			- OLV y LUV: DPPC:COL:DPPG		- Influencia de la concentración de principio activo, y tamaño y lamelalidad de la vesícula, en el reparto de principio activo a piel viable y difusión a receptor.	
Acumulación en piel viable						
Acumulación en piel viable: estudios de difusión in vivo/ex vivo			- LUV: DPPC/COL/DPPG - ACV en crema		- Estimación de la concentración efectiva de principio activo en capa basal de epidermis	
Estudios de difusión a través de piel humana			- LUV: POPC, DOPC - Gel LUV POPC, Gel LUV DOPC - Comercial		- Determinación de ACV en capas de piel, (estrato córneo y epidermis).	

IV.2.

ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD DE **BICAPAS**

IV.2.1.

Estudios con Carboxi-fluoresceina

IV.2.1.1. SELECCIÓN DE LA MEMBRANA HIDRÓFILA

En el desarrollo de una formulación liposómica de ACV en la memoria de tesis actual, la determinación de la permeabilidad que presentan diferentes bicapas lipídicas frente al ACV encapsulado en liposomas, se llevó a cabo utilizando celdas de difusión de flujo continuo a través de membranas de difusión hidrófilas. Como paso previo a estos estudios, se realizaron una serie de ensayos de difusión con el objetivo de seleccionar la membrana hidrófila apropiada. Dicha membrana debía presentar una baja resistencia a la difusión del principio activo y un elevado coeficiente de permeabilidad así como, una total impermeabilidad al paso de liposomas. Se realizaron ensayos de difusión a partir de una solución de 5(6) carboxifluoresceína sódica (5(6) CFNa), molécula hidrofílica de bajo peso molecular utilizada como marcador hidrofílico en este estudio, a través de dos membranas hidrófilas: colodión y acetato de celulosa. Los datos resultantes del perfil de cesión de de la 5(6)CFNa a través de las membranas hidrófilas y del coeficiente de permeabilidad permitieron seleccionar la membrana adecuada. Al no disponer del dato del corte molecular de la membrana de acetato de celulosa se realizó un ensayo de difusión de liposomas vacíos a través de la misma para estudiar la impermeabilidad al paso de los liposomas en dicha membrana.

Descripción de ensayos

- Difusión de 5(6)CFNa en solución a través de una membrana de colodión.
- Difusión de 5(6)CFNa en solución a través de una membrana de acetato de celulosa.
- Difusión de liposomas vacíos LUV-DOPC formulados como suspensión a través de una membrana de acetato de celulosa.

DIFUSIÓN 5(6)CFNa EN SOLUCIÓN A TRAVÉS DE UNA MEMBRANA DE COLODIÓN

Variables experimentales

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de colodión
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: solución 5(6)CFNa en solución amortiguadora fosfato salina PBS (290 mOsmKg⁻¹ pH 7,4)
- Concentración de partida del principio activo (C₀): 6 µg/mL
- Cantidad muestra aplicada en el compartimento donador (Q_m): 0,5ml
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q₀): 3µg
- Temperatura en el compartimento donador y superficie de la membrana: 37°C
- Solución receptora: solución amortiguadora fosfato salina PBS (290 mOsmKg⁻¹ pH 7,4)
- Flujo del líquido receptor (F_{rec}): 5,6 mL/h
- Duración del ensayo: 6h
- Tiempo recogida receptores (t): cada media hora (hasta 2 h) y cada hora (de 2h a 6h)
- Número de celdas por ensayo (n):7
- N° de ensayos por formulación: 1 (Total: n= 7 celdas)

En estudios de difusión previos (no publicados), realizados en celdas de difusión de flujo continuo a través de membranas de acetato de celulosa, se estudió la influencia del F_{rec} empleado (1,1 mL/h, 5,5 mL/h y 10, 8mL/h), a partir de una solución de ketoprofeno (Co de 2 mg/mL), en los valores obtenidos de flujo (J) y de coeficiente de permeabilidad (Kp) del principio activo a través de la membrana. Los resultados para los tres valores de F_{rec} ensayados fueron similares. Dicha discusión, extendida también a la membrana de colodión, permitió escoger un F_{rec} determinado (5,6 mL/h) que se ajustara a las características del experimento en un intervalo comprendido entre los valores de F_{rec} estudiados.

Los resultados obtenidos de la concentración y cantidad acumulada de la 5(6)CFNa difundida a través de la membrana de colodión a compartimento receptor en cada tiempo de muestreo se recogen en la **Tabla 2**.

t (h)	C _{rec} (µg/mL)	Q _{rec} (µg)	dC _{rec} /dt (µg/mL h)
0	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,067± 0,006
0,5	0,029 ± 0,002	0,080 ± 0,007	0,049± 0,006
1	0,049 ± 0,005	0,217± 0,018	0,019 ± 0,007
1,5	0,048 ± 0,005	0,351 ± 0,031	-0,002± 0,004
2	0,047 ± 0,002	0,481 ± 0,034	-0,003± 0,004
3	0,043 ± 0,003	0,721 ± 0,052	-0,005± 0,002
4	0,037 ± 0,000	0,930 ± 0,052	-0,003± 0,002
5	0,037 ± 0,000	1,139 ± 0,052	-0,002± 0,003
6	0,034 ± 0,002	1,328 ± 0,064	-0,005± 0,007

Tabla 2. Valores resultantes en el ensayo realizado a cada tiempo de muestreo. El término dC_{rec}/dt se refiere a la acumulación del principio activo en la celda del receptor. Valores medios \pm desv. est.

Los datos resultantes de flujo aparente (J_{ap}) se calcularon mediante la **Ec.13**, y se realizó un ajuste matemático no lineal de un modelo biexponencial (Ec. 31) al perfil experimental obtenido de flujo aparente (J_{ap}) frente al tiempo. Los parámetros calculados al estimar el mejor ajuste no lineal se indican en la **Tabla 3**. Se obtuvo un perfil de flujo adecuado según el empleo de dosis finitas, tal y como puede observarse en la **Fig. 34**.

Parámetro	Valor	Error estandar
B (µg)	0,4094	0,0568
V ₁ (h ⁻¹)	0,0965	0,0124
V ₂ (h ⁻¹)	2,5050	1,0230

Tabla 3. Parámetros estimados en el ajuste matemático no lineal realizado en el cálculo del flujo aparente.

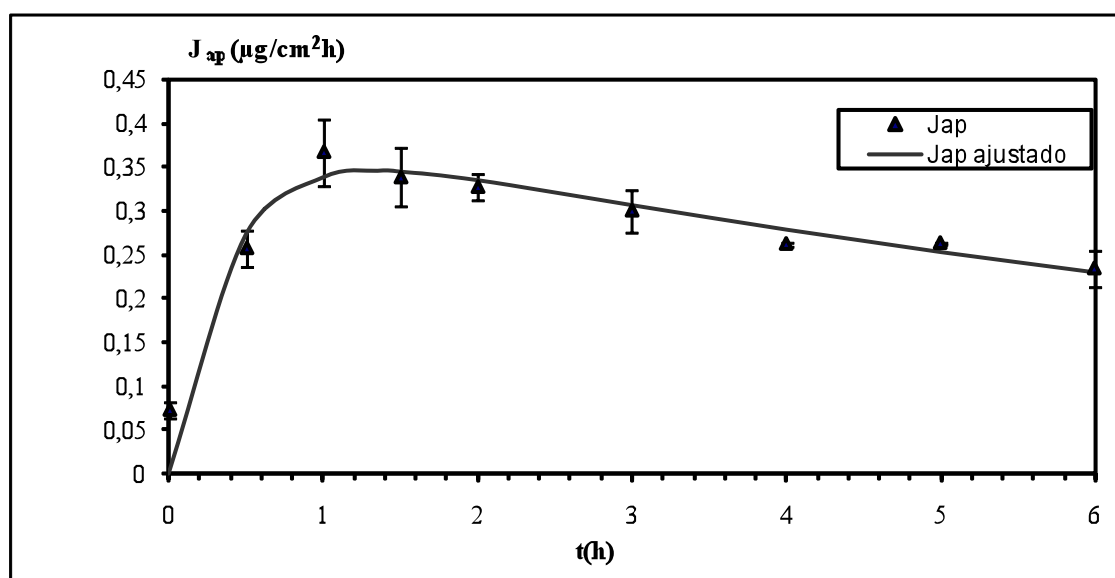


Fig. 34. Evolución del flujo aparente frente al tiempo de la 5(6)CFNa a través de una membrana de acetato de colodión obtenido a partir de una solución del principio activo.

Al tener en este ensayo un sistema de cesión en dosis finitas, se observa que los valores de flujo aumentan rápidamente en los primeros momentos hasta alcanzar un máximo de velocidad a través de la membrana (J_{\max}), tras lo cual, comienzan a descender de nuevo como se detalla en la representación de la **Fig. 34**. Por otra parte, se puede observar en la **Tabla 2**, como el término (dC_{rec}/dt), una vez que el valor de flujo comienza a descender, toma un valor negativo. Dicho comportamiento indica que es durante los primeros tiempos del experimento donde se considera, principalmente, que la acumulación del principio activo en la cámara receptora no es despreciable, al igual que comprobaron otros autores (Harrison, D.J., *et al.*, 1995).

Una vez estimada la ecuación de J_{ap} ajustado se determinó el tiempo necesario para alcanzar el flujo máximo ($t_{j_{\max}}$), y el valor del flujo máximo (J_{\max}), a partir del cual se calculó el coeficiente de permeabilidad (K_p) (**Ec. 32**). Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 4**.

$t_{j_{\max}}$ (h)	J_{\max} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	K_p (cm/h)
1,352	0,3455	$5,76 \cdot 10^{-2}$

Tabla 4. Parámetros calculados en la determinación del coeficiente de permeabilidad.

DIFUSIÓN DE 5(6)CFNa EN SOLUCIÓN A TRAVÉS DE UNA MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSA

Variables experimentales

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de acetato de celulosa
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: solución 5(6)CFNa en solución amortiguadora fosfato salina PBS (290 mOsmKg⁻¹ pH 7,4)
- Concentración de partida del principio activo (C₀): 6 µg/mL
- Cantidad muestra aplicada en el compartimento donador (Q_m): 0,5ml
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q₀): 3µg
- Temperatura en el compartimento donador y superficie de la membrana: 37°C
- Solución receptora: solución amortiguadora fosfato salina PBS (290 mOsmKg⁻¹ pH 7,4)
- Flujo del líquido receptor (F_{rec}): 5,6 mL/h
- Duración del ensayo: 6h
- Tiempo recogida receptores (t): cada media hora (hasta 2 h) y cada hora (de 2h a 6h)
- Número de celdas por ensayo (n):7
- N° de ensayos por formulación: 1 (Total: n= 7 celdas)

Los resultados obtenidos de la concentración y cantidad acumulada de la 5(6)CFNa difundida a través de la membrana de colodión a compartimento receptor en cada tiempo de muestreo se recogen en la **Tabla 5**.

t (h)	C _{rec} (µg/mL)	Q _{rec} (µg)	dC _{rec} /dt (µg/mL h)
0	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,191 ± 0,005
0,5	0,069 ± 0,002	0,192 ± 0,007	0,084 ± 0,005
1	0,084 ± 0,003	0,427± 0,011	0,014 ± 0,005
1,5	0,082 ± 0,004	0,657± 0,013	-0,011 ± 0,005
2	0,074 ± 0,002	0,863 ± 0,020	-0,011 ± 0,004
3	0,068 ± 0,002	1,242 ± 0,027	-0,008 ± 0,002
4	0,058 ± 0,002	1,566 ± 0,037	-0,010 ± 0,002
5	0,047 ± 0,003	1,830 ± 0,050	-0,010 ± 0,002
6	0,039 ± 0,003	2,047± 0,060	-0,007 ± 0,008

Tabla 5. Valores resultantes en el ensayo realizado a cada tiempo de muestreo. El término dC_{rec}/dt se refiere a la acumulación del principio activo en la celda del receptor . Valores medios ± desv. est.

Los datos resultantes de flujo aparente (J_{ap}) se calcularon mediante la **Ec.13**, y se realizó un ajuste matemático no lineal de un modelo biexponencial (Ec. 31) al perfil experimental obtenido de flujo aparente (J_{ap}) frente al tiempo. Los parámetros calculados al estimar el mejor ajuste no lineal se indican en la **Tabla 6**. Se obtuvo un perfil de flujo adecuado según el empleo de dosis finitas, tal y como puede observarse en la **Fig. 35**.

Parámetro	Valor	Error estandar
B (μg)	0,7312	0,2541
V_1 (h^{-1})	0,1590	0,3212
V_2 (h^{-1})	4,0990	1,2341

Tabla 6. Parámetros estimados en el ajuste matemático no lineal realizado en el cálculo del flujo aparente.

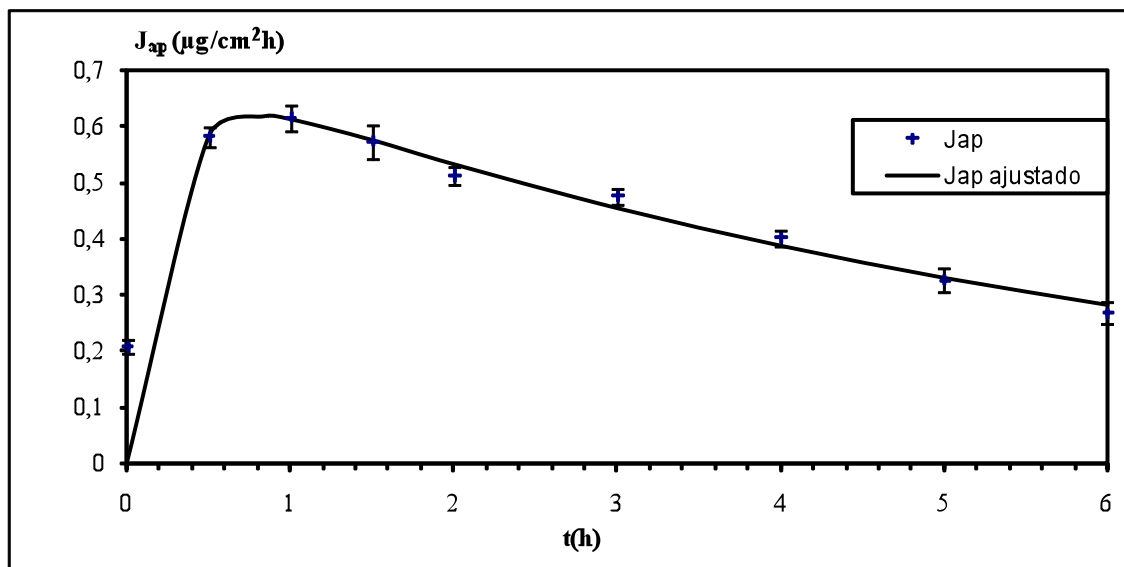


Fig. 35. Evolución del flujo aparente frente al tiempo de la 5(6)CFNa a través de una membrana de acetato de celulosa obtenido a partir de una solución del principio activo.

El comportamiento del flujo obtenido en el ensayo a través de membrana de acetato de celulosa, coincidió con el observado en el ensayo realizado con membrana de colodión, ya que ambos experimentos se realizaron en condiciones de dosis finitas. Asimismo, el término (dC_{rec}/dt) tomó un valor negativo cuando el valor del flujo comenzó a descender igual que sucedió en el ensayo 1.

Una vez estimada la ecuación de J_{ap} ajustado se determinó el tiempo necesario para alcanzar el flujo máximo (t_{jmax}), y el valor del flujo máximo (J_{max}), a partir del cual se calculó el coeficiente de permeabilidad (K_p) (Ec. 32). Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 7**.

t_{jmax} (h)	J_{max} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	K_p (cm/h)
0,825	0,6165	$1,03 \cdot 10^{-1}$

Tabla 7. Parámetros calculados en la determinación del coeficiente de permeabilidad.

DIFUSIÓN DE LIPOSOMAS VACÍOS LUV-DOPC FORMULADOS COMO SUSPENSIÓN A TRAVÉS DE UNA MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSA

Variables experimentales

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de acetato de celulosa
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: suspensión de liposomas (LUV) sin principio activo constituidos por DOPC
- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,5ml
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 37°C
- Solución receptora: solución amortiguadora fosfato salina PBS (290 mOsmKg⁻¹ pH 7,4)
- Flujo del líquido receptor (F_{rec}): 0,5 mL/h
- Duración del ensayo: 12h
- Tiempo recogida receptores (t): cada tres horas
- Número de celdas por ensayo (n):3
- N° de ensayos por formulación: 1 (Total: n= 3 celdas)

Este tipo de experimentos se diseñó con el objetivo de obtener un volumen de muestras de fluido receptor pequeños. Debido a esto, y teniendo en cuenta que no existía una difusión del principio activo (liposomas vacíos), se utilizó un F_{rec} de 0,5mL y se recogió muestra (t) cada tres horas.

Caracterización fisicoquímica de los liposomas

Composición (mol/mol)	Tipo	[Lípido] (M)	Z-ave (nm)	I.P.	(ζ) (mv)
DOPC	LUV	0,040	152,5 ± 3	0,234 ± 0,050	-3,5 ± 1,4

Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos determinados a partir de la suspensión de liposomas vacíos de composición DOPC. Valores medios ± desv. est. de tres determinaciones.

Las condiciones de preparación de las formulaciones de estudio se detallan en el apartado **III.4.3.1.1.**

Una vez finalizado el experimento se comprobó, tras la cuantificación del fosfolípido, que la concentración de la fosfatidilcolina (PC) de los liposomas remanentes en el compartimento

donador al finalizar el ensayo coincidía con la aplicada inicialmente. Por otra parte, se midieron las muestras de fluido receptor por la técnica de espectroscopía de correlación fotónica (PCS) con el fin de detectar la presencia de liposomas midiendo el tamaño de vesículas que hubieran podido atravesar la membrana siendo el resultado negativo en todos los casos. Estos resultados demuestran que este tipo de membrana es impermeable a la difusión de liposomas LUV.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE DATOS

La recuperación en cada ensayo, expresado como porcentaje de recuperación total de marcador en las diferentes muestras obtenidas (muestras de fluido receptor, y remanente en compartimento donador) en función de la cantidad dispuesta inicialmente se recoge en la **Tabla 9**.

Membranas hidrófilas	Formulación	Recuperación (%)
Acetato de celulosa	5(6)CFNa en solución	95,41± 4,95
Colodión	5(6)CFNa en solución	100,61 ± 3,50

Tabla 9. % de la 5(6)CFNa, respecto a la cantidad dispuesta en el compartimento donador, en los ensayos realizados a través de membranas hidrófilas.

Las elevadas recuperaciones obtenidas en ambos ensayos indican un tratamiento y análisis de las muestras adecuados, así como, la obtención de resultados fidedignos.

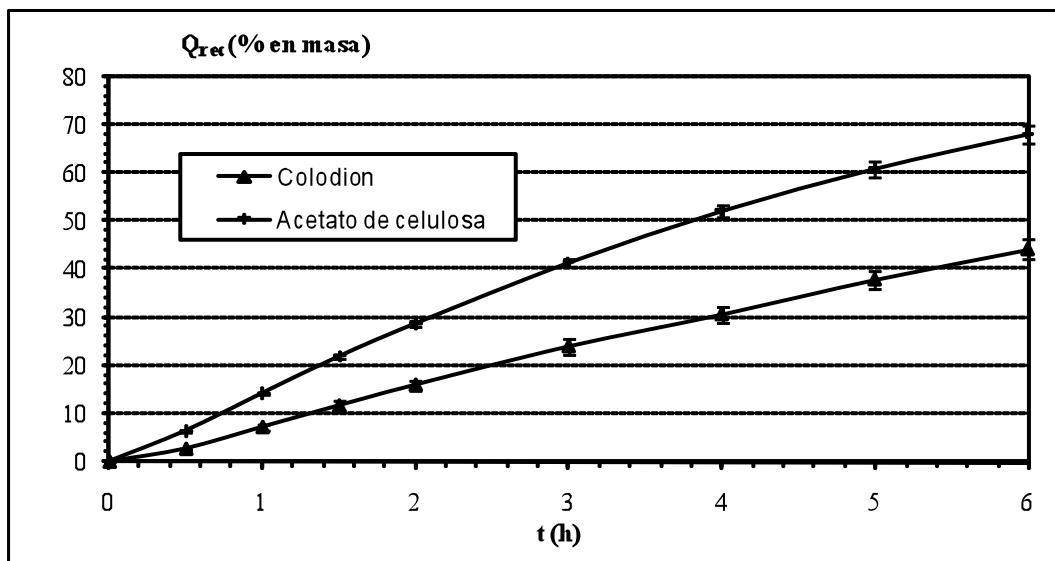


Fig. 36. Perfiles de cesión en porcentaje frente al tiempo de la 5(6)CFNa difundida a través de las membranas hidrófilas obtenidos a partir de una solución del principio activo.

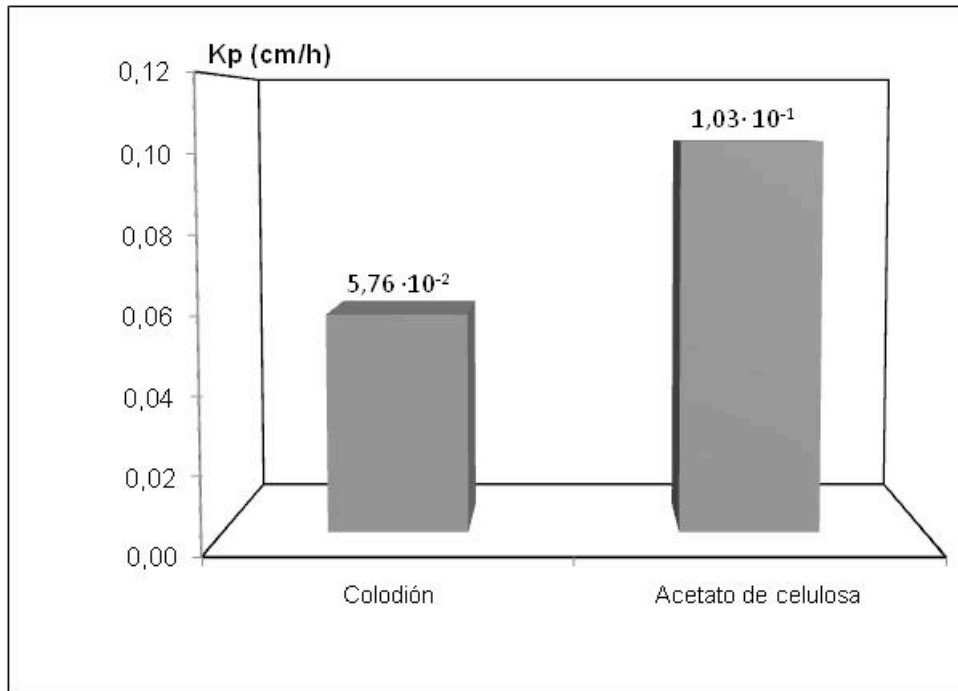


Fig. 37. Dato calculado del coeficiente de permeabilidad de la 5(6)CFNa a través de membranas hidrófilas obtenido a partir de una solución de principio activo.

Se observaron unos porcentajes de cesión inferiores de la 5(6)CFNa al compartimento receptor cuando se utilizó la membrana de colodión respecto a los encontrados con la membrana de acetato de celulosa a los mismos tiempos, siendo dichos porcentajes a las 6 h del ensayo del 44% y 68% respectivamente. Asimismo, el valor del Kp fue de un orden de magnitud superior en la membrana de acetato de celulosa ($1,03 \cdot 10^{-1}$ cm/h) frente al calculado en la membrana de colodión ($5,80 \cdot 10^{-2}$ cm/h).

A modo de resumen:

- La membrana de acetato de celulosa presentó frente a la membrana de colodión, una menor resistencia a la difusión de la 5(6)CFNa.
- El carácter impermeable de la membrana de acetato de celulosa frente a la difusión de liposomas LUV (descrito en páginas 194-195), permitió seleccionar dicha membrana para los estudios de permeabilidad del principio activo encapsulado en vesículas a través de las bicapas lipídicas.

IV.2.1.2. EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE BICAPAS LIPÍDICAS

Una vez seleccionada la membrana hidrófila de acetato de celulosa, el objetivo del siguiente grupo de ensayos de difusión fue estudiar la permeabilidad de las diferentes bicapas lipídicas cuando se encapsula una sustancia hidrófila. Como parámetros de estudio se calcularon la velocidad de salida del principio activo del liposoma (K_1) y el coeficiente de permeabilidad (K_p), que refleja el proceso total de salida del principio activo del liposoma y de paso por la membrana de difusión. Como datos previos a los experimentos con el principio activo ACV, se llevaron a cabo ensayos de difusión con la 5(6)CFNa, marcador hidrófilico. Para ello se prepararon mediante dispersión mecánica suspensiones de liposomas LUV de composición DOPC y POPC con la 5(6)CFNa encapsulada según descrito en apartado **III.3.2.1**. Dichas bicapas lipídicas, con una baja temperatura crítica de transición, son bicapas fluidas a la temperatura en la que se realizaron los ensayos.

Descripción de ensayos

- Difusión de 5(6) CFNa encapsulada en liposomas LUV- DOPC formulados como suspensión
- Difusión de 5(6) CFNa encapsulada en liposomas LUV- POPC formulados como suspensión

Caracterización físicoquímica de los liposomas

Composición	Tipo	[Lípido] (M)	Z-ave (nm)	I.P.	ζ (mv)
DOPC	LUV	0,039	168,7 ± 2	0,113 ± 0,020	- 4,2 ± 1,6
POPC	LUV	0,041	204,5 ± 3	0,141 ± 0,012	- 3,4 ± 0,7

Tabla 10. Parámetros físicoquímicos determinados a partir de las suspensiones de liposomas LUV con 5(6)CFNa encapsulada. Valores medios ± desv. est. de tres determinaciones.

Las condiciones de preparación de las formulaciones de estudio se detallan en el apartado **III.4.3.1.1**. Se seleccionaron bicapas lipídicas fluidas, DOPC y POPC con unas T_c de $-4\text{ }^\circ\text{C}$ y $-19\text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente, a la temperatura experimental de trabajo (37°C).

DIFUSIÓN DE 5(6)CFNa ENCAPASULADA EN LIPOSOMAS LUV- DOPC FORMULADOS COMO SUSPENSIÓN.

Variables experimentales

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de acetato de celulosa
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: suspensión de liposomas LUV de DOPC con la 5(6)CFNa encapsulada
- Concentración de partida del principio activo (C_0): 88,03 $\mu\text{g/mL}$
- Volumen aplicado de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,5ml
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 44,02 μg
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 37°C
- Solución receptora: solución amortiguadora fosfato salina PBS (290 mOsmKg⁻¹ pH 7,4)
- Flujo del líquido receptor (F_{rec}): 5,6 mL/h
- Duración del ensayo: 12h
- Tiempo recogida receptores (t): Cada media hora (hasta 2 h), cada hora (de 2h a 6h), y cada 2h (de 6 a 12h)
- Número de celdas por ensayo (n):3
- N° de ensayos por formulación: 1 (Total: n= 3 celdas)

Los resultados obtenidos de la concentración (C_{rec}) y cantidad acumulada (Q_{rec}) de la 5(6)CFNa difundida a través de la membrana de acetato de celulosa a compartimento receptor en cada tiempo de muestreo se recogen en la **Tabla 11**.

t (h)	C_{rec} ($\mu\text{g/mL}$)	Q_{rec} (μg)
0	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
0,5	0,018 \pm 0,000	0,049 \pm 0,000
1	0,057 \pm 0,000	0,209 \pm 0,000
1,5	0,097 \pm 0,010	0,480 \pm 0,028
2	0,107 \pm 0,010	0,779 \pm 0,000
3	0,097 \pm 0,010	1,322 \pm 0,056
4	0,101 \pm 0,015	1,883 \pm 0,140
5	0,091 \pm 0,010	2,388 \pm 0,170
6	0,087 \pm 0,010	2,875 \pm 0,225
8	0,077 \pm 0,000	3,738 \pm 0,225
10	0,067 \pm 0,000	4,489 \pm 0,225
12	0,054 \pm 0,006	5,092 \pm 0,243

Tabla 11. Valores resultantes en el ensayo realizado a cada tiempo de muestreo. Valores medios \pm desv. est.

La constante de velocidad de salida (K_1) de la 5(6)CFNa del liposoma, se calculó una vez determinados los datos de Q_{rec} en función del tiempo (**Tabla 11**) mediante ajuste no lineal según modelo descrito en la **Ec 29**. En la **Tabla 12** se resumen los parámetros estimados en el ajuste, el parámetro A se corresponde con la cantidad inicial de principio activo encapsulada en liposomas (Q_0). El valor resultante fue $K_1 = (0,1125 \pm 0,005) h^{-1}$.

Parámetro	Valor	Error estandar
A (μg)	6,7730	0,0950
B	1,0950	0,0160
$K_1 (h^{-1})$	0,1125	0,0050

Tabla 12. Parámetros estimados en el ajuste no lineal realizado en el cálculo de K_1 .

Los datos obtenidos de flujo aparente (J_{ap}) se calcularon mediante la **Ec.13**, y se realizó un ajuste matemático no lineal de un modelo biexponencial (Ec. 31) al perfil experimental obtenido de flujo aparente (J_{ap}) frente al tiempo. Los parámetros calculados al estimar el mejor ajuste no lineal se indican en la **Tabla 13**. Se obtuvo un perfil de flujo adecuado según el empleo de dosis finitas, tal y como puede observarse en la **Fig. 38**.

Parámetro	Valor	Error estandar
B (μg)	1,4810	0,1180
$V_1 (h^{-1})$	0,0357	0,0069
$V_2 (h^{-1})$	1,5310	0,2270
C ($\mu g/cm^2 h$)	-0,5802	0,1420

Tabla 13. Parámetros estimados en el ajuste matemático no lineal realizado en el cálculo del flujo aparente.

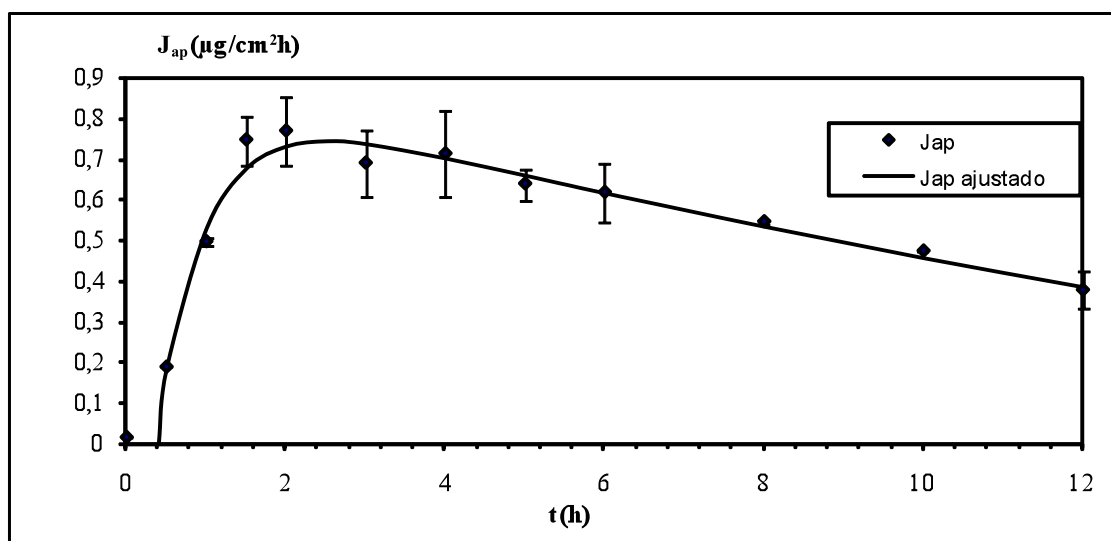


Fig. 38. Evolución del flujo aparente frente al tiempo de la 5(6)CFNa a través de una membrana de acetato de celulosa obtenido a partir de una suspensión de liposomas LUV de composición DOPC.

Una vez estimada la ecuación de J_{ap} ajustado se determinó el tiempo necesario para alcanzar el flujo máximo ($t_{j_{max}}$), y el valor del flujo máximo (J_{max}), a partir del cual se calculó el coeficiente de permeabilidad (K_p) (**Ec. 32**). Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 14**.

$t_{j_{max}}$ (h)	J_{max} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	K_p (cm/h)
2,513	0,7421	$8,40 \cdot 10^{-3}$

Tabla 14. Parámetros calculados en la determinación del coeficiente de permeabilidad.

DIFUSIÓN DE 5(6)CFNa ENCAPASULADA EN LIPOSOMAS LUV- POPC FORMULADOS COMO SUSPENSIÓN

Variables experimentales

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de acetato de celulosa
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: suspensión de liposomas LUV de POPC con la 5(6)CFNa encapsulada
- Concentración de partida del principio activo (C_0): 455,83 $\mu\text{g/mL}$
- Volumen aplicado de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,5ml
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 227,9 μg
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 37°C
- Solución receptora: solución amortiguadora fosfato salina PBS (290 mOsmK g^{-1} pH 7,4)
- Flujo del líquido receptor (F_{rec}): 5,579 mL/h
- Duración del ensayo: 12h
- Tiempo recogida receptores (t): Cada media hora (hasta 2 h), cada hora (de 2h a 6h), y cada 2h (de 6 a 12h)
- Número de celdas por ensayo (n):3
- N° de ensayos por formulación: 1 (Total: n= 3 celdas)

Los resultados obtenidos de la concentración (C_{rec}) y cantidad acumulada (Q_{rec}) de la 5(6)CFNa difundida a través de la membrana de acetato de celulosa a compartimento receptor en cada tiempo de muestreo se recogen en la **Tabla 15**.

t (h)	C_{rec} ($\mu\text{g/mL}$)	Q_{rec} (μg)
0	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
0,5	0,310 \pm 0,012	0,865 \pm 0,032
1	0,516 \pm 0,156	2,305 \pm 0,403
1,5	0,812 \pm 0,029	4,570 \pm 0,483
2	0,872 \pm 0,076	7,002 \pm 0,684
3	0,782 \pm 0,042	11,366 \pm 0,869
4	0,799 \pm 0,038	15,823 \pm 1,042
5	0,792 \pm 0,051	20,242 \pm 1,311
6	0,776 \pm 0,030	24,569 \pm 1,478
8	0,722 \pm 0,050	32,629 \pm 2,038
10	0,633 \pm 0,068	39,687 \pm 2,755
12	0,563 \pm 0,170	45,966 \pm 4,037

Tabla 15. Valores resultantes en el ensayo realizado a cada tiempo de muestreo. Valores medios \pm desv. est.

La constante de velocidad de salida (K_1) de la 5(6)CFNa del liposoma, se calculó una vez determinados los datos de Q_{rec} en función del tiempo (**Tabla 15**) mediante ajuste no lineal según modelo descrito en la **Ec 29**. En la **Tabla 16** se resumen los parámetros estimados en el ajuste, el parámetro A se corresponde con la cantidad inicial de principio activo encapsulada en liposomas (Q_0). El valor resultante fue $K_1 = (0,0520 \pm 0,0007) h^{-1}$.

Parámetro	Valor	Error estándar
A (μg)	102,5	0,3850
B	1,0320	0,0031
$K_1(h^{-1})$	0,0520	0,0007

Tabla 16. Parámetros estimados en el ajuste no lineal realizado en el cálculo de K_1 .

Los datos obtenidos de flujo aparente (J_{ap}) se calcularon mediante la **Ec.13**, y se realizó un ajuste matemático no lineal de un modelo biexponencial (**Ec. 31**) al perfil experimental obtenido de flujo aparente (J_{ap}) frente al tiempo. Los parámetros calculados al estimar el mejor ajuste no lineal se indican en la **Tabla 17**. Se obtuvo un perfil de flujo adecuado según el empleo de dosis finitas, tal y como puede observarse en la **Fig. 39**.

Parámetro	Valor	Error estándar
B (μg)	9,0550	1,9400
$V_1(h^{-1})$	0,0308	0,0139
$V_2(h^{-1})$	1,5860	0,4620
C ($\mu g/cm^2h$)	-2,1760	2,1900

Tabla 17. Parámetros estimados en el ajuste matemático no lineal realizado en el cálculo del flujo aparente.

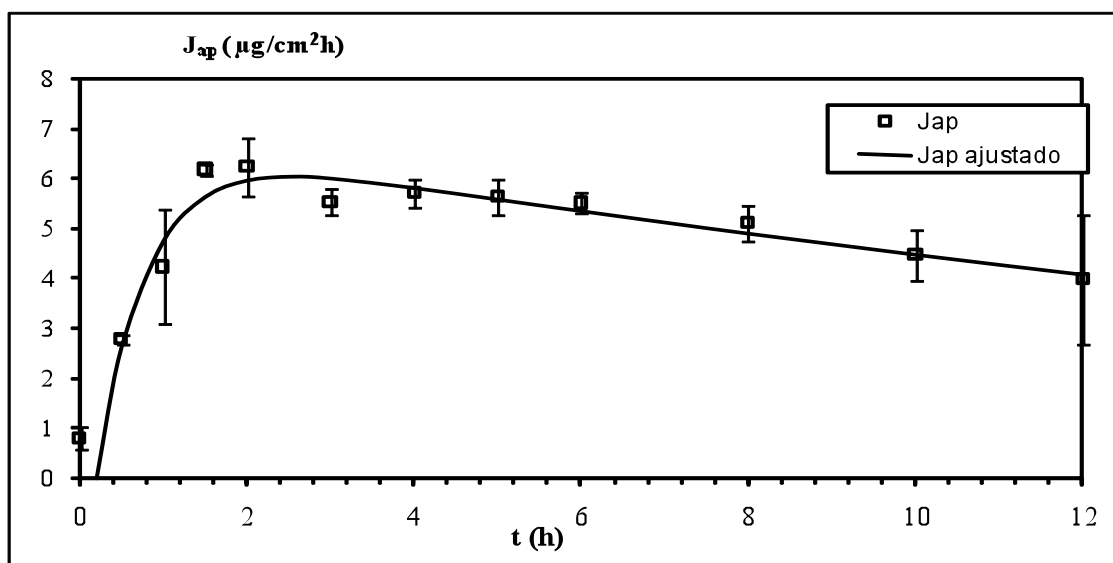


Fig. 39. Evolución del flujo aparente frente al tiempo de la 5(6)CFNa a través de una membrana de acetato de celulosa obtenido a partir de una suspensión de liposomas LUV de composición POPC.

Una vez estimada la ecuación de J_{ap} ajustado se determinó el tiempo necesario para alcanzar el flujo máximo ($t_{j_{max}}$), y el valor del flujo máximo (J_{max}), a partir del cual se calculó el coeficiente de permeabilidad (Kp) (Ec. 32). Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 18**.

$t_{j_{max}}$ (h)	J_{max} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	Kp (cm/h)
2,534	6,0356	$1,32 \cdot 10^{-2}$

Tabla 18. Parámetros calculados en la determinación del coeficiente de permeabilidad.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE DATOS

La recuperación en cada ensayo expresado como porcentaje de recuperación total de principio activo en las diferentes muestras obtenidas (muestras de fluido receptor, y remanente en compartimento donador) en función de la cantidad dispuesta inicialmente se recoge en la **Tabla 19**.

Formulación	Recuperación %
DOPC LUV 5(6) CFNa encapsulada	83,46 ± 5,25
POPC LUV 5(6) CFNa encapsulada	95,76 ± 3,13

Tabla 19. % de recuperación de la 5(6) CFNa, respecto a la cantidad dispuesta en el compartimento donador, en los ensayos realizados a través de una membranas de acetato de celulosa.

Los elevadas recuperaciones obtenidas en los ensayos realizados a partir de liposomas LUV de DOPC y POPC indican un tratamiento y análisis de las muestras adecuado, así como, la obtención de resultados fidedignos.

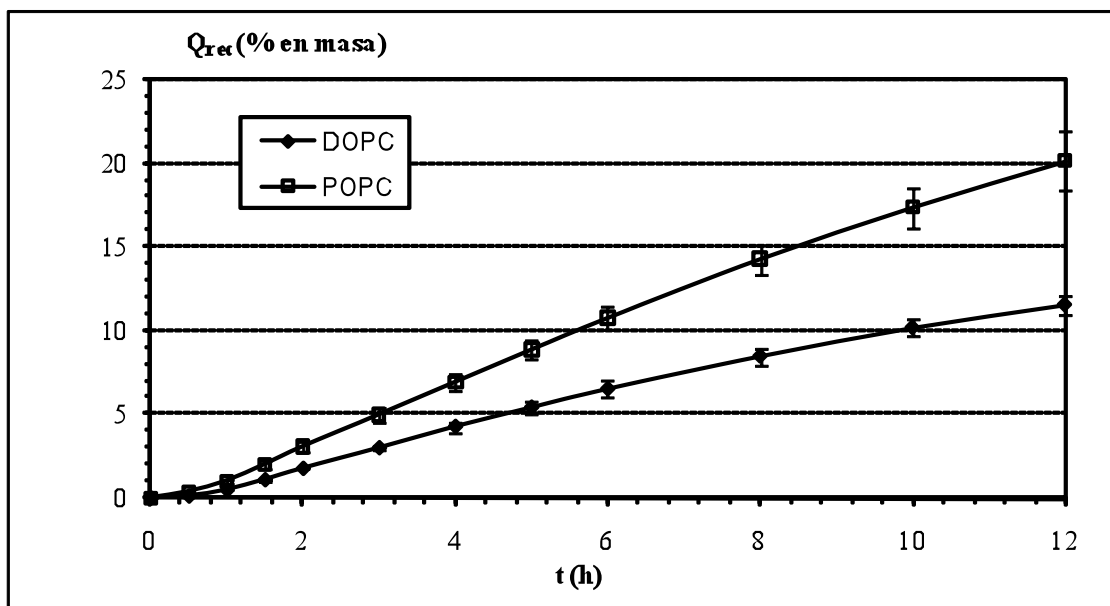


Fig. 40. Perfiles de cesión en porcentaje frente al tiempo de la 5(6)CFNa difundida a través de una membrana de acetato de celulosa obtenidos a partir de liposomas LUV en función de la composición de la bicapa lipídica.

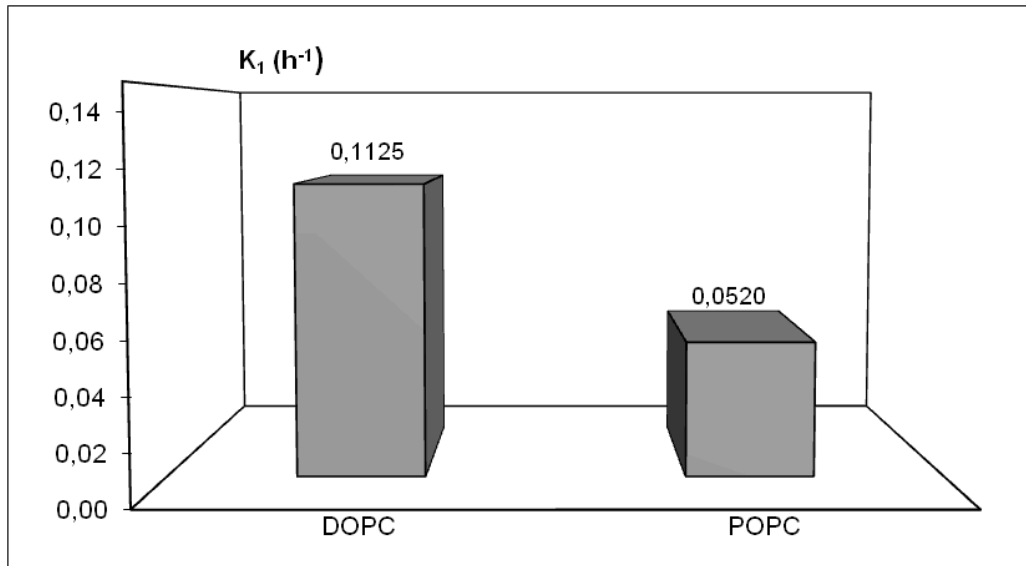


Fig. 41. Constante de velocidad de salida (K_1) de la 5(6)CFNa encapsulada en liposomas LUV.

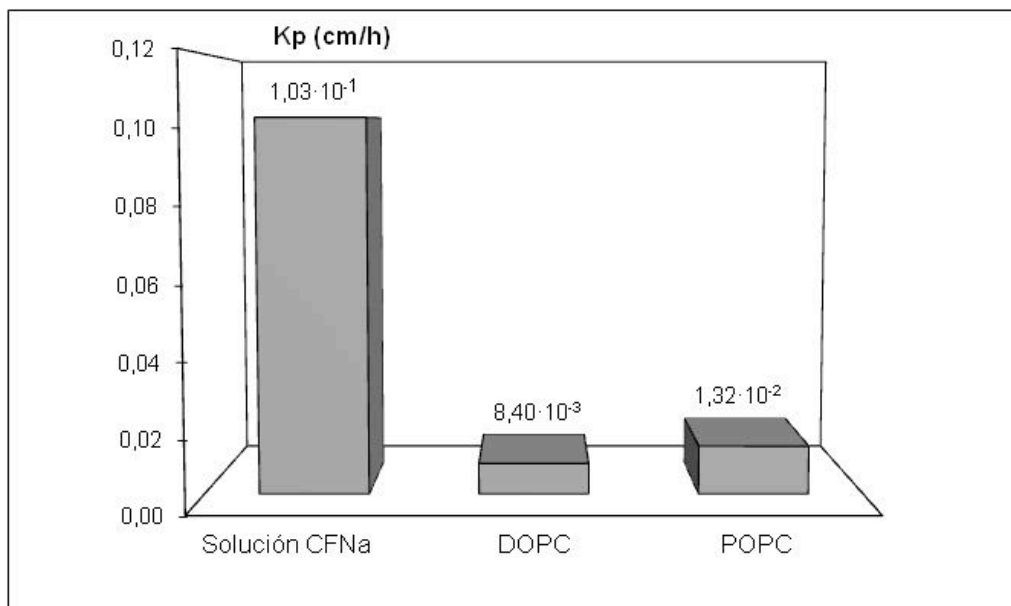


Fig. 42. Dato calculado del coeficiente de permeabilidad de la 5(6)CFNa a través de una membrana de acetato de celulosa a partir de una solución de principio activo y liposomas LUV.

La constante de velocidad de salida del liposoma K_1 , fue mayor para el marcado hidrofílico en vesículas de DOPC ($0,1125 h^{-1}$), frente a la POPC ($0,0520 h^{-1}$), siendo por tanto la bicapa lipídica de menor T_c , la más permeable al paso de la 5(6)CFNa.

El menor valor de Q_0 estimado respecto al Q_0 experimental tanto en la POPC ($Q_{0\ est}$ de $102,5 \mu g$, $Q_{0\ exp}$ de $227,9 \mu g$) como en la DOPC ($Q_{0\ est}$ de $6,8 \mu g$, $Q_{0\ exp}$ de $44,02 \mu g$) indicó que a tiempo cero del ensayo de difusión se había producido una salida del principio activo al medio

externo. Las diferencias encontradas entre la Q_0 estimada y Q_0 experimental fueron mayores para los liposomas POPC lo que significó una mayor cantidad de 5(6) CFNa en el medio externo para esta composición al comienzo del ensayo. Estos resultados influyeron en el mayor porcentaje de cesión y valor del coeficiente de permeabilidad (K_p) obtenido para la POPC frente a la DOPC.

Cabe destacar que el dato de coeficiente de permeabilidad (K_p) obtenido para la 5(6)CFNa fue menor en las formulaciones liposómicas estudiadas que con la solución de 5(6)CFNa (**Fig. 42**) confirmándose, que la difusión de la molécula a través de la bicapa lipídica es la etapa limitante del proceso.

A modo de resumen:

- Los ensayos de difusión realizados a través de una membrana de acetato de celulosa con un marcador hidrofílico como 5(6)CFNa, demostraron cómo este tipo de ensayos nos permite obtener datos de la permeabilidad que presentan las bicapas lipídicas a la difusión de un principio activo hidrófilo encapsulado en vesículas mediante los parámetros de velocidad de salida del principio activo del liposoma (K_1) y el coeficiente de permeabilidad (K_p).
- La bicapa lipídica de DOPC presenta una permeabilidad mayor frente al marcador fluorescente encapsulado (5(6)CFNa) que la de POPC.

IV.2.2.

Ensayos con aciclovir

Tras finalizar los ensayos de difusión con el marcador hidrofílico 5(6)CFNa, se iniciaron los estudios con suspensiones de liposomas constituidas por las bicapas lipídicas de composición DOPC, POPC y H-SPC/COL (60/40) (mol/mol), con el fin de conocer mediante ensayos con membranas de acetato de celulosa, la permeabilidad que presentan estas bicapas lipídicas a la difusión al ACV, principio activo objeto de estudio en la memoria de tesis actual. Para ello se prepararon mediante dispersión mecánica suspensiones de liposomas de tamaño LUV con el ACV encapsulado según descrito en apartado **III.3.2.1**. Dichas bicapas se encuentran en estado de cristal líquido a la temperatura del ensayo, siendo la bicapa lipídica H-SPC/COL (60/40) (mol/mol), la menos fluida. Al igual que en los estudios anteriores como parámetros indicativos de la permeabilidad de las bicapas se calculó la velocidad de salida del principio activo del liposoma (K_1) y el coeficiente de permeabilidad (K_p) que refleja el proceso total de salida del ACV del liposoma y de su paso por la membrana de difusión. Los datos obtenidos se compararon con los datos resultantes del estudio de difusión de ACV en solución realizado con el mismo tipo de membrana de difusión.

Descripción de ensayos

- Difusión de ACV en solución.
- Difusión de ACV encapsulado en liposomas LUV-DOPC formulados como suspensión.
- Difusión de ACV encapsulado en liposomas LUV- POPC formulados como suspensión.
- Difusión de ACV encapsulado en liposomas LUV-H-SPC/COL (60/40)(mol/mol) formulados como suspensión.

Caracterización fisicoquímica de los liposomas

Composición (mol/mol)	Tipo	[Lipido] (M)	Z-ave (nm)	IP	ζ (mv)	E.E
DOPC	LUV	0,013	154,5 \pm 2	0,155 \pm 0,035	- 4,6 \pm 1,9	0,56
POPC	LUV	0,024	169,6 \pm 4	0,143 \pm 0,012	- 5,1 \pm 2,3	0,40
H-SPC/COL (60/40)	LUV	0.042	235 \pm 3	0,159 \pm 0,024	- 3,2 \pm 0,6	0,43

Tabla 20. Parámetros fisicoquímicos determinados a partir de las suspensiones de liposomas LUV con ACV encapsulado de composición DOPC, POPC y H-SPC-COL. Valores medios \pm desv.est. de tres determinaciones.

Las condiciones de preparación de las formulaciones de estudio se detallan en el apartado **III.4.3.1.2.**

Las fosfatidilcolinas DOPC y POPC, con unas Tc de -19 °C y 4°C respectivamente, se presentan como bicapas fluidas a la temperatura de 32°C (temperatura en el compartimento donador y superficie de la membrana). Respecto a la bicapa mixta H-SPC/COL, aunque la fosfatidilcolina H-SPC presenta una Tc alrededor de 54,5 °C, la incorporación del colesterol en una relación molar (60/40) aumenta la fluidez de dicha membrana por debajo de la Tc, disminuyendo la rigidez de esta membrana a la temperatura del ensayo.

DIFUSIÓN DE ACV EN SOLUCIÓN

Variables experimentales

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de acetato de celulosa
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: solución de ACV en tampón HEPES salino (300 mOsm Kg⁻¹, pH 6)
- Concentración de principio activo en formulación donadora (C₀): 1500 µg/mL
- Volumen aplicado de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,5ml
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q₀): 750 µg
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32°C
- Solución receptora: solución amortiguadora HEPES- Salino
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 2,5 mL/h
- Duración del ensayo: 8h
- Tiempo recogida receptores (t): Cada media hora (hasta 2 h), cada hora (de 2h a 8h),
- Número de celdas por ensayo (n): 3
- N° de ensayos por formulación: 1 (Total: n= 3 celdas)

Los resultados obtenidos de la concentración (C_{rec}) y cantidad acumulada (Q_{rec}) del ACV difundido a través de la membrana de acetato de celulosa a compartimento receptor en cada tiempo de muestreo se recogen en la **Tabla 21**.

t (h)	C _{rec} (µg/mL)	Q _{rec} (µg)
0	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
0,5	61,134 ± 0,003	76,417 ± 0,004
1	89,577 ± 1,117	188,389 ± 1,399
1,5	75,103 ± 0,184	282,267 ± 1,307
2	63,036 ± 0,227	361,062 ± 1,240
3	47,810 ± 3,262	480,588 ± 8,397
4	30,339 ± 1,434	556,435 ± 11,971
5	21,450 ± 1,774	610,060 ± 14,383
6	13,100 ± 1,460	642,811 ± 17,994
7	8,639 ± 1,006	664,408 ± 20,466
8	5,237 ± 0,671	677,500 ± 21,992

Tabla 21. Valores resultantes en el ensayo realizado a cada tiempo de muestreo. Valores medios ± desv. est.

Los datos resultantes de flujo aparente (J_{ap}) se calcularon mediante la **Ec.13**, y se realizó un ajuste matemático no lineal de un modelo biexponencial (**Ec. 31**) al perfil experimental obtenido de flujo aparente (J_{ap}) frente al tiempo. Los parámetros calculados al estimar el mejor ajuste no lineal se indican en la **Tabla 22** . Se obtuvo un perfil de flujo adecuado según el empleo de dosis finitas, tal y como puede observarse en la **Fig. 43**.

Parámetro	Valor	Error estandar
B (µg)	417,0	8,6
V ₁ (h ⁻¹)	0,4232	0,0328
V ₂ (h ⁻¹)	4,4730	1,3510

Tabla 22. Parámetros estimados en el ajuste matemático no lineal realizado en el cálculo del flujo aparente.

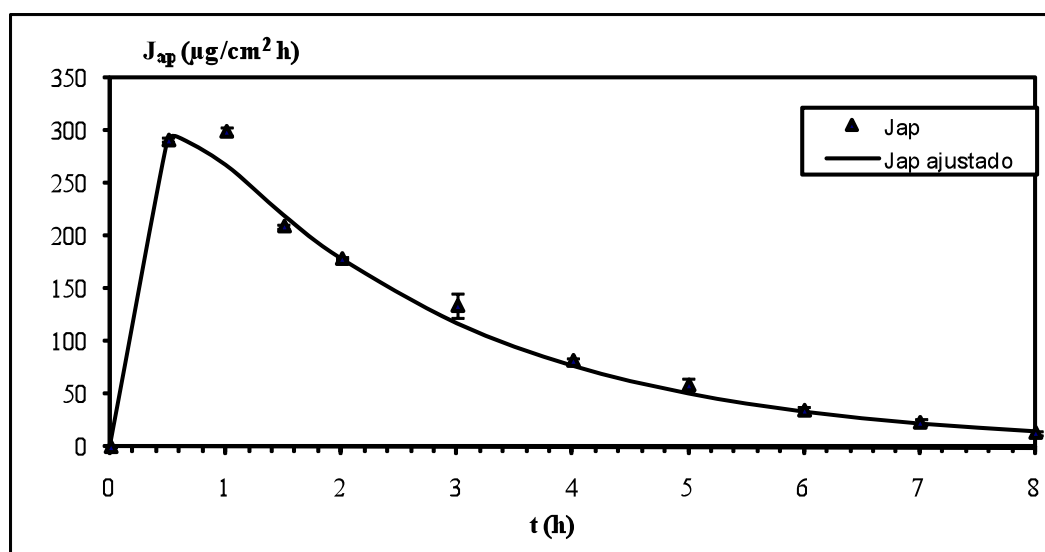


Fig. 43. Evolución del flujo aparente frente al tiempo del ACV a través de la membrana de acetato de celulosa obtenido a partir de una solución del principio activo.

Una vez estimada la ecuación de J_{ap} ajustado se determinó el tiempo necesario para alcanzar el flujo máximo (t_{jmax}), y el valor del flujo máximo (J_{max}), a partir del cual se calculó el coeficiente de permeabilidad (Kp) (**Ec. 32**). Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 23**.

t_{jmax} (h)	J_{max} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	Kp (cm/h)
0,582	295,093	$1,97 \cdot 10^{-1}$

Tabla 23. Parámetros calculados en la determinación del coeficiente de permeabilidad.

DIFUSIÓN DE ACV ENCAPSULADO EN LIPOSOMAS LUV-DOPC FORMULADOS COMO SUSPENSIÓN.

VARIABLES EXPERIMENTALES

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de acetato de celulosa
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: suspensión de liposomas LUV de DOPC con el ACV encapsulado
- Concentración de principio activo en formulación donadora (C_0): 58,59 $\mu\text{g/mL}$
- Volumen aplicado de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,5ml
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 29,30 μg
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32°C
- Solución receptora: solución amortiguadora HEPES- Salino (300 mOsm Kg^{-1} , pH 6)
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 2,5 mL/h
- Duración del ensayo: 8h
- Tiempo recogida receptores (t): Cada media hora (hasta 2 h), cada hora (de 2h a 8h),
- Número de celdas por ensayo (n):3
- Nº de ensayos por formulación: 1 (Total: n= 3 celdas)

Los resultados obtenidos de la concentración (C_{rec}) y cantidad acumulada (Q_{rec}) del ACV difundido a través de la membrana de acetato de celulosa a compartimento receptor en cada tiempo de muestreo se recogen en la **Tabla 24**.

t (h)	C_{rec} ($\mu\text{g/mL}$)	Q_{rec} (μg)
0	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
0,5	0,671 \pm 0,004	0,839 \pm 0,004
1	1,364 \pm 0,105	2,543 \pm 0,130
1,5	1,787 \pm 0,070	4,777 \pm 0,210
2	2,069 \pm 0,115	7,364 \pm 0,069
3	1,669 \pm 0,085	11,537 \pm 0,212
4	1,393 \pm 0,074	15,018 \pm 0,396
5	1,145 \pm 0,009	17,881 \pm 0,396
6	0,955 \pm 0,004	20,269 \pm 0,394
7	0,802 \pm 0,038	22,272 \pm 0,481
8	0,662 \pm 0,031	23,926 \pm 0,551

Tabla 24. Valores resultantes en el ensayo realizado a cada tiempo de muestreo. Valores medios \pm desv. est.

La constante de velocidad de salida (K_1) del ACV del liposoma, se calculó una vez determinados los datos de Q_{rec} en función del tiempo (**Tabla 24**) mediante ajuste no lineal según modelo descrito en la **Ec 29**. En la **Tabla 25** se resumen los parámetros estimados en el ajuste, el parámetro A se corresponde con la cantidad inicial de principio activo encapsulada en liposomas (Q_0). El valor resultante fue $K_1 = (0,2152 \pm 0,0087) h^{-1}$.

Parámetro	Valor	Error estandar
A (μg)	29,21	0,38
B	1,125	0,018
$K_1 (h^{-1})$	0,2152	0,0087

Tabla 25. Parámetros estimados en el ajuste no lineal realizado en el cálculo de K_1 .

Los datos resultantes de flujo aparente (J_{ap}) se calcularon mediante la **Ec.13**, y se realizó un ajuste matemático no lineal de un modelo biexponencial (Ec. 31) al perfil experimental obtenido de flujo aparente (J_{ap}) frente al tiempo. Los parámetros calculados al estimar el mejor ajuste no lineal se indican en la **Tabla 26**. Se obtuvo un perfil de flujo adecuado según el empleo de dosis finitas, tal y como puede observarse en la **Fig. 44**.

Parámetro	Valor	Error estandar
B (μg)	11,46	3,05
$V_1 (h^{-1})$	0,2337	0,0537
$V_2 (h^{-1})$	1,2090	0,3560

Tabla 26. Parámetros estimados en el ajuste matemático no lineal realizado en el cálculo de J_{ap} .

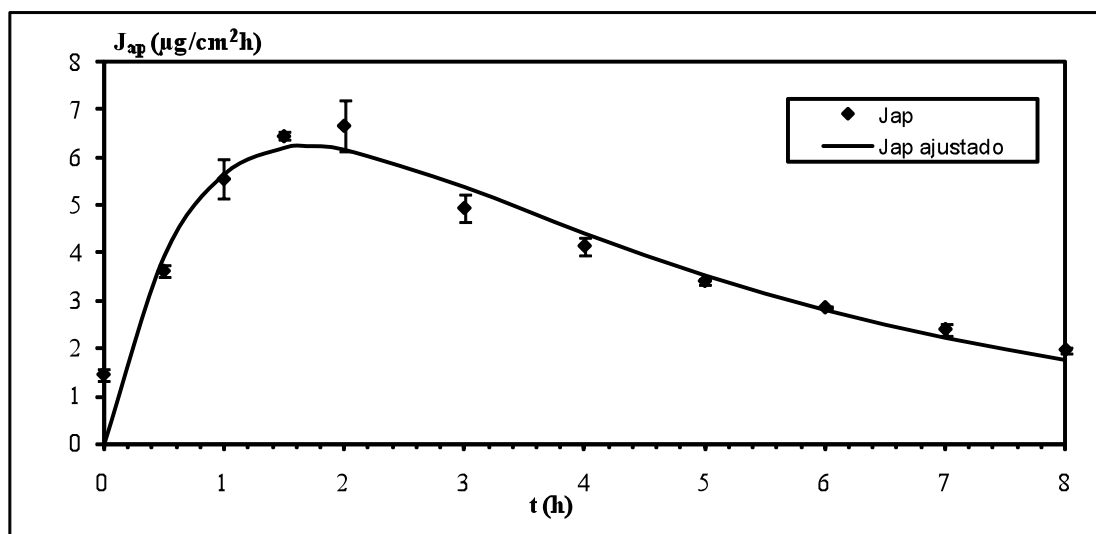


Fig. 44. Evolución del flujo aparente frente al tiempo del ACV a través de una membrana de acetato de celulosa obtenido a partir de una suspensión de liposomas LUV de composición DOPC.

Una vez estimada la ecuación de J_{ap} ajustado se determinó el tiempo necesario para alcanzar el flujo máximo (t_{jmax}), y el valor del flujo máximo (J_{max}), a partir del cual se calculó el coeficiente de permeabilidad (K_p) (**Ec. 32**). Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 27**.

t_{jmax} (h)	J_{max} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	K_p (cm/h)
1,685	6,2354	$1,06 \cdot 10^{-1}$

Tabla 27. Parámetros calculados en la determinación del coeficiente de permeabilidad.

DIFUSIÓN DE ACV ENCAPSULADO EN LIPOSOMAS LUV-POPC FORMULADOS COMO SUSPENSIÓN

Variables experimentales

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de acetato de celulosa
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: suspensión de liposomas LUV de POPC con el ACV encapsulado
- Concentración de principio activo en formulación donadora (C_0): 73,88 $\mu\text{g/mL}$
- Volumen aplicado de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,5ml
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 36,94 μg
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32°C
- Solución receptora: solución amortiguadora HEPES- Salino (300 mOsm Kg^{-1} , pH 6)
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 2,5 mL/h
- Duración del ensayo: 8h
- Tiempo recogida receptores (t): Cada media hora (hasta 2 h), cada hora (de 2h a 8h),
- Número de celdas por ensayo (n):3
- N° de ensayos por formulación: 1 (Total: n= 3 celdas)

Los resultados obtenidos de la concentración (C_{rec}) y cantidad acumulada (Q_{rec}) del ACV difundido a través de la membrana de acetato de celulosa a compartimento receptor en cada tiempo de muestreo se recogen en la **Tabla 28**.

t (h)	C_{rec} ($\mu\text{g/mL}$)	Q_{rec} (μg)
0	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
0,5	0,204 \pm 0,029	0,255 \pm 0,036
1	0,898 \pm 0,056	1,377 \pm 0,096
1,5	1,350 \pm 0,042	3,065 \pm 0,141
2	1,456 \pm 0,216	4,884 \pm 0,211
3	1,664 \pm 0,087	9,044 \pm 0,395
4	1,561 \pm 0,051	12,948 \pm 0,439
5	1,340 \pm 0,140	16,298 \pm 0,721
6	1,141 \pm 0,076	19,152 \pm 0,900
7	1,010 \pm 0,150	21,677 \pm 1,209
8	0,966 \pm 0,298	24,091 \pm 1,710

Tabla 28. Valores resultantes en el ensayo realizado a cada tiempo de muestreo. Valores medios \pm desv. est.

La constante de velocidad de salida (K_1) del ACV del liposoma, se calculó una vez determinados los datos de Q_{rec} en función del tiempo (**Tabla 28**) mediante ajuste no lineal según modelo descrito en la **Ec 29**. En la **Tabla 29** se resumen los parámetros estimados en el ajuste, el parámetro A se corresponde con la cantidad inicial de principio activo encapsulada en liposomas (Q_0). El valor resultante fue $K_1 = (0,1348 \pm 0,007) h^{-1}$.

Parámetro	Valor	Error estandar
A (μg)	38,7	0,7
B	1,113	0,019
$K_1(h^{-1})$	0,1348	0,0070

Tabla 29. Parámetros estimados en el ajuste no lineal realizado en el cálculo de K_1 .

Los datos resultantes de flujo aparente (J_{ap}) se calcularon mediante la **Ec.13**, y se realizó un ajuste matemático no lineal de un modelo biexponencial (Ec. 31) al perfil experimental obtenido de flujo aparente (J_{ap}) frente al tiempo. Los párametros calculados al estimar el mejor ajuste no lineal se indican en la **Tabla 30**. Se obtuvo un perfil de flujo adecuado según el empleo de dosis finitas, tal y como puede observarse en la **Fig. 45**.

Parámetro	Valor	Error estandar
B (μg)	105,1	6,4
$V_1(h^{-1})$	0,3368	0,1480
$V_2(h^{-1})$	0,3859	0,1650

Tabla 30. Parámetros estimados en el ajuste matemático no lineal realizado en el cálculo de J_{ap} .

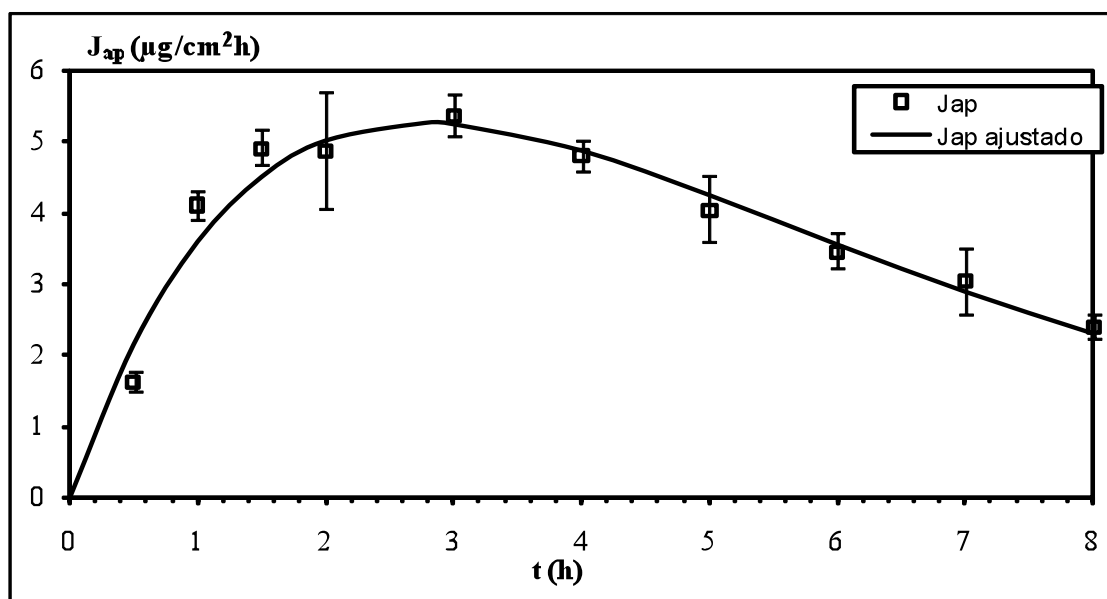


Fig. 45. Evolución del flujo aparente frente al tiempo del ACV a través de una membrana de acetato de celulosa obtenido a partir de una suspensión de liposomas LUV de composición POPC.

Una vez estimada la ecuación de J_{ap} ajustado se determinó el tiempo necesario para alcanzar el flujo máximo (t_{jmax}), y el valor del flujo máximo (J_{max}), a partir del cual se calculó el coeficiente de permeabilidad (Kp) (**Ec. 32**). Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 31**.

t_{jmax} (h)	J_{max} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	Kp (cm/h)
2,772	5,2577	$7,12 \cdot 10^{-2}$

Tabla 31. Parámetros calculados en la determinación del coeficiente de permeabilidad.

DIFUSIÓN DE ACV ENCAPSULADO EN LIPOSOMAS LUV- H-SPC/COL FORMULADOS COMO SUSPENSIÓN.

Variables experimentales

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de acetato de celulosa
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: suspensión de liposomas LUV de H-SPC/COL (60/40)(mol/mol) con el ACV encapsulado
- Concentración de principio activo en formulación donadora (C_0): 113,73 $\mu\text{g/mL}$
- Volumen aplicado de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,5ml
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 56,87 μg
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32°C
- Solución receptora: solución amortiguadora HEPES- Salino (300 mOsm Kg^{-1} , pH 6)
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 2,5 mL/h
- Duración del ensayo: 8h
- Tiempo recogida receptores (t): Cada media hora (hasta 2 h), cada hora (de 2h a 8h),
- Número de celdas por ensayo (n):3
- N° de ensayos por formulación: 1 (Total: n= 3 celdas)

Los resultados obtenidos de la concentración (C_{rec}) y cantidad acumulada (Q_{rec}) del ACV difundido a través de la membrana de acetato de celulosa a compartimento receptor en cada tiempo de muestreo se recogen en la **Tabla 32**.

t (h)	C_{rec} ($\mu\text{g/mL}$)	Q_{rec} (μg)
0	0,000 \pm 0,000	0,000 \pm 0,000
0,5	0,540 \pm 0,031	0,675 \pm 0,038
1	0,597 \pm 0,069	1,422 \pm 0,123
1,5	0,583 \pm 0,073	2,151 \pm 0,214
2	0,532 \pm 0,072	2,816 \pm 0,293
3	0,372 \pm 0,029	3,746 \pm 0,363
4	0,327 \pm 0,011	4,563 \pm 0,391
5	0,304 \pm 0,017	5,324 \pm 0,349
6	0,285 \pm 0,012	6,035 \pm 0,325
7	0,267 \pm 0,015	6,703 \pm 0,289
8	0,264 \pm 0,020	7,363 \pm 0,241

Tabla 32. Valores resultantes en el ensayo realizado a cada tiempo de muestreo. Valores medios \pm desv. est.

La constante de velocidad de salida (K_1) del ACV del liposoma, se calculó una vez determinados los datos de Q_{rec} en función del tiempo (**Tabla 32**) mediante ajuste no lineal según modelo descrito en la **Ec 29**. En la **Tabla 33** se resumen los parámetros estimados en el ajuste, el parámetro A se corresponde con la cantidad inicial de principio activo encapsulada en liposomas (Q_0). El valor resultante fue $K_1 = (0,0170 \pm 0,0023)h^{-1}$.

Parámetro	Valor	Error estandar
A (μg)	56,9	1,62
B	1,011	0,042
$K_1(h^{-1})$	0,0170	0,0023

Tabla 33. Parámetros estimados en el ajuste no lineal realizado en el cálculo de K_1 .

Los datos resultantes de flujo aparente (J_{ap}) se calcularon mediante la **Ec.13**, y se realizó un ajuste matemático no lineal de un modelo biexponencial (Ec. 31) al perfil experimental obtenido de flujo aparente (J_{ap}) frente al tiempo. Los parámetros calculados al estimar el mejor ajuste no lineal se indican en la **Tabla 34**. Se obtuvo un perfil de flujo adecuado según el empleo de dosis finitas, tal y como puede observarse en la **Fig. 46**.

Parámetro	Valor	Error estandar
B (μg)	2,32	0,15
$V_1(h^{-1})$	0,1730	0,0233
$V_2(h^{-1})$	147,0	0,0

Tabla 34. Parámetros estimados en el ajuste matemático no lineal realizado en el cálculo de J_{ap} .

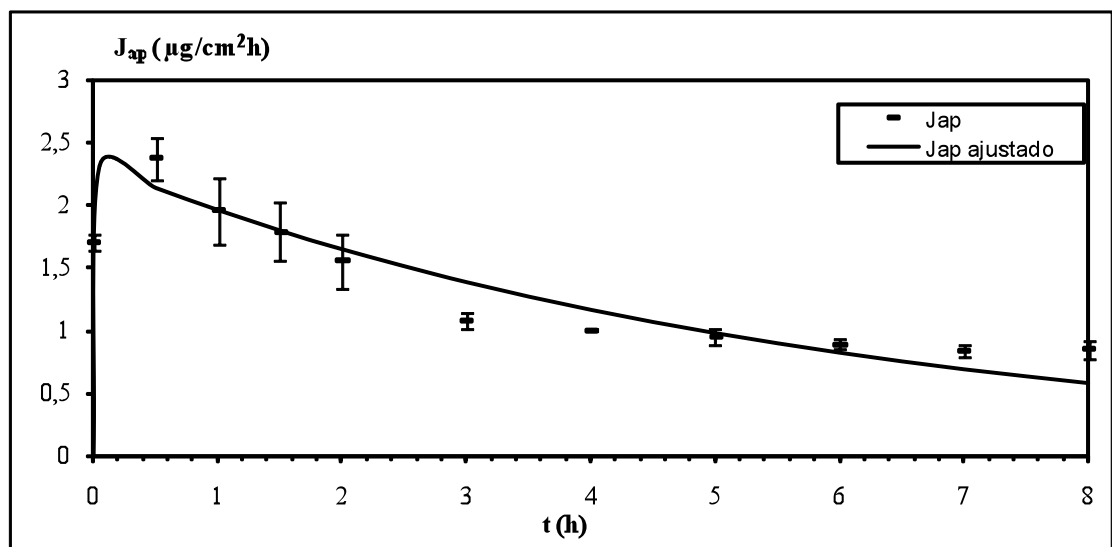


Fig. 46. Evolución del flujo aparente frente al tiempo del ACV a través de una membrana de acetato de celulosa obtenido a partir de una suspensión de liposomas LUV de composición H-SPC/COL.

Una vez estimada la ecuación de J_{ap} ajustado se determinó el tiempo necesario para alcanzar el flujo máximo (t_{jmax}), y el valor del flujo máximo (J_{max}), a partir del cual se calculó el coeficiente de permeabilidad (K_p) (**Ec. 32**). Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 35**.

t_{jmax} (h)	J_{max} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	K_p (cm/h)
0,046	2,3029	$2,02 \cdot 10^{-2}$

Tabla 35. Parámetros calculados en la determinación del coeficiente de permeabilidad.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE DATOS

La recuperación obtenida en cada ensayo expresado como porcentaje de recuperación total de principio activo en las diferentes muestras obtenidas (muestras de fluido receptor, y remanente en compartimento donador) en función de la cantidad dispuesta inicialmente se recoge en la **Tabla 36**.

Formulación	Recuperación %
ACV en solución	90,74 ± 3,05
DOPC LUV ACV encapsulado	91,34 ± 1,73
POPC LUV ACV encapsulado	88,56 ± 4,94
H-SPC/COL LUV ACV encapsulado	98,30 ± 3,65

Tabla 36. % de recuperación del ACV respecto a la cantidad dispuesta en el compartimento donador, en los ensayos realizados a través de membranas de acetato de celulosa.

Los elevadas recuperaciones obtenidas en los ensayos descritos reflejaron un adecuado tratamiento y análisis de las muestras, así como, la obtención de resultados fidedignos.

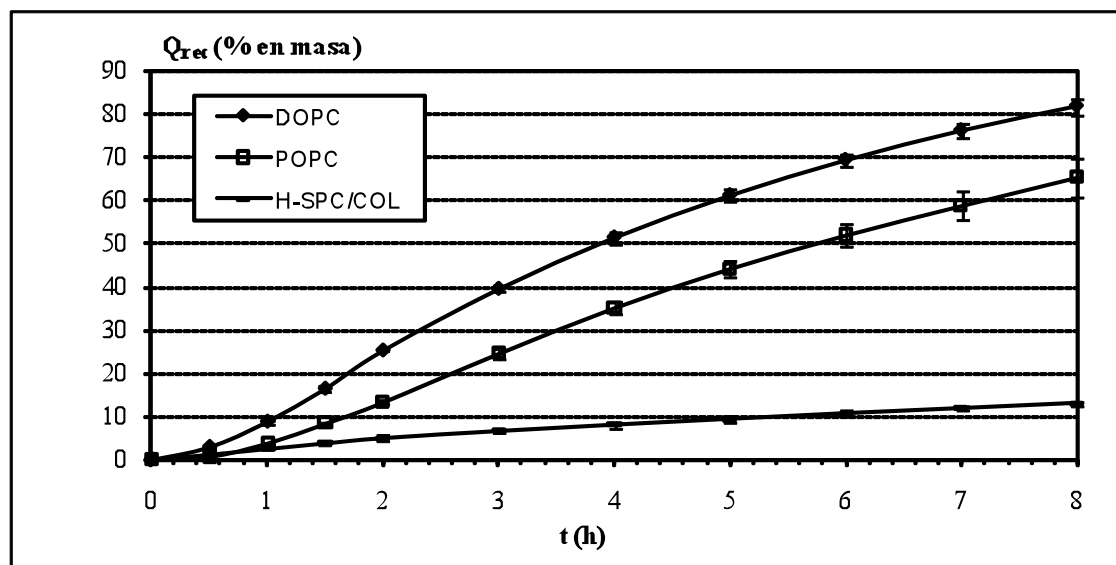


Fig. 47. Perfiles de cesión en porcentaje frente al tiempo del ACV difundido a través de una membrana de acetato de celulosa obtenidos a partir de liposomas LUV en función de la composición de la bicapa lipídica.

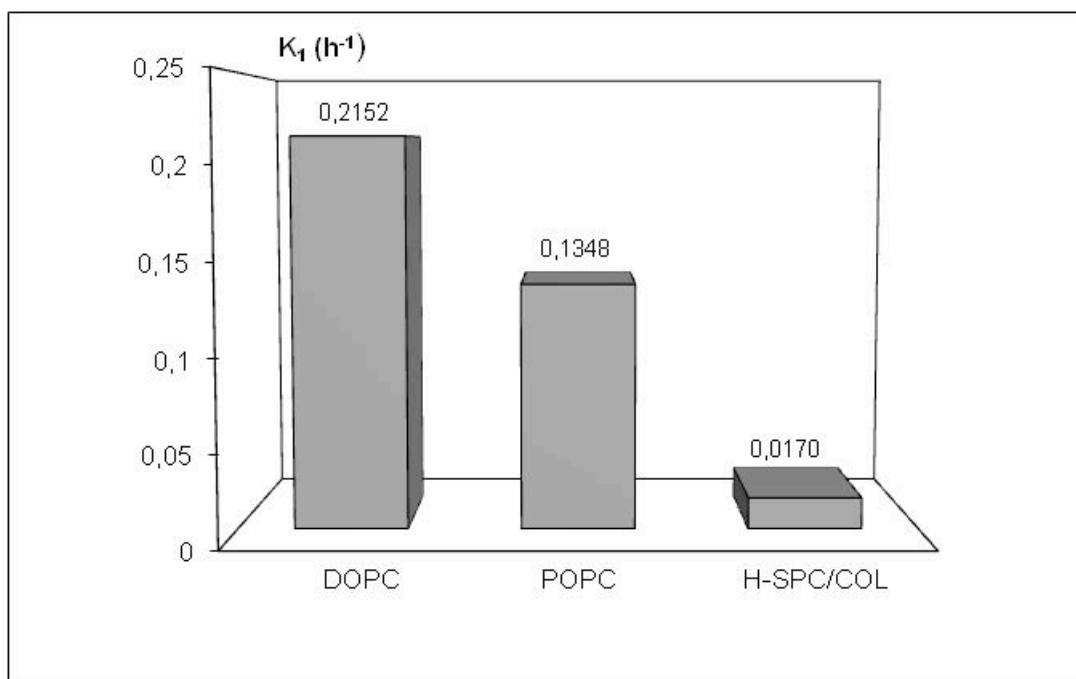


Fig. 48. Constante de velocidad de salida del ACV encapsulado en liposomas LUV.

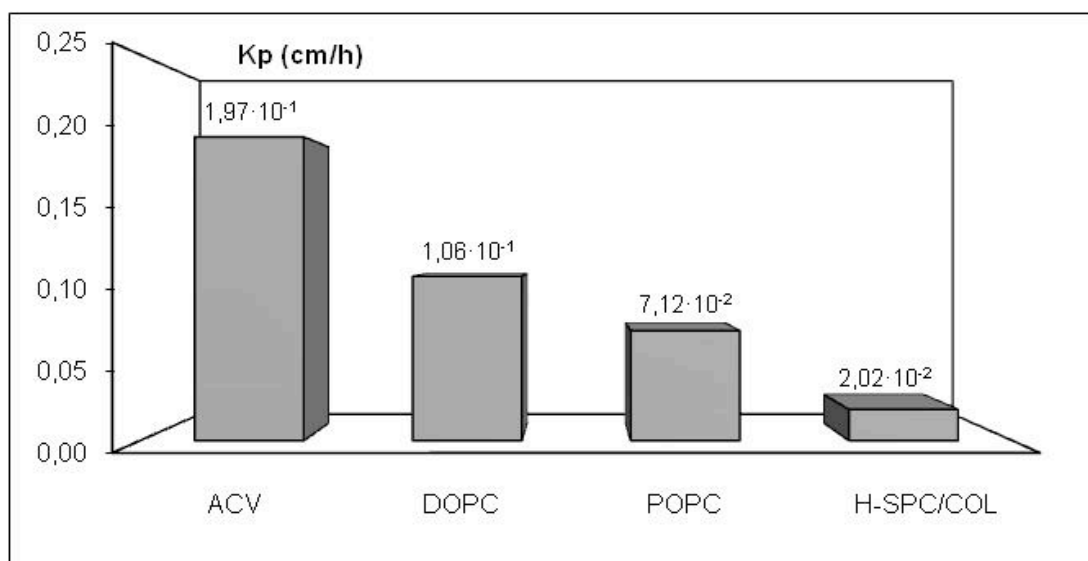


Fig. 49. Dato calculado del coeficiente de permeabilidad del ACV a través de una membrana de acetato de celulosa partir de una solución de principio activo y liposomas LUV.

Se observó en los ensayos realizados, que los porcentajes de cesión del ACV a un determinado tiempo (8h) fueron mayores para la DOPC (81,7%) seguido de la POPC (65,2%), en relación con la H-SPC/COL (12,95%). Los datos obtenidos de K_1 indicaron una mayor velocidad de salida del ACV de la bicapa lipídica de DOPC ($0,2152 h^{-1}$) frente a la POPC ($0,1348 h^{-1}$), siendo ambas bicapas fluidas a la temperatura experimental de trabajo ($32^{\circ}C$). Dicho comportamiento coincidió con el observado en los ensayos previos

realizados con el principio activo 5(6)CFNa. Por otra parte, el menor valor obtenido de K_1 para el principio activo ACV a través de la bicapa constituida por H-SPC/COL ($0,017 \text{ h}^{-1}$) reflejó el carácter rígido de dicha bicapa lipídica a 32°C .

Asimismo, al comparar los valores de K_p estimados para la DOPC ($1,06 \cdot 10^{-1} \text{ cm/h}$), POPC ($7,12 \cdot 10^{-2} \text{ cm/h}$), y H-SPC/COL ($2,02 \cdot 10^{-2} \text{ cm/h}$), se corroboró que entre las bicapas lipídicas estudiadas, las más permeables al ACV fueron aquellas fluidas a 32°C , siendo la K_p resultante para la DOPC de un orden de magnitud superior respecto a la POPC. El valor obtenido de K_p para el ACV fue menor en las formulaciones liposómicas que con la solución de ACV (**Fig. 49**). De este modo, se confirmó que la difusión de la molécula a través de la bicapa lipídica es la etapa limitante del proceso.

A modo de resumen:

- Las bicapas lipídicas fluidas DOPC y POPC presentan una permeabilidad mayor a la difusión del ACV encapsulado que la bicapa lipídica H-SPC/COL, de menor fluidez a la temperatura experimental de 32°C , siendo dicha permeabilidad superior para la DOPC respecto a la POPC.

IV.3.

DIFUSIÓN DE ACICLOVIR EN GELES A TRAVÉS DE MEMBRANAS HIDRÓFILAS

IV.3.1.

Influencia de la viscosidad del gel

Con objeto de preparar una formulación liposómica de ACV para administración tópica de consistencia adecuada, en el desarrollo de esta memoria de tesis se utilizó el gel Carbopo®-980 como agente gelificante. Previo a la incorporación del gel a la suspensión liposómica, se realizaron ensayos de difusión a partir de geles de ACV preparados con proporciones crecientes de agente gelificante (Carbopol®-980) (0,5%, 1%, 1,5%), según se detalla en apartado **III.4.3.2.1**, con el fin de investigar la influencia de la viscosidad del gel frente a la difusión del ACV, y seleccionar aquella concentración de agente gelificante que ofreciera menor resistencia a la difusión del principio activo en la posterior preparación de un gel liposómico. Para dicha selección se evaluaron los perfiles de cesión del ACV obtenidos a través de la membrana de acetato de celulosa para cada concentración de agente gelificante ensayada y el coeficiente de permeabilidad (K_p) calculado engloba en el presente estudio la difusión del ACV a través del gel, y a través de la membrana hidrófila. Los resultados a partir de los geles se compararon con los datos obtenidos en un ensayo de difusión de ACV en solución realizado con el mismo tipo de membrana de difusión.

Descripción de ensayos

- Difusión de ACV en solución
- Difusión de ACV en gel con 0,5% de Carbopol®-980
- Difusión de ACV en gel con 1% de Carbopol®-980
- Difusión de ACV en gel con 1,5% de Carbopol®-980

DIFUSIÓN DE ACV EN SOLUCION

Variables experimentales

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de acetato de celulosa
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: solución de ACV en solución amortiguadora HEPES (20 mOsm Kg⁻¹, pH 7, 4)
- Concentración de principio activo en formulación donadora (C₀): 2.153 µg/mL
- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,970 ± 0,025 g
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q₀): 2.089,4 ± 54,15µg
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana):32°C
- Solución receptora: solución amortiguadora HEPES (20 mOsm Kg⁻¹ pH 7,4)
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 2 mL/h
- Duración del ensayo: 24h
- Tiempo recogida receptores (t): Cada media hora (hasta 2 h), cada hora (de 2h a 6h), cada 2 horas (de 6 a 14h), cada 4h (de 14 a 22h), finalizando el ensayo a las 24h.
- Número de celdas por ensayo (n): 3
- N° de ensayos por formulación: 1 (Total: n= 3 celdas)

Los resultados obtenidos de la concentración (C_{rec}) y cantidad acumulada (Q_{rec}) del ACV difundido a través de la membrana de acetato de celulosa a compartimento receptor en cada tiempo de muestreo se recogen en la **Tabla 37**.

t (h)	C _{rec} (µg/mL)	Q _{rec} (µg)
0	0,000 ± 0,000	0,000± 0,000
0,5	92,739 ± 3,779	92,740 ± 3,779
1	172,142 ± 21,948	264,881± 25,727
1,5	154,133 ± 1,460	419,014 ± 24,267
2	140,027 ± 23,126	559,041 ± 47,392
3	125,566 ± 10,011	810,173 ± 67,414
4	116,091 ± 15,407	1042,355 ± 98,229
5	79,866 ± 6,870	1202,087 ± 84,488
6	71,382 ± 13,986	1344,850 ± 56,516
8	54,169 ± 0,662	1561,524 ± 53,866
10	36,550 ± 2,343	1707,723± 63,239
12	22,414 ± 0,926	1797,378 ± 66,944
14	14,077 ± 1,172	1853,686 ± 71,631
18	7,107 ± 2,638	1910,540 ± 92,734
22	4,070 ± 0,370	1943,101± 89,776
24	2,475 ± 0,499	1953,001 ± 87,781

Tabla 37. Valores resultantes en el ensayo realizado a cada tiempo de muestreo. Valores medios ± desv. est.

Los datos resultantes de flujo aparante (J_{ap}) se calcularon mediante la **Ec.13**, y se realizó un ajuste matemático no lineal de un modelo biexponencial (Ec. 31) al perfil experimental obtenido de flujo aparante (J_{ap}) frente al tiempo. Los parámetros calculados al estimar el mejor ajuste no lineal se indican en la **Tabla 38**. Se obtuvo un perfil de flujo adecuado según el empleo de dosis finitas, tal y como puede observarse en la **Fig. 50**.

Parámetro	Valor	Error estándar
B (µg)	538,2	30,5
V₁ (h⁻¹)	0,1937	0,0171
V₂ (h⁻¹)	4,64	1,37

Tabla 38. Parámetros estimados en el ajuste matemático no lineal realizado en el cálculo de J_{ap} .

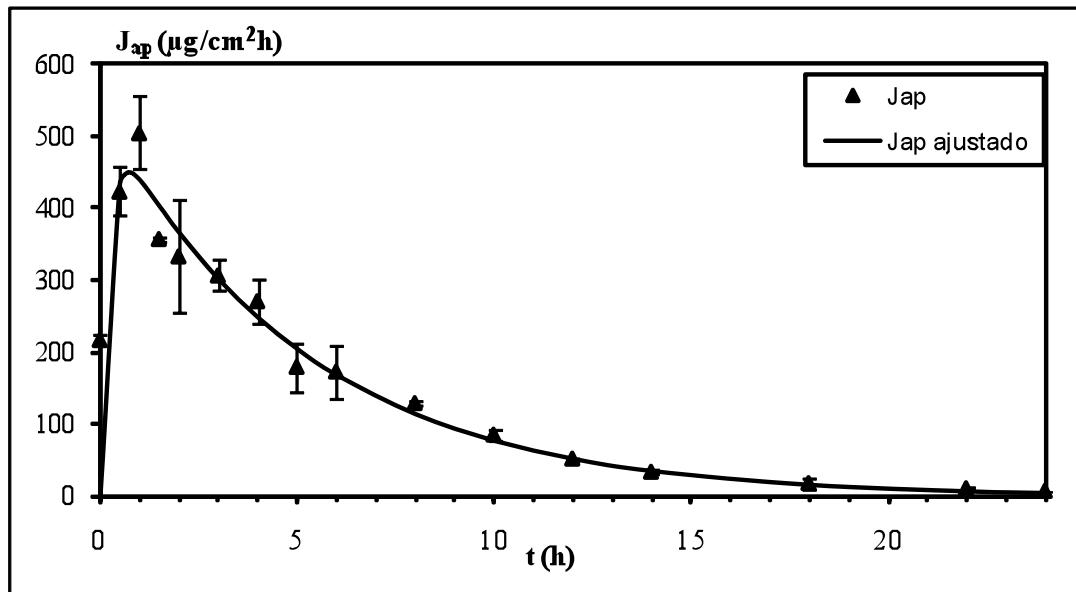


Fig. 50. Evolución del flujo aparente frente al tiempo del ACV a través de una membrana de acetato de celulosa obtenido a partir de una solución del principio activo.

Una vez estimada la ecuación de $J_{ap \text{ ajustado}}$ se determinó el tiempo necesario para alcanzar el flujo máximo (t_{jmax}), y el valor del flujo máximo (J_{max}), a partir del cual se calculó el coeficiente de permeabilidad (K_p) (Ec. 32). Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 39**.

t_{jmax} (h)	J_{max} (µg/cm²h)	K_p (cm/h)
0,715	449,03	$2,09 \cdot 10^{-1}$

Tabla 39. Parámetros calculados en la determinación del coeficiente de permeabilidad.

Nótese que a pesar de las diferencias de concentración, etc, nos da un K_p similar que en ensayo anterior de ACV en solución (**Tabla 23**).

DIFUSION DE ACV EN GEL CON 0,5 % DE CARBOPOL® 980

Variables experimentales

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de acetato de celulosa
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: Gel de ACV con una concentración de agente gelificante (Carbopol®-980) del 0,5%
- Concentración de principio activo en formulación donadora (C_0): 1820 $\mu\text{g/mL}$
- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): 1,042 \pm 0,068 g
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 1896,08 \pm 124,32 μg
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32°C
- Solución receptora: solución amortiguadora HEPES (20 mOsm Kg^{-1} pH 7,4)
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 2 mL/h
- Duración del ensayo: 24h
- Tiempo recogida receptores (t): Cada media hora (hasta 2 h), cada hora (de 2h a 6h), cada 2 horas (de 6 a 14h), cada 4h (de 14 a 22h), finalizando el ensayo a las 24h.
- Número de celdas por ensayo (n): 3
- N° de ensayos por formulación: 1 (Total: n= 3 celdas)

Los resultados obtenidos de la concentración (C_{rec}) y cantidad acumulada (Q_{rec}) del ACV difundido a través de la membrana de acetato de celulosa a compartimento receptor en cada tiempo de muestreo se recogen en la **Tabla 40**.

t (h)	C _{rec} (µg/mL)	Q _{rec} (µg)
0	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
0,5	72,599 ± 4,198	72,599 ± 4,198
1	98,953 ± 9,696	171,551 ± 13,894
1,5	74,842 ± 7,063	246,393 ± 20,957
2	69,050 ± 0,992	315,443 ± 21,949
3	70,857 ± 1,086	457,157 ± 24,120
4	42,909 ± 2,893	542,975 ± 29,906
5	35,428 ± 2,796	613,831 ± 35,498
6	31,879 ± 1,488	677,590 ± 38,474
8	27,283 ± 2,393	786,724 ± 48,046
10	24,848 ± 2,369	886,115 ± 57,521
12	23,327 ± 2,218	979,422 ± 66,395
14	21,242 ± 3,066	1064,390 ± 78,659
18	18,672 ± 3,622	1213,768 ± 107,634
22	16,288 ± 4,576	1344,069 ± 144,241
24	14,547 ± 5,278	1402,258 ± 165,354

Tabla 40. Valores resultantes en el ensayo realizado a cada tiempo de muestreo. Valores medios ± desv. est

Los datos resultantes de flujo aparante (J_{ap}) se calcularon mediante la **Ec.13**, y se realizó un ajuste matemático no lineal de un modelo biexponencial (**Ec. 31**) al perfil experimental obtenido de flujo aparante (J_{ap}) frente al tiempo. Los parámetros calculados al estimar el mejor ajuste no lineal se indican en la **Tabla 41**. Se obtuvo un perfil de flujo adecuado según el empleo de dosis finitas, tal y como puede observarse en la **Fig. 51**.

Parámetro	Valor	Error estándar
B (µg)	275,2	52,7
V₁ (h⁻¹)	0,1896	0,0693
V₂ (h⁻¹)	2837,0	0,0

Tabla 41. Parámetros estimados en el ajuste matemático no lineal realizado en el cálculo de J_{ap} .

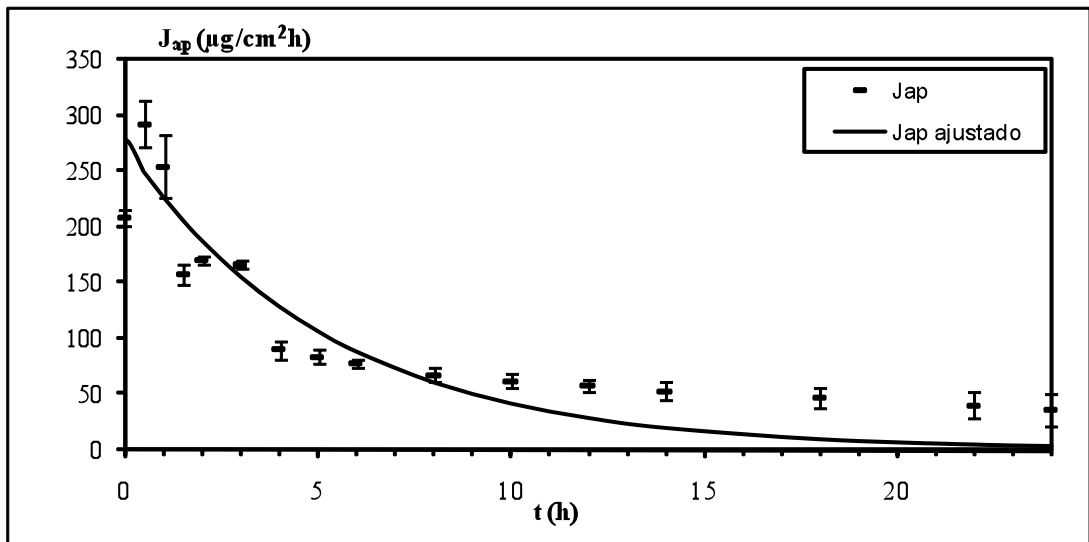


Fig. 51. Evolución del flujo aparente frente al tiempo del ACV a través de una membrana de acetato de celulosa obtenido a partir de un Gel de ACV con 0,5% de Carbopol® 980.

Una vez estimada la ecuación de J_{ap} ajustado se determinó el tiempo necesario para alcanzar el flujo máximo (t_{jmax}), y el valor del flujo máximo (J_{max}), a partir del cual se calculó el coeficiente de permeabilidad (Kp) (**Ec. 32**). Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 42**.

t_{jmax} (h)	J_{max} (µg/cm ² h)	Kp (cm/h)
0,0034	275,01	$1,51 \cdot 10^{-1}$

Tabla 42. Parámetros calculados en la determinación del coeficiente de permeabilidad.

DIFUSION DE ACV EN GEL CON 1 % DE CARBOPOL® 980

Variables experimentales

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de acetato de celulosa
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: Gel de ACV con una concentración de agente gelificante (Carbopol®-980) del 1 %
- Concentración de partida del principio activo (C_0): 1680 μ g/mL
- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): 1,050 \pm 0,025g
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 1763,16 \pm 42,29 μ g
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana):32°C
- Solución receptora: solución amortiguadora HEPES (20 mOsm Kg⁻¹ pH 7,4)
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 2 mL/h
- Duración del ensayo: 24h
- Tiempo recogida receptores (t): Cada media hora (hasta 2 h), cada hora (de 2h a 6h), cada 2 horas (de 6 a 14h), cada 4h (de 14 a 22h), finalizando el ensayo a las 24h.
- Número de celdas por ensayo (n): 3
- N° de ensayos por formulación: 1 (Total: n= 3 celdas)

Los resultados obtenidos de la concentración (C_{rec}) y cantidad acumulada (Q_{rec}) del ACV difundido a través de la membrana de acetato de celulosa a compartimento receptor en cada tiempo de muestreo se recogen en la **Tabla 43**.

t (h)	C _{rec} (µg/mL)	Q _{rec} (µg)
0	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
0,5	62,073 ± 2,296	62,073 ± 2,296
1	87,198 ± 0,965	149,271 ± 1,331
1,5	69,242 ± 2,907	218,513 ± 1,576
2	55,923 ± 7,817	274,436 ± 9,393
3	43,296 ± 2,199	361,028 ± 13,790
4	33,571 ± 1,246	428,169 ± 16,282
5	28,172 ± 0,647	484,514 ± 17,577
6	24,769 ± 0,867	534,053 ± 19,311
8	25,396 ± 0,879	635,638 ± 22,829
10	21,708 ± 0,415	722,472 ± 24,490
12	19,277 ± 0,299	799,580 ± 25,687
14	17,835 ± 0,373	870,919 ± 27,178
18	15,917 ± 1,105	998,257 ± 36,021
22	13,944 ± 0,342	1109,807 ± 38,757
24	12,074 ± 0,763	1158,102 ± 41,811

Tabla 43. Valores resultantes en el ensayo realizado a cada tiempo de muestreo. Valores medios ± desv. est.

Los datos resultantes de flujo aparente (J_{ap}) se calcularon mediante la **Ec.13**, y se realizó un ajuste matemático no lineal de un modelo biexponencial (**Ec. 31**) al perfil experimental obtenido de flujo aparente (J_{ap}) frente al tiempo. Los parámetros calculados al estimar el mejor ajuste no lineal se indican en la **Tabla 44**. Se obtuvo un perfil de flujo adecuado según el empleo de dosis finitas, tal y como puede observarse en la **Fig. 52**.

Parámetro	Valor	Error estándar
B (µg)	245,8	50,2
V₁ (h⁻¹)	0,2290	0,0854
V₂ (h⁻¹)	1253,0	0,00

Tabla 44. Parámetros estimados en el ajuste matemático no lineal realizado en el cálculo de J_{ap} .

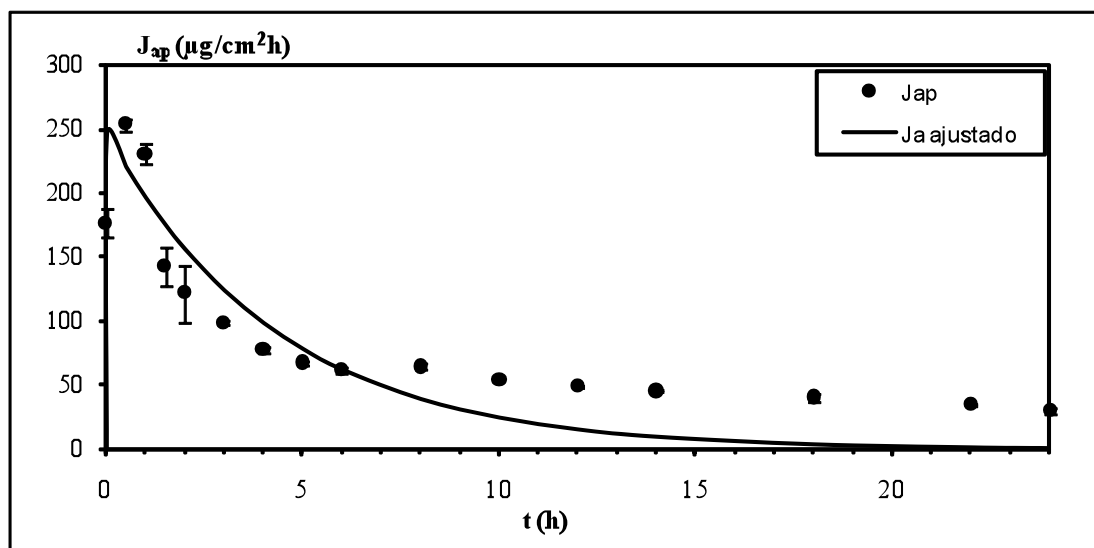


Fig. 52. Evolución del flujo aparente frente al tiempo del ACV a través de una membrana de acetato de celulosa, obtenido a partir de un Gel de ACV con 1 % de Carbopol® 980.

Una vez estimada la ecuación de J_{ap} ajustado se determinó el tiempo necesario para alcanzar el flujo máximo (t_{jmax}), y el valor del flujo máximo (J_{max}), a partir del cual se calculó el coeficiente de permeabilidad (Kp) (Ec. 32). Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 45**.

t_{jmax} (h)	J_{max} (µg/cm²h)	Kp (cm/h)
0,0069	245,37	$1,46 \cdot 10^{-1}$

Tabla 45. Parámetros calculados en la determinación del coeficiente de permeabilidad.

DIFUSION DE ACV EN GEL CON 1,5 % DE DE CARBOPOL® 980

Variables experimentales

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de acetato de celulosa
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: Gel de ACV con una concentración de agente gelificante (Carbopol®-980) del 1,5 %
- Concentración de partida del principio activo (C_0): 1860 $\mu\text{g/mL}$
- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): $1,0360 \pm 0,0313$ g
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): $1926,87 \pm 58,26$ μg
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32°C
- Solución receptora: solución amortiguadora HEPES (20 mOsm Kg^{-1} pH 7,4)
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 2 mL/h
- Duración del ensayo: 24h
- Tiempo recogida receptores (t): Cada media hora (hasta 2 h), cada hora (de 2h a 6h), cada 2 horas (de 6 a 14h), cada 4h (de 14 a 22h), finalizando el ensayo a las 24h.
- Número de celdas por ensayo (n): 3
- N° de ensayos por formulación: 1 (Total: $n= 3$ celdas)

Los resultados obtenidos de la concentración (C_{rec}) y cantidad acumulada (Q_{rec}) del ACV difundido a través de la membrana de acetato de celulosa a compartimento receptor en cada tiempo de muestreo se recogen en la **Tabla 46**.

t (h)	C _{rec} (µg/mL)	Q _{rec} (µg)
0	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
0,5	51,207 ± 0,269	51,207 ± 0,269
1	82,802 ± 7,866	134,009 ± 8,135
1,5	60,933 ± 5,741	194,942 ± 13,876
2	50,940 ± 2,797	245,882 ± 16,673
3	39,254 ± 3,249	324,389 ± 23,171
4	31,990 ± 3,554	388,369 ± 30,280
5	26,998 ± 0,672	442,365 ± 31,624
6	22,930 ± 1,075	488,224 ± 33,774
8	23,272 ± 1,417	581,311 ± 39,441
10	19,165 ± 0,910	657,970 ± 43,081
12	17,040 ± 0,824	726,131 ± 46,379
14	15,809 ± 0,037	789,368 ± 46,526
18	14,129 ± 1,704	902,403 ± 60,157
22	12,311 ± 1,808	1000,893 ± 74,619
24	11,180 ± 1,600	1045,612 ± 81,020

Tabla 46. Valores resultantes en el ensayo realizado a cada tiempo de muestreo. Valores medios ± desv. est.

Los datos resultantes de flujo aparante (J_{ap}) se calcularon mediante la **Ec.13**, y se realizó un ajuste matemático no lineal de un modelo biexponencial (Ec. 31) al perfil experimental obtenido de flujo aparante (J_{ap}) frente al tiempo. Los parámetros calculados al estimar el mejor ajuste no lineal se indican en la **Tabla 47**. Se obtuvo un perfil de flujo adecuado según el empleo de dosis finitas, tal y como puede observarse en la **Fig. 53**.

Parámetro	Valor	Error estándar
B (µg)	218,5	39,6
V₁ (h⁻¹)	0,2170	0,0730
V₂ (h⁻¹)	57,0	0,0

Tabla 47. Parámetros estimados en el ajuste matemático no lineal realizado en el cálculo de J_{ap} .

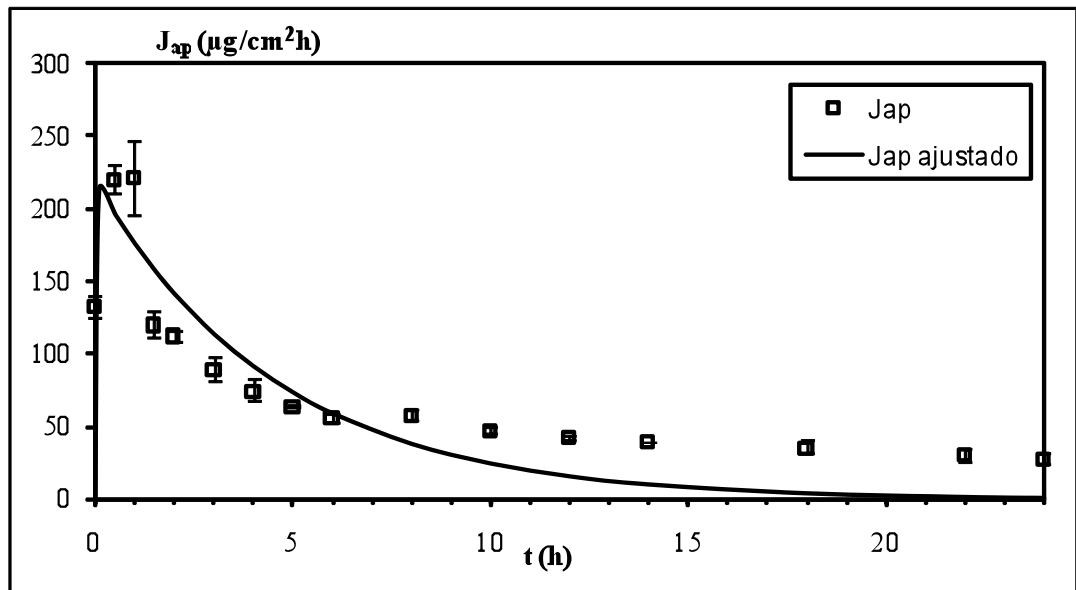


Fig. 53. Evolución del flujo aparente frente al tiempo del ACV a través de la membrana de acetato de celulosa obtenido a partir de un Gel de ACV con 1,5% de Carbopol® 980.

Una vez estimada la ecuación de J_{ap} ajustado se determinó el tiempo necesario para alcanzar el flujo máximo (t_{jmax}), y el valor del flujo máximo (J_{max}), a partir del cual se calculó el coeficiente de permeabilidad (Kp) (Ec. 32). Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 48**.

t_{jmax} (h)	J_{max} (µg/cm ² h)	Kp (cm/h)
0,0980	213,08	$1,15 \cdot 10^{-1}$

Tabla 48. Parámetros calculados en la determinación del coeficiente de permeabilidad.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE DATOS

La recuperación obtenida en cada ensayo expresado como porcentaje de recuperación total de principio activo en las diferentes muestras obtenidas (muestras de fluido receptor, y remanente en compartimento donador) en función de la cantidad dispuesta inicialmente se recoge en la **Tabla 49**.

Formulación	Recuperación %
Solución ACV	93,52 ± 1,85
Gel ACV 0,5%	101,93 ± 3,69
Gel ACV 1%	101,38 ± 0,01
Gel ACV 1,5%	90,47 ± 5,02

Tabla 49. % de recuperación del ACV respecto a la cantidad dispuesta en el compartimento donador, en los ensayos realizados a través de membranas de acetato de celulosa.

Los elevadas recuperaciones obtenidas en los ensayos realizados reflejaron un adecuado tratamiento y análisis de las muestras, así como, la obtención de unos resultados fidedignos.

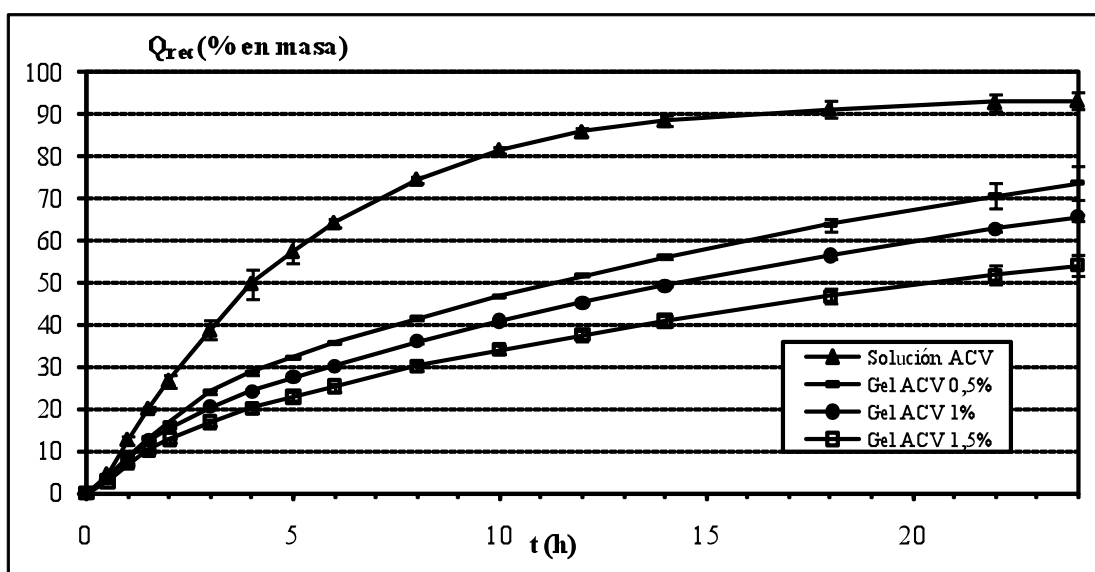


Fig. 54. Perfiles de cesión en porcentaje frente al tiempo del ACV difundido a través de una membrana de acetato de celulosa obtenidos a partir una solución de principio activo y de geles de ACV con diferente proporción de agente gelificante.

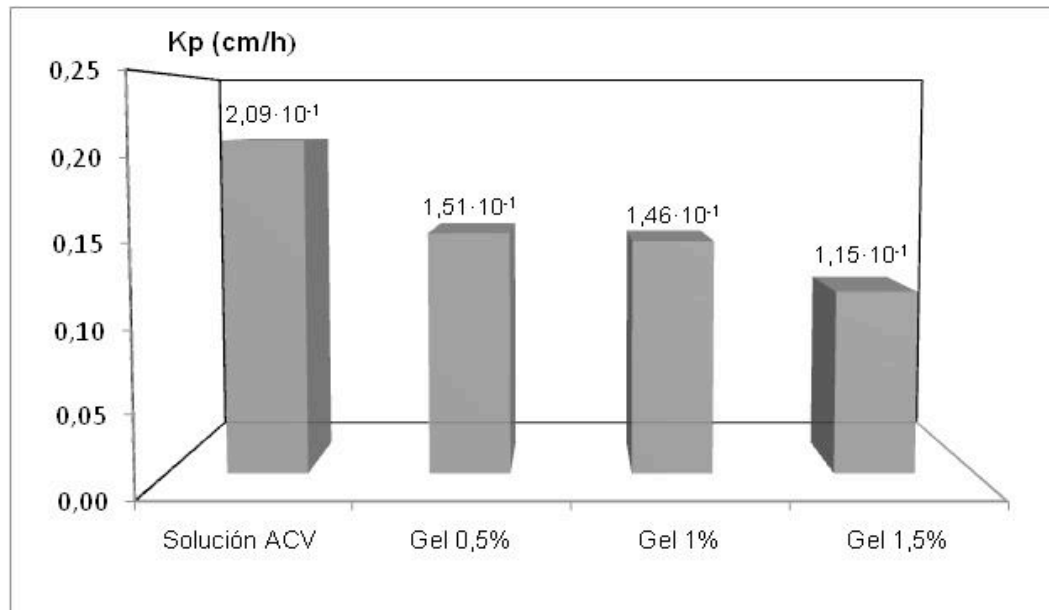


Fig. 55. Dato calculado del coeficiente de permeabilidad del ACV a través de una membrana de acetato de celulosa a partir de una solución de principio activo y de geles de ACV con diferente proporción de agente gelificante.

Los datos obtenidos de los perfiles de cesión de principio activo (Q_{rec} (%)) (**Fig. 54**) a través de la membrana hidrófila, significativamente superiores para una solución de ACV frente a geles de ACV, demuestran la barrera que ejerce la incorporación del gel carbopol a la difusión del ACV. Por otra parte, entre geles de ACV (0,5%, 1%, 1,5%) se observó una disminución significativa de la cantidad de ACV difundida al aumentar la proporción de agente gelificante desde los primeros tiempos del ensayo. Así como, el coeficiente de permeabilidad (K_p) estimado (**Fig. 55**) en geles de ACV disminuyó frente a la solución de ACV y al aumentar el la proporción de agente gelificante.

No obstante, cabe destacar que los valores determinados del coeficiente de permeabilidad (K_p) a partir de geles de ACV, fueron del mismo orden de magnitud que el observado con la solución de ACV. Dichos resultados indicarían, al igual que otros autores (Mourtas, S., *et al.*, 2007), una fácil difusión de principios activos a través de este tipo de gel. Esta característica beneficia el desarrollo de la formulación liposómica tópica de ACV donde se busca dar una consistencia adecuada a través de la incorporación de un gel que no dificulte la difusión del principio activo.

A modo de resumen:

- El gel Carbopol®- (980) a las concentraciones de 0,5, 1 y 1,5% (p/p), constituye una barrera significativa a la difusión del ACV. El aumento de la viscosidad en el gel propiciado por el aumento de la proporción de polímero gelificante ralentiza la difusión del ACV a través de dicha estructura polimérica.
- Se selecciona en el desarrollo de una formulación liposómica de aplicación tópica entre las concentraciones de agente gelificante estudiadas 0,5, 1 y 1,5% (p/p), la menor concentración de gel Carbopol®- (980) (0,5%), que confiere una consistencia adecuada a la formulación y permite la difusión de principio activo ACV a través de su estructura.

IV.3.2.

Estudios de difusión de aciclovir en geles liposómicos con ACV encapsulado y libre

La siguiente batería de ensayos de difusión *in vitro* a través de una membrana de acetato de celulosa se realizó utilizando geles liposómicos, con el objeto de conocer el comportamiento de la difusión del principio activo ACV en este tipo de sistema cuya consistencia facilita la aplicación cutánea. Para la preparación de dicho gel, se seleccionaron bicapas lipídicas fluidas (DOPC y POPC) en las que se ha determinado la permeabilidad que presentan a la difusión del ACV (ver **IV.2.2.**), y aquella concentración de agente gelificante (0,5%) que menor dificultad ofrecía a la difusión del principio activo en estudio (ver **IV.3.1**). Se prepararon mediante dispersión mecánica suspensiones de liposomas de tamaño LUV con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión, y se incorporaron al gel de Carbopol® según descrito en apartado **III.3.2.3**. Los parámetros calculados en este estudio fueron la constante que engloba la difusión del principio activo a través de la bicapa lipídica y la estructura de gel, y el coeficiente de permeabilidad (K_p) del ACV que refleja el proceso total de salida del ACV de liposoma, y su difusión a través del gel y membrana hidrófila.

Descripción de ensayos

- Difusión de ACV encapsulado y libre en liposomas LUV- DOPC formulados como gel.
- Difusión de ACV encapsulado y libre en liposomas LUV- POPC formulados como gel.

Caracterización fisicoquímica de los liposomas

Composición	Tipo	Lípido (M)	Z-ave (nm)	I.P	ζ (mv)
POPC	LUV	0,022	141,2 ± 2	0,220 ± 0,023	- 3,5 ± 1,4
DOPC	LUV	0,058	128,6 ± 4	0,169 ± 0,034	- 4,3 ± 1,9

Tabla 50. Parámetros fisicoquímicos determinados a partir de las suspensiones de liposomas LUV con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión para incorporar en geles. Valores medios ± desv.est. de tres determinaciones.

Las condiciones de preparación de las formulaciones de estudio se detallan en el apartado **III.4.3.2.2**.

DIFUSIÓN DE ACV ENCAPSULADO Y LIBRE EN LIPOSOMAS LUV-DOPC FORMULADOS COMO GEL

Variables experimentales

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de acetato de celulosa
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: Gel liposómico LUV de DOPC con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión con una concentración de agente gelificante (Carbopol®-980) del 0,5%
- Concentración de principio activo en formulación donadora (C_0): 4.100 $\mu\text{g/mL}$
- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): $0,903 \pm 0,029$ g
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): $3.703,45 \pm 117,76$ μg
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32°C
- Solución receptora: solución amortiguadora HEPES (20 mOsm Kg^{-1} pH 7,4)
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 2 mL/h
- Duración del ensayo: 24h
- Tiempo recogida receptores (t): Cada media hora (hasta 2 h), cada hora (de 2h a 6h), cada 2 horas (de 6 a 14h), cada 4h (de 14 a 22h), finalizando el ensayo a las 24h.
- Número de celdas por ensayo (n): 3
- N° de ensayos por formulación: 1 (Total: n= 3 celdas)

El criterio de selección de Q_m (1g aprox) y el F_{rec} fue el mismo que en los ensayos realizados con geles de ACV.

Los resultados obtenidos de la concentración (C_{rec}) y cantidad acumulada (Q_{rec}) del ACV difundido a través de la membrana de acetato de celulosa a compartimento receptor en cada tiempo de muestreo se recogen en la **Tabla 51**.

t (h)	C _{rec} (µg/mL)	Q _{rec} (µg)
0	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
0,5	72,319 ± 5,398	72,319 ± 5,398
1	111,807 ± 12,857	184,126 ± 7,459
1,5	84,958 ± 2,221	269,084 ± 5,239
2	64,181 ± 0,589	333,265 ± 5,827
3	64,164 ± 11,287	461,593 ± 16,746
4	43,769 ± 7,987	549,131 ± 0,773
5	41,193 ± 0,221	631,516 ± 0,331
6	41,470 ± 6,330	714,457 ± 12,992
8	30,696 ± 0,564	837,240 ± 15,250
10	26,280 ± 1,239	942,361 ± 10,293
12	22,125 ± 1,006	1030,860 ± 6,269
14	19,063 ± 0,626	1107,111 ± 8,772
18	15,445 ± 1,227	1230,672 ± 18,587
22	15,700 ± 3,256	1356,273 ± 7,461
24	11,966 ± 5,115	1404,135 ± 27,920

Tabla 51. Valores resultantes en el ensayo realizado a cada tiempo de muestreo. Valores medios ± desv. est.

En el estudio actual el principio activo se encuentra tanto dentro como fuera de los liposomas, por lo que el primer paso del proceso no lo constituye solo la salida del aciclovir del liposoma, sino que engloba su migración a través del gel hasta la membrana de difusión. Por ello, en el estudio actual el perfil experimental obtenido de los datos de porcentaje (en masa) del ACV acumulado frente al tiempo se ajustó a un modelo biexponencial (Ec. 33). En la **Tabla 52** se indican las constantes resultantes siendo la constante $K_{\text{mayoritaria}}$ que engloba la difusión del principio activo a través de la bicapa lipídica y la estructura de gel, la constante limitante del proceso de difusión.

$K_{\text{mayoritaria}} (h^{-1})$	$K_{\text{minoritaria}} (h^{-1})$	r^2
0,0472 ± 0,0090	0,3329 ± 0,0502	0,999

Tabla 52. Constantes de difusión obtenidas en el ajuste matemático a un modelo biexponencial del perfil de porcentaje acumulado de ACV frente al tiempo. Valores medios ± int. Conf. 95%.

Los datos resultantes de flujo aparente (J_{ap}) se calcularon mediante la **Ec.13**, y se realizó un ajuste matemático no lineal de un modelo biexponencial (Ec. 31) al perfil experimental obtenido de flujo aparente (J_{ap}) frente al tiempo. Los parámetros calculados al estimar el

mejor ajuste no lineal se indican en la **Tabla 53**. Se obtuvo un perfil de flujo adecuado según el empleo de dosis finitas, tal y como puede observarse en la **Fig. 56**.

Parámetro	Valor	Error estándar
B (μg)	290,2	29,3
V ₁ (h^{-1})	0,1926	0,0370
V ₂ (h^{-1})	1791000,0	0,0

Tabla 53. Parámetros estimados en el ajuste matemático no lineal realizado en el cálculo de J_{ap} .

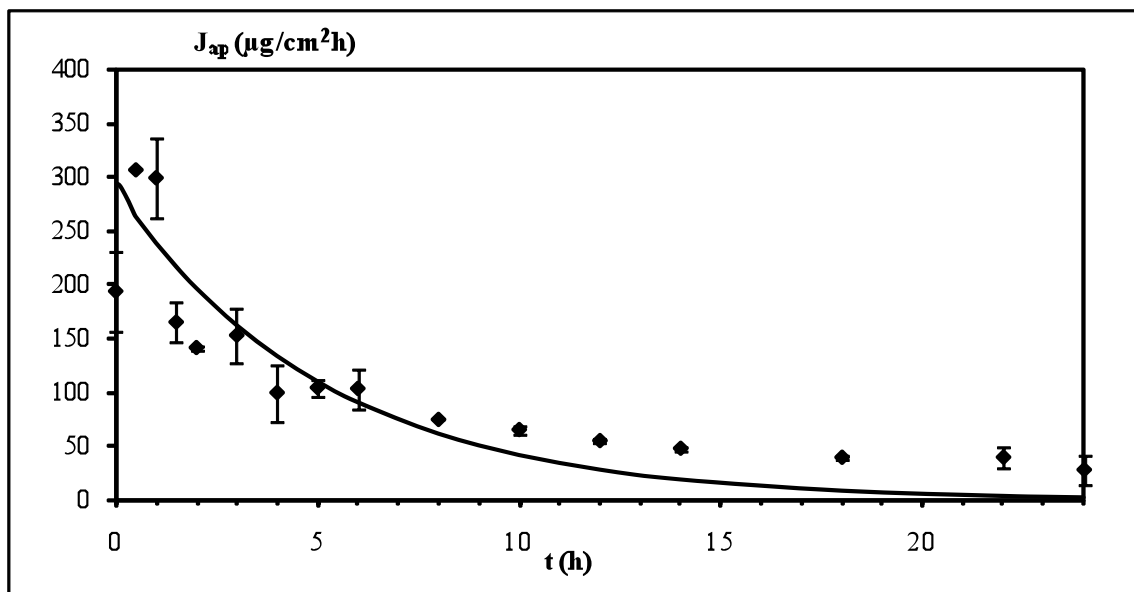


Fig. 56. Evolución del flujo aparente frente al tiempo del ACV a través de una membrana de acetato de celulosa obtenido a partir de un gel liposómico LUV de composición DOPC con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión.

Una vez estimada la ecuación de J_{ap} ajustado se determinó el tiempo necesario para alcanzar el flujo máximo ($t_{j_{\text{max}}}$), y el valor del flujo máximo (J_{max}), a partir del cual se calculó el coeficiente de permeabilidad (K_p) (**Ec. 32**). Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 54**.

$t_{j_{\text{max}}}$ (h)	J_{max} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	K_p (cm/h)
0,00001	290,20	$7,08 \cdot 10^{-2}$

Tabla 54. Parámetros calculados en la determinación del coeficiente de permeabilidad.

**DIFUSIÓN DE ACV ENCAPSULADO Y LIBRE EN LIPOSOMAS LUV-POPC
FORMULADOS COMO GEL**

Variables experimentales

- Membrana de difusión: membrana hidrófila de acetato de celulosa
- Condiciones de oclusión
- Formulación donadora: Gel liposómico LUV de POPC con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión con una concentración de agente gelificante (Carbopol®-980) del 0,5%
- Concentración de principio activo en formulación donadora (C_0): 1730 $\mu\text{g/mL}$
- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): $0,964 \pm 0,042 \text{ g}$
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): $1668,23 \pm 72,09 \mu\text{g}$
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32°C
- Solución receptora: solución amortiguadora HEPES (20 mOsm Kg^{-1} pH 7,4)
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 2 mL/h
- Duración del ensayo: 24h
- Tiempo recogida receptores (t): Cada media hora (hasta 2 h), cada hora (de 2h a 6h), cada 2 horas (de 6 a 14h), cada 4h (de 14 a 22h), finalizando el ensayo a las 24h.
- Número de celdas por ensayo (n): 3
- N° de ensayos por formulación: 3 (Total: n= 3 celdas)

Los resultados obtenidos de la concentración (C_{rec}) y cantidad acumulada (Q_{rec}) del ACV difundido a través de la membrana de acetato de celulosa a compartimento receptor en cada tiempo de muestreo se recogen en la **Tabla 55**.

t (h)	C _{rec} (µg/mL)	Q _{rec} (µg)
0	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000
0,5	25,087 ± 9,194	25,087 ± 9,194
1	45,713 ± 0,327	70,800 ± 8,867
1,5	31,553 ± 1,411	102,353 ± 10,278
2	31,583 ± 6,251	133,936 ± 4,027
3	24,487 ± 0,988	182,910 ± 6,003
4	19,347 ± 2,699	221,604 ± 0,604
5	21,217 ± 0,117	264,038 ± 0,838
6	20,497 ± 2,656	305,031 ± 6,150
8	15,335 ± 1,061	366,370 ± 10,395
10	15,438 ± 2,102	428,120 ± 18,803
12	13,626 ± 2,657	482,625 ± 29,429
14	14,552 ± 0,302	540,834 ± 28,222
18	11,762 ± 1,004	634,933 ± 36,250
22	10,451 ± 0,140	718,538 ± 35,131
24	9,587 ± 0,455	756,887 ± 36,951

Tabla 55. Valores resultantes en el ensayo realizado a cada tiempo de muestreo. Valores medios ± desv. est

En el estudio actual el principio activo se encuentra tanto dentro como fuera de los liposomas, por lo que el primer paso del proceso no lo constituye solo la salida del aciclovir del liposoma, sino que engloba su migración a través del gel hasta la membrana de difusión. El perfil experimental obtenido de los datos de porcentaje (en masa) del ACV acumulado frente al tiempo se ajustó a un modelo biexponencial (**Ec. 33**), en la **Tabla 56** se indican las constantes resultantes siendo la constante $K_{\text{mayoritaria}}$ que engloba la difusión del principio activo a través de la bicapa lipídica y la estructura de gel, la constante limitante del proceso de difusión.

$K_{\text{mayoritaria}} (\text{h}^{-1})$	$K_{\text{minoritaria}} (\text{h}^{-1})$	r^2
0,0350 ± 0,0015	0,5670 ± 0,0252	0,999

Tabla 56. Constantes de difusión obtenidas en el ajuste matemático a un modelo biexponencial del perfil de porcentaje acumulado de ACV frente al tiempo. Valores medios ± int. Conf. 95%.

Los datos resultantes de flujo aparente (J_{ap}) se calcularon mediante la **Ec.13**, y se realizó un ajuste matemático no lineal de un modelo biexponencial (**Ec. 31**) al perfil experimental obtenido de flujo aparente (J_{ap}) frente al tiempo. Los parámetros calculados al estimar el

mejor ajuste no lineal se indican en la **Tabla 57**. Se obtuvo un perfil de flujo adecuado según el empleo de dosis finitas, tal y como puede observarse en la **Fig. 57**.

Parámetro	Valor	Error estándar
B (μg)	98,40	13,8
V ₁ (h^{-1})	0,08249	0,0273
V ₂ (h^{-1})	742200	0,0000

Tabla 57. Parámetros estimados en el ajuste matemático no lineal realizado en el cálculo de J_{ap} .

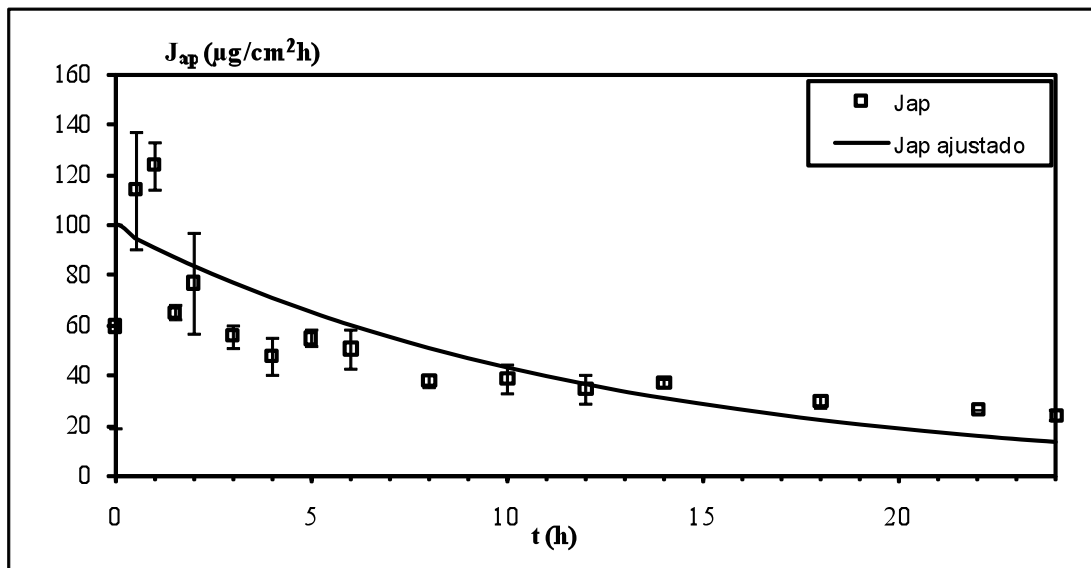


Fig. 57. Evolución del flujo aparente frente al tiempo del ACV a través de una membrana de acetato de celulosa obtenido a partir de un gel liposómico LUV de composición POPC con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión.

Una vez estimada la ecuación de $J_{\text{ap}} \text{ ajustado}$ se determinó el tiempo necesario para alcanzar el flujo máximo ($t_{j_{\text{max}}}$), y el valor del flujo máximo (J_{max}), a partir del cual se calculó el coeficiente de permeabilidad (K_p) (**Ec. 32**). Los valores obtenidos se indican en la **Tabla 58**.

$t_{j_{\text{max}}}$ (h)	J_{max} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)	K_p (cm/h)
0,000022	98,40	$5,69 \cdot 10^{-2}$

Tabla 58. Parámetros calculados en la determinación del coeficiente de permeabilidad.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE DATOS

La recuperación en cada ensayo expresado como porcentaje de recuperación total de principio activo en las diferentes muestras obtenidas (muestras de fluido receptor, y remanente en compartimento donador) en función de la cantidad dispuesta inicialmente se recoge en la **Tabla 59**.

Formulación	Recuperación %
Gel DOPC LUV ACV encaps. + libre	93,15 ± 1,50
Gel POPC LUV ACV encaps. + libre	96,11 ± 0,29

Tabla 59. % de recuperación del ACV respecto a la cantidad dispuesta en el compartimento donador, en los ensayos realizados a través de una membrana de acetato de celulosa.

Las elevadas recuperaciones obtenidas en los ensayos realizados reflejaron un adecuado tratamiento y análisis de las muestras, así como, la obtención de unos resultados fidedignos.

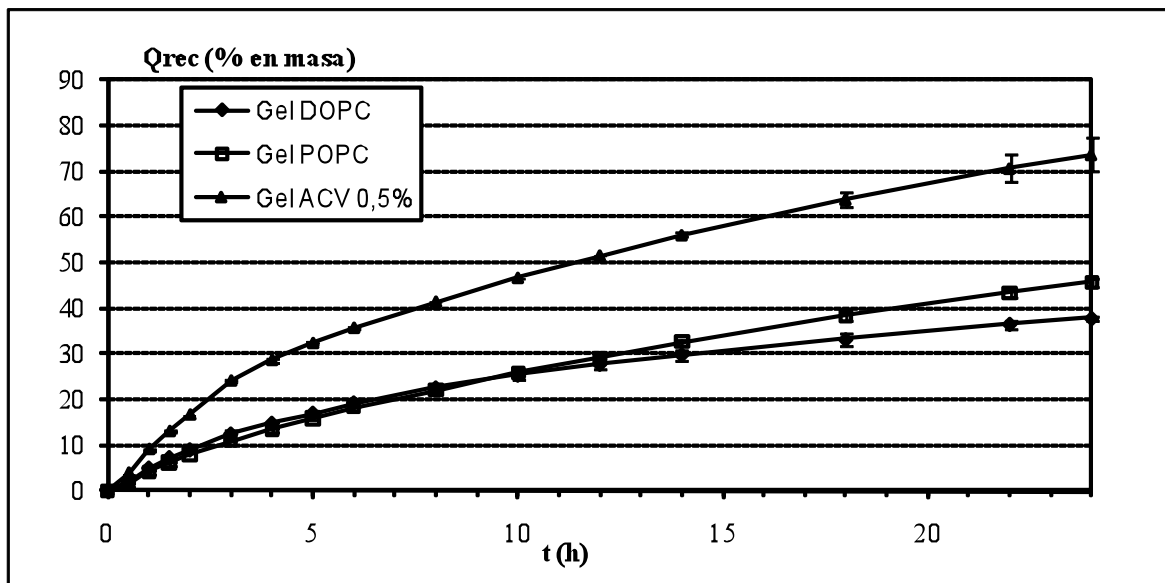


Fig. 58. Perfiles de cesión en porcentaje frente al tiempo del ACV difundido a través de una membrana de acetato de celulosa obtenido a partir de un gel de ACV con 0,5% de agente gelificante y geles liposómicos LUV con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión de composición DOPC y POPC.

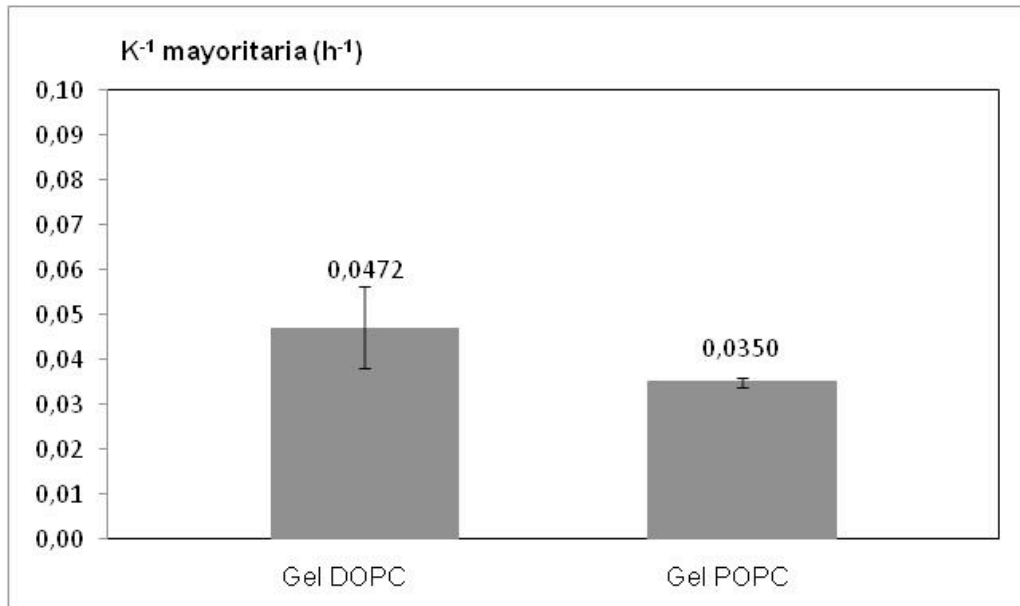


Fig. 59. Dato calculado de la constante de difusión mayoritaria obtenida por ajuste a un modelo biexponencial del perfil de porcentaje acumulado de ACV frente al tiempo. Barras de error: intervalo de confianza ($p=0,05$).

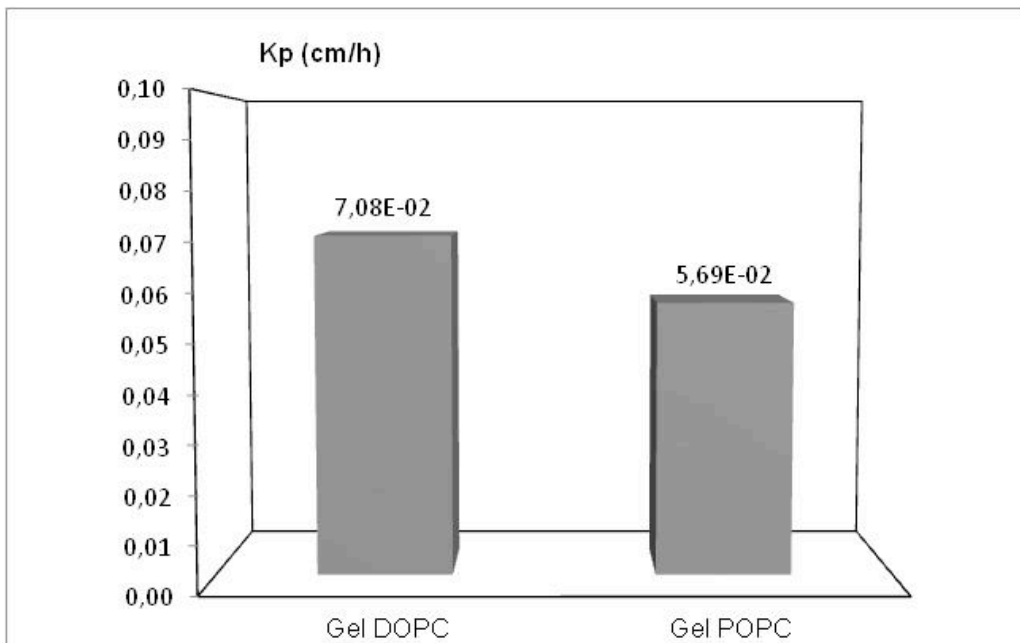


Fig. 60. Dato calculado del coeficiente de permeabilidad del ACV a través de una membrana de acetato de celulosa a partir de geles liposómicos LUV con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión de composición DOPC y POPC.

En la **Fig. 58** se comparan los perfiles de cesión obtenidos a partir de geles liposómicos frente al gel de ACV. Los resultados obtenidos reflejan de una manera clara que la encapsulación del ACV en liposomas resulta en una reducción significativa de la cantidad de principio activo difundida en todos los tiempos de ensayo estudiados. Dichos resultados, al igual que

los obtenidos por otros autores (Mourtas, S., *et al.*, 2007), demostraron la integridad de la membrana del liposoma en formulaciones constituidas por gel Carbopol y la relevancia de la estabilidad del liposoma en la liberación de principios activos encapsulados.

La $K_{\text{mayoritaria}}$ estimada según (Ec. 33) engloba la difusión del principio activo a través de la bicapa lipídica y la estructura de gel, siendo dicho parámetro la constante limitante en el proceso de difusión. El mayor valor obtenido de este parámetro partir de las vesículas de DOPC frente a las de POPC reflejó una mayor difusión del ACV a través de la bicapa lipídica más elástica. Igualmente, el coeficiente de permeabilidad (K_p) determinado fue mayor para el gel liposómico DOPC. Estos datos coincidirían con otros autores que observaron en geles liposómicos un retardo en la salida del principio activo de la vesícula en caso de principios activos hidrófilos al aumentar la rigidez de la membrana del liposoma (Mourtas, S., *et al.*, 2007). Sin embargo, se obtuvo un perfil de cesión en porcentaje (Q_{rec} (%)) (Fig. 58) en los intervalos de tiempo estudiados con ligeras diferencias entre ambos geles liposómicos, siendo los datos mayores para el gel DOPC en los primeros tiempos del ensayo y mayores para el gel POPC en el periodo final del estudio. De los resultados obtenidos se dedujo la complejidad del proceso de difusión del principio activo en los sistemas estudiados.

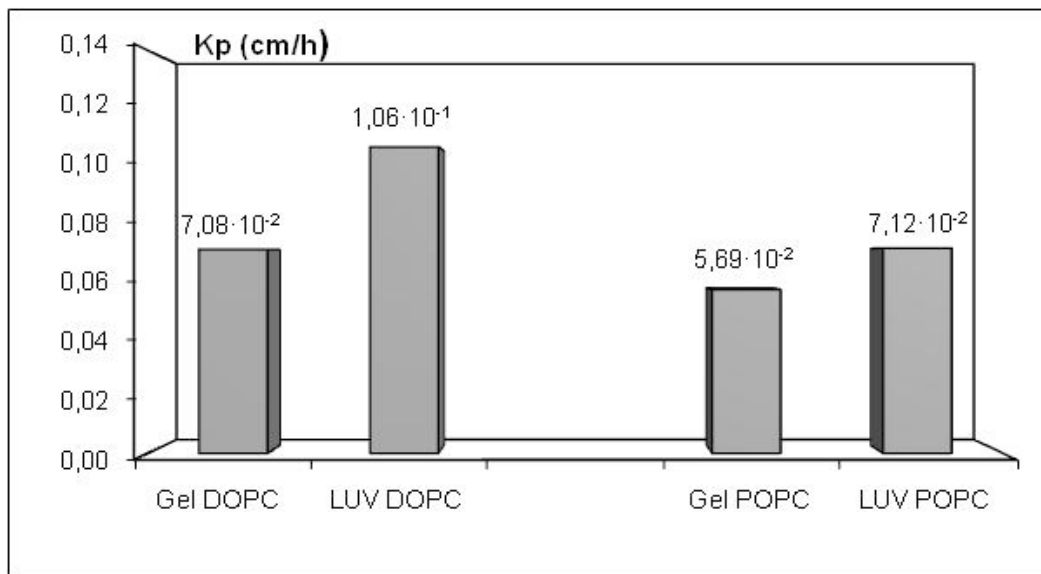


Fig. 61. Dato calculado del coeficiente de permeabilidad del ACV a través de una membrana de acetato de celulosa a partir de liposomas LUV y geles liposómicos LUV con 0,5% de agente gelificante.

Si comparamos el valor de K_p obtenido entre los geles liposómicos con ACV encapsulado y libre, respecto a suspensiones liposómicas constituidos por la misma bicapa lipídica

(obtenidos en estudios anteriores), observamos una cierta barrera a la difusión del principio activo al incorporar la estructura polimérica de modo que, $K_p \text{ Gel DOPC} < K_p \text{ LUV DOPC}$ y $K_p \text{ Gel POPC} < K_p \text{ LUV POPC}$, si bien se debe considerar que se han cuantificado cantidades similares o que presentan el mismo orden de magnitud.

A modo de resumen:

- La incorporación de liposomas DOPC y POPC en geles Carbopol 0,5%, conlleva un retardo en la difusión del ACV, lo que demuestra que existen dos barreras a la difusión del principio activo en este tipo de sistema, la bicapa lipídica y la estructura gel.

IV.4.

ESTUDIOS DE DIFUSIÓN A TRAVÉS DE **MEMBRANAS LIPÓFILAS**

En la memoria de tesis actual, se utilizaron celdas de difusión de flujo continuo, dosis finitas y condiciones no oclusivas en la evaluación de la acumulación de ACV en piel a partir de una formulación. Previo a los estudios de difusión con piel natural, que presentan gran variabilidad, se obtuvieron datos iniciales de acumulación cutánea de ACV en piel a partir de una formulación liposómica utilizando una membrana artificial Prolastic™ de Polidimetilsiloxano, con unas propiedades de lipofilia similares al estrato córneo y unas características definidas, lo que se traduce en un sistema reproducible. Para ello, se prepararon suspensiones de liposomas de tamaño LUV con ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión mediante dispersión mecánica según descrito en apartado III.3.2.1. Se seleccionó para estos estudios la bicapa lipídica de POPC, en estado cristal líquido a la temperatura experimental de trabajo (32°C), cuya permeabilidad al principio activo ACV fue estudiada en ensayos anteriores (IV.2.2). Una vez cortada el área de permeación, el ACV en piel se cuantificó tras su extracción en agua milli-Q a la Tª de 60°C, detallada en apartado III.4.2.4.

3. Los datos cuantificados de ACV en piel a partir de vesículas, se compararon con los resultados obtenidos con la formulación comercial y la solución de principio activo, en ensayos de difusión realizados con el mismo tipo de membrana de difusión.

Descripción de ensayos

- Difusión de liposomas LUV- POPC con ACV encapsulado y libre formulados en suspensión.
- Difusión de ACV en solución.
- Difusión de la formulación comercial.

Caracterización fisicoquímica de los liposomas

Composición	Tipo	[Lipido] (M)	Z-ave (nm)	IP	ζ (mV)
POPC	LUV	0.049	162 ± 5	0,119 ± 0,007	2,3 ± 1,7

Tabla 60. Parámetros fisicoquímicos obtenidos a partir de liposomas LUV con ACV encapsulado y ACV libre de composición POPC. Valores medios ± desv. est. de tres determinaciones.

Las condiciones de preparación de las formulaciones de estudio se detallan en el apartado III.4.3.3.

Variables experimentales comunes

Los parámetros de trabajo seleccionados en la realización de todos los estudios de difusión fueron las siguientes:

- Membrana de difusión: membrana lipófila Prolastic™
- Condiciones no oclusivas
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32 °C
- Solución receptora: solución amortiguadora fosfato salina PBS
- Flujo del líquido receptor (F_{rec}): 2 mL/h
- Duración del ensayo: 24 h
- Número de celdas por ensayo (n):3
- Nº de ensayos por formulación: 2 (Total: n= 6 celdas)

Formulación	C_0 (mg/mL)	Q_m (g)	Q_0 (μg)
LUV POPC ACV encaps. + ACV libre	2,45	0,125 ± 0,000	306,25 ± 0,00
ACV en solución	1,87	0,200 ± 0,000	374,00 ± 0,00
Comercial	53,7	0,0086 ± 0,0010	461,82 ± 47,69

Tabla 61. Datos resultantes (media \pm desv.std) de concentración de principio activo en la formulación donadora (C_0), cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m), y cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0).

RESULTADOS

La cantidad de ACV acumulado en piel artificial (Prolastic™) se recoge en la **Fig. 62**.

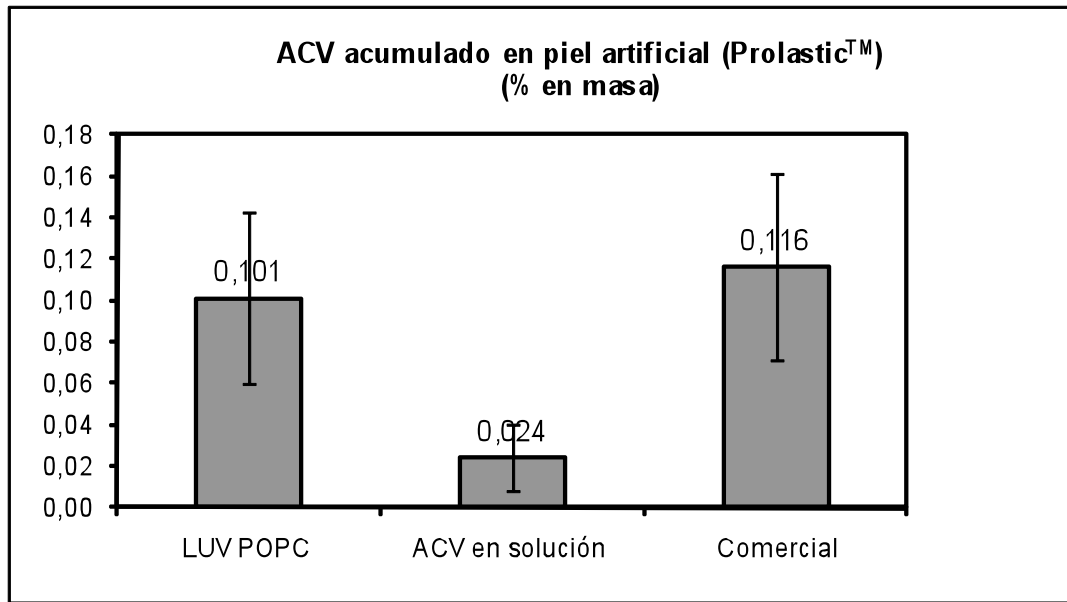


Fig. 62. ACV acumulado en piel artificial (Prolastic™) a partir de las diferentes formulaciones en estudio. Barras de error: intervalo de confianza ($p=0,05$) $n=6$ equivalente a dos ensayos.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS DATOS

Los resultados medios obtenidos en el estudio indican una menor acumulación de ACV en piel artificial con la formulación de ACV en solución. Por otra parte, respecto a la penetración cutánea de principio activo, no se encuentran diferencias significativas con un 95% de probabilidad entre la formulación comercial y la suspensión liposómica de POPC. Dichos valores reflejan unos resultados prometedores en cuanto al empleo de un sistema liposómico por vía tópica en el tratamiento del VHS, teniendo en cuenta que la crema comercial incluye en su composición, promotores de absorción en concentraciones muy elevadas. Sin embargo, para los siguientes estudios en el desarrollo de la memoria de tesis actual se utiliza piel natural ya que la diferente disposición de los canales de paso de las moléculas en la piel artificial podría no corresponder con el de la piel natural.

IV.5.

ESTUDIOS DE DIFUSIÓN A TRAVÉS DE PIEL DE RATÓN SIN PELO

IV.5.1.

Estudios con aciclovir libre

Una vez finalizados los ensayos con piel artificial, se iniciaron los estudios de difusión utilizando como membrana la piel de ratón sin pelo (SKH1-HRBR), la cual constituye un modelo de piel adecuado como alternativa al uso de piel humana. El objetivo de la siguiente batería de ensayos de difusión fue conocer el efecto promotor de los liposomas mediante la cuantificación del ACV acumulado en piel a partir del estudio de liposomas vacíos, LUV y OLV, con el principio activo libre en el medio de dispersión, preparados mediante dispersión mecánica según se describe en apartado **III.3.2.2**. Se utilizaron las siguientes bicapas lipídicas, puras o mixtas, cargadas o neutras, que presentan diferentes características de fluidez en la bicapa según su composición: DOPC, POPC, DPPC/COL (60/40)(mol/mol), DPPC/COL/SA (60/40/10)(mol/mol/mol) y DPPC/COL/DPPG (60/40/10) (mol/mol/mol). La extracción del ACV del área de piel permeada se realizó con NaOH 0,5N a 50°C, siguiendo el método descrito en apartado **III.4.2.4.4**. Los datos cuantificados de ACV en piel a partir de vesículas, se compararon con los resultados obtenidos con la formulación crema y la solución de principio activo (preparadas según apartado **III.4.3.4.1**) en ensayos de difusión realizados con las mismas parámetros de trabajo.

Descripción de ensayos

- Difusión de liposomas vacíos OLV- DOPC con ACV libre formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas vacíos LUV- DOPC con ACV libre formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas vacíos OLV- POPC con ACV libre formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas vacíos LUV- POPC con ACV libre formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas vacíos OLV- DPPC/COL con ACV libre formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas vacíos LUV- DPPC/COL con ACV libre formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas vacíos OLV- DPPC/COL/SA con ACV libre formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas vacíos LUV- DPPC/COL/SA con ACV libre formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas vacíos OLV- DPPC/COL/DPPG con ACV libre formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas vacíos LUV- DPPC/COL/DPPG con ACV libre formulados en suspensión.
- Difusión de ACV en crema
- Difusión de ACV en solución.

Caracterización físico química de los liposomas

Comp. (relación molar)	Tipo	Lip total (M)	Z-ave (nm)	I.P.	ζ (mV)
DOPC	OLV	0,067	469,3 ± 6	0,298 ± 0,014	-1,9 ± 0,8
DOPC	LUV	0,057	127,7 ± 1	0,161 ± 0,010	-0,7 ± 0,4
POPC	OLV	0,053	463,3 ± 9	0,273 ± 0,062	-3,1 ± 1,5
POPC	LUV	0,049	158,7 ± 1	0,138 ± 0,016	-1,0 ± 0,4
DPPC/COL(60/40)	OLV	0,055	833,0 ± 94	0,240 ± 0,033	-3,2 ± 0,1
DPPC/COL (60/40)	LUV	0,057	138,4 ± 0,5	0,152 ± 0,011	-8,3 ± 0,4
DPPC/COL/SA (60/40/10)	OLV	0,052	352,0 ± 7	0,250 ± 0,027	+34,6 ± 3,1
DPPC/COL/SA (60/40/10)	LUV	0,051	175,9 ± 3	0,039 ± 0,011	+27,7 ± 2,2
DPPC/COL/DPPG (60/40/10)	OLV	0,059	406,6 ± 69	0,313 ± 0,030	-29,2 ± 2,5
DPPC/COL/DPPG (60/40/10)	LUV	0,064	179,5 ± 7,2	0,110 ± 0,007	-31,4 ± 3,0

Tabla 62. Parámetros fisicoquímicos obtenidos a partir de liposomas OLV/ LUV de diferente composiciones con ACV libre en el medio de dispersión. Valores medios ± desv. est. de tres determinaciones.

Las condiciones de preparación de las formulaciones de estudio se detallan en el apartado **III.4.3.4.1.**

Las fosfatidilcolinas DOPC y POPC, a la temperatura experimental de 32°C originan bicapas fluidas (temperaturas de transición de fase (T_c) de -19 °C y -4°C respectivamente). Por otra parte, la bicapa lipídica DPPC con una T_c de 41,5 °C, es una membrana rígida a la temperatura de 32°C, a la cual, se incorporó colesterol en una relación molar 60:40. Dicho esteroide, aumenta la fluidez de la membrana lipídica por debajo de la T_c del fosfolípido DPPC, llegando a anular esta fase de transición cuando se encuentra en proporción de 1:1. La incorporación de fosfolípido DPPG y el lípido SA en la membrana lipídica tiene como objeto la incorporación de carga negativa y positiva respectivamente.

Una reducción del tamaño y polidispersidad se consigue en la extrusión de vesículas, siendo el diámetro promedio obtenido en los liposomas LUV cercano al diámetro de poro utilizado en la membrana de policarbonato (0,2µm) (Olson, F., *et al.*, 1979). En cambio, al utilizar filtros de 0,8 µm se obtuvieron liposomas con un valor de Z-ave mucho más pequeño que el tamaño del poro. Este comportamiento ya ha sido observado por otros autores a partir de filtros con un diámetro de poro grande ($\geq 0,4\mu\text{m}$) (Berger, N., *et al.*, 2001), (Torre-Enciso, M., 2004). Según los estudios de lamelaridad realizados en liposomas por diversos autores mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de impulsos (Mayer, L.D. *et al.*, 1986), (Torre-Enciso, M., 2004), se considera que existe un equilibrio entre vesículas unilamelares y

oligolamelares, en ambas suspensiones de liposomas (OLV Y LUV), aumentando el carácter multilamelar en vesículas extrudidas a través de filtros con un diámetro de poro de 0,8 μm . El índice de polidispersidad se utiliza como una medida de distribución unimodal. Un valor menor de IP ($<0,1$) indica una población homogénea, mientras que un IP $>0,3$ indica una alta heterogeneidad (Verma, D.D., *et al.*, 2003a). Los liposomas extrudidos a través de un diámetro de poro de 0,8 μm o 0,2 μm presentaron valores de IP próximos a 0,3 y 0,1 respectivamente. Al igual que observaron otros autores (Olson, F., *et al.*, 1979), (Torre-Enciso, M., 2004), una disminución en el tamaño de poro de la membrana va acompañado de una distribución de tamaños más homogénea.

En un rango aproximado de pH entre 4-10, la cabeza polar de las fosfatidilcolinas son zwiteriones, por lo tanto no presentan carga neta (Jones, M.N., 1995). Sin embargo, en el estudio actual los liposomas POPC, DOPC, DPPC/COL constituidos por fosfatidilcolinas neutras a un pH de 6 presentan cierta movilidad cuando son sometidas a un campo eléctrico, obteniéndose valores de potencial ζ distintos de cero (**Tabla 62**) al igual que observaron otros autores en liposomas con carga neutra (Tatulian, S.A., 1983), (Makino, K., *et al.*, 1991), (Torre-Enciso, M., 2004). Tatulian demostró una dependencia entre la magnitud del potencial ζ y la concentración de aniones presentes en el medio. Tales resultados indicaron un enlace específico de aniones a la superficie del liposoma, obteniendo el mencionado autor una secuencia de afinidades de aniones a la superficie de liposoma DMPC en el orden siguiente: trinitrofenol $>$ $\text{ClO}_4^- >$ $\text{I}^- >$ $\text{SCN}^- >$ $\text{Br}^- >$ $\text{NO}_3^- >$ $\text{Cl}^- \cong \text{SO}_4^{2-}$ (Tatulian, S.A., 1983). Torre Enciso (Torre-Enciso, M., 2004) consideró en su estudio que la existencia de NaCl a una concentración de 150mM en el medio de dispersión a pH 7,4 de los liposomas DOPC y POPC podía ser la causa de la aparición de una pequeña carga negativa en la superficie de las vesículas. Por otra parte, Makino (Makino, K., *et al.*, 1991) demostró en sus estudios con liposomas que variaciones en la fuerza iónica y temperatura del medio conllevan cambios en la orientación de las cabezas polares de los fosfolípidos y por lo tanto cambios en el potencial ζ de las vesículas. La incorporación de carga en la bicapa lipídica evita de una manera sencilla fenómenos de agregación y fusión entre liposomas debido a la repulsión electrostática. Aparte de influir en la estabilidad, la carga superficial puede conducir a cambios en las interacciones de los liposomas con membranas, principios activos u otras vesículas (Jones, M.N., 1995), (Roy, M.T. *et al.*, 1998). En el presente trabajo se introdujo carga negativa y positiva a la superficie del liposoma mediante la inclusión en la bicapa lipídica de los lípidos

DPPG y SA respectivamente. Los valores obtenidos de potencial ζ para estas composiciones se observan en la **Tabla 62**. En un estudio publicado por diversos autores (Gaspar., M.M., *et al.*, 2008) se observa como el grupo PG, determina el valor de potencial ζ de una suspensión liposómica ya que a partir de formulaciones liposómicas que incluyen en la bicapa lipídica el grupo PG, como PC:PG, DMPC:DMPG y DPPC:DPPG en un proporción molar de 7:3, el valor obtenido de potencial ζ es similar. Un aumento de la cantidad del grupo PG en la membrana lipídica disminuye el de potencial ζ . (Foged, C., *et al.*, 2007).

Variables experimentales comunes

Los parámetros de trabajo seleccionados que se mantuvieron constantes en la realización de todos los estudios de difusión fueron las siguientes:

- Membrana de difusión: piel dorsal ratón sin pelo
- Condiciones no oclusivas
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32°C
- Concentración de principio activo en formulación donadora (C_0): 1000 $\mu\text{g/mL}$
- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,2ml
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 200 μg
- Solución receptora: solución amortiguadora fosfato salina PBS
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 2,5 mL/h
- Duración del ensayo: 16h
- Número de celdas por ensayo (n): 3
- N° de ensayos por formulación: 2 (Total: n= 6 celdas)

RESULTADOS

La cantidad de ACV acumulado en piel de ratón sin pelo se recoge en la **Fig. 63**.

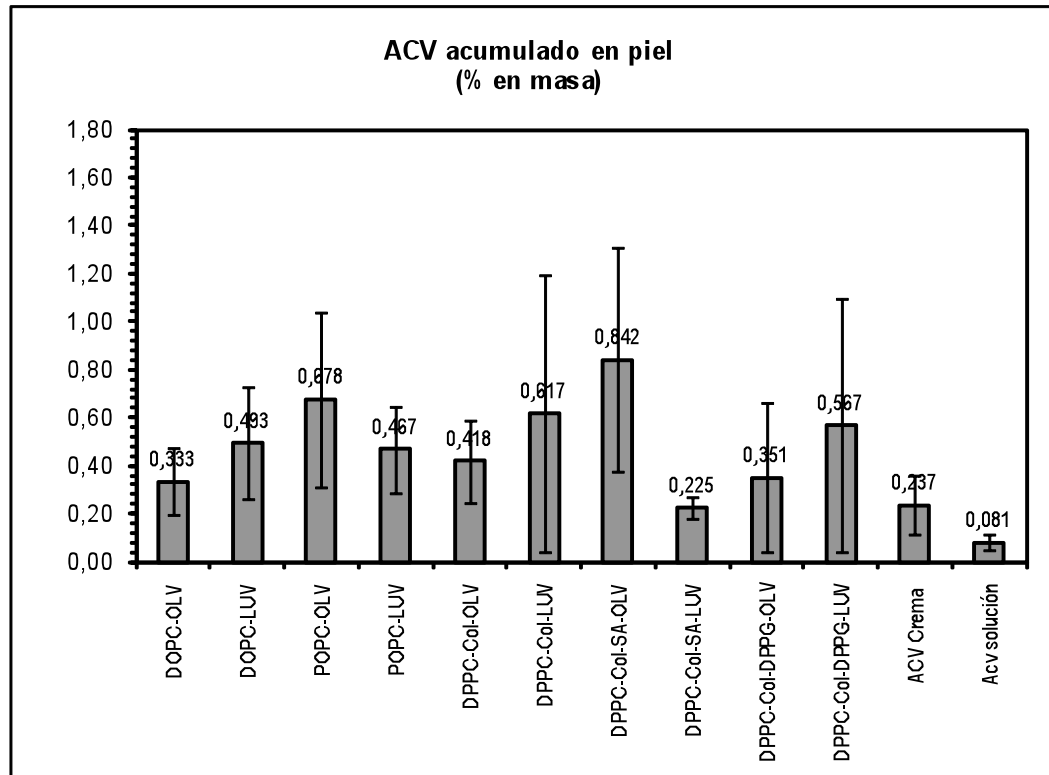


Fig. 63. ACV acumulado en piel de ratón sin pelo a partir de las diferentes formulaciones en estudio. Barras de error: intervalo de confianza ($p = 0,05$). $n = 6$ equivalente a dos ensayos.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE DATOS

Se realizó un estudio comparativo de los resultados de ACV cuantificados en piel total de ratón sin pelo. Para ello se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (tipo de formulación y ensayo), con varias muestras por grupo (celdas), usando un nivel de significación de $p = 0,05$.

Los resultados obtenidos a través de dicho análisis fueron los siguientes:

- Diferencias entre ensayos:
No significativa en ningún caso salvo en DPPC-COL-SA
- Diferencias entre liposomas OLV y LUV:
Significativa solo en DPPC/COL/SA: menor acumulación con liposomas LUV
- Diferencias entre composiciones lipídicas:
No hay diferencias significativas
- Diferencias entre ACV crema y ACV solución
Significativa. Mayor acumulación con formulación crema
- Diferencias entre liposomas y ACV solución

Significativa en DOPC, POPC, DPPC/COL/SA: mayor acumulación de ACV a partir de las suspensiones de liposomas

- Diferencias entre liposomas y ACV crema

Significativa en DOPC, POPC, DPPC/COL/SA (OLV): mayor acumulación de ACV a partir de las suspensiones de liposomas

Diversos autores han demostrado el efecto promotor de las vesículas en estudios donde se ha pretratado la piel con vesículas vacías. Si bien, se han realizado estudios donde se obtuvieron mejores resultados al administrar conjuntamente principios activos y vesículas que al pretratar la piel con liposomas vacíos (Du Plessis, J., *et al.*, 1994b), (El Maghraby, G.M.M., *et al.*, 1999). No se conoce a ciencia cierta el mecanismo de interacción entre los liposomas y la piel, y por lo tanto cómo se transporta a través de la piel el principio activo. En el estudio actual, para todas las bicapas lipídicas ensayadas, la cantidad media de ACV acumulado en piel respecto al ACV en solución y ACV en crema fue superior, siendo además esta diferencia significativa en DOPC, POPC, DPPC/COL/SA (sólo OLV respecto a ACV crema). Se considera, que los lípidos intercelulares que constituyen el estrato córneo son una barrera principal para la absorción de compuestos, y el efecto promotor de las vesículas podría deberse a los cambios producidos en dichos lípidos intercelulares al interaccionar con los componentes de los liposomas (Hofland, H.E.J., *et al.*, 1995), (Kirjavainen, M., *et al.*, 1996), (Kim, C., *et al.* 2002). Coincidente con otros autores, se resalta este estudio la importancia del efecto promotor en el reparto a piel de principios activos de naturaleza hidrofílica (Gupta, M., *et al.*, 2010).

A modo de resumen:

- En esta primera batería de ensayos de difusión realizados con piel de ratón sin pelo, cabe destacar que la mayor acumulación de ACV en piel de ratón sin pelo a partir de liposomas vacíos (LUV/OLV) con principio activo libre en el medio de dispersión de composición DOPC, POPC, DPPC/COL/SA, respecto a la solución de ACV y formulación de ACV en crema (que incorpora promotores de la penetración), indica un posible efecto promotor de la penetración de las diferentes bicapas lipídicas ensayadas.

IV.5.2.

Estudios con aciclovir encapsulado

En los siguientes ensayos de difusión *in vitro* de ACV a través de piel de ratón se utilizaron distintas composiciones liposómicas en las que el principio activo se encontraba encapsulado. Para ello, se prepararon mediante dispersión mecánica suspensiones de liposomas LUV y OLV con ACV encapsulado según se describe en apartado **III.3.2.1**, seleccionando para este estudio las siguientes bicapas lipídicas, puras o mixtas, cargadas o neutras, que presentan diferentes características de fluidez en la bicapa según su composición: DOPC, POPC, DOPC/DPPG (90/10) (mol/mol), POPC/DPPG (90/10) (mol/mol) DPPC/COL (60/40) (mol/mol), DPPC/COL/SA (60/40/10) (mol/mol/mol)), DPPC/COL/DPPG (60/40/10) (mol/mol/mol). La extracción del ACV del área de piel permeada se realizó con NaOH 0,5N a 50°C, siguiendo el método descrito en apartado **III.4.2.4.4**. Los datos cuantificados de ACV en piel a partir de vesículas, se compararon con los resultados obtenidos con la formulación crema y la solución de principio activo (preparadas según apartado **III.4.3.4.2**) en ensayos de difusión realizados con las mismas parámetros de trabajo.

Descripción de ensayos

- Difusión de liposomas OLV- DOPC con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas LUV- DOPC con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas OLV- DOPC/DPPG con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas LUV- DOPC/DPPG con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas OLV- POPC con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas LUV- POPC con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas OLV- POPC/DPPG con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas LUV- POPC/DPPG con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas OLV- DPPC/COL con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas LUV- DPPC/COL con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.

- Difusión de liposomas OLV- DPPC/COL/SA con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas LUV- DPPC/COL/SA con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas OLV-DPPC/COL/DPPG con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas LUV-DPPC/COL/DPPG con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de ACV en crema.
- Difusión de ACVNa en solución.

Caracterización físico química de los liposomas

Comp. (relación molar)	Tipo	[Lip total] (M)	Z-ave (nm)	I.P.	ζ (mV)	E.E
DOPC	OLV	0,012	423,5 ± 4	0,292 ± 0,028	- 2,25 ± 1,5	10,9
DOPC	LUV	0,023	199,9 ± 3	0,133 ± 0,030	- 4,75 ± 1,3	6,05
DOPC/DPPG (90/10)	OLV	0,010	414,1± 10	0,289 ± 0,031	-24,5 ± 1,2	12,7
DOPC/DPPG (90/10)	LUV	0,016	171,4 ± 3	0,112 ± 0,011	-24,1 ± 1,6	8,05
POPC	OLV	0,012	221,0± 1	0,292 ± 0,014	-1,3 ± 1,2	11,5
POPC	LUV	0,013	169,6 ± 2	0,107± 0,038	- 6,05 ± 1,7	10,0
POPC/DPPG (90/10)	OLV	0,008	224,8 ± 4	0,271 ± 0,006	-22,4 ± 1,4	15,8
POPC/DPPG(90/10)	LUV	0,012	169,7± 1	0,090 ± 0,019	-21, 7 ± 2,3	11,0
DPPC/COL (60/40)	OLV	0,012	604,6 ± 24	0,286 ± 0,070	-1,9 ± 1	14,4
DPPC/COL(60/40)	LUV	0,014	211,6 ± 2	0,024 ± 11	-6,0 ± 2,5	12,0
DPPC/COL/SA (60/40/10)	OLV	0,013	653,8 ± 6	0,260 ± 0,047	+ 44,8 ± 3,7	13,3
DPPC/COL/SA (60/40/10)	LUV	0,019	210,9 ± 2	0,033 ± 0,029	+ 36,8 ± 3,7	9,2
DPPC/COL/DPPG (60/40/10)	OLV	0,007	582,7 ± 12	0,292 ± 0,011	-24,7 ± 1,3	24,8
DPPC/COL/DPPG (60/40/10)	LUV	0,011	213,0 ± 2	0,031 ± 0,016	-23,7 ± 1,9	14,5

Tabla 63. Parámetros fisicoquímicos obtenidos a partir de liposomas OLV/ LUV de diferentes composiciones con ACVNa encapsulado. Valores medios ± desv. est. de tres determinaciones.

Las condiciones de preparación de las formulaciones de estudio se detallan en el apartado **III.4.3.4.2.**

Respecto a las composiciones preparadas en los ensayos realizados a partir de liposomas con ACV libre (ver página 274), se evaluaron también las bicapas lipídicas mixtas DOPC/DPPG y

POPC/DPPG, en una relación molar 90/10, en las cuales la incorporación del fosfolípido DPPG (T_c de 41,5 °C) aumenta la T_c de las fosfatidilcolinas puras DOPC y POPC. Las cadenas saturadas de ácido palmítico (C16:0) que incorpora el DPPG, disminuye los movimientos de las cadenas hidrocarbonadas en la bicapa y aumenta la rigidez de la membrana y su T_c.

Los resultados obtenidos de eficiencia de encapsulación (EE), dato referido a la cantidad de soluto atrapado respecto a la cantidad de lípido que lo contiene en forma de vesícula, fueron mayores en liposomas OLV que en liposomas LUV. Se observa una disminución en la EE al disminuir el tamaño del liposoma al igual que observaron otros autores (Jousma, H., *et al*, 1987), (Berger, N., *et al*, 2001). Entre las formulaciones liposómicas ensayadas, se obtuvo una eficiencia de encapsulación mayor en los liposomas constituidos por la bicapa lipídica de DPPC-COL-DPPG, tanto en OLV como en LUV.

Variables experimentales comunes

Los parámetros de trabajo seleccionados que se mantuvieron constantes en la realización de todos los estudios de difusión fueron las siguientes:

- Membrana de difusión: piel dorsal ratón sin pelo
- Condiciones no oclusivas
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32°C
- Concentración de principio activo en formulación donadora (C₀): 1000 µg/mL
- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,2ml
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q₀): 200 µg
- Solución receptora: solución amortiguadora fosfato salina PBS
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 0,5 mL/h
- Duración del ensayo: 16h
- Número de celdas por ensayo (n): 3
- N° de ensayos por formulación: 2 (Total: n= 6 celdas)

RESULTADOS

La cantidad de ACV acumulado en piel de ratón sin pelo se recoge en la Fig. 64.

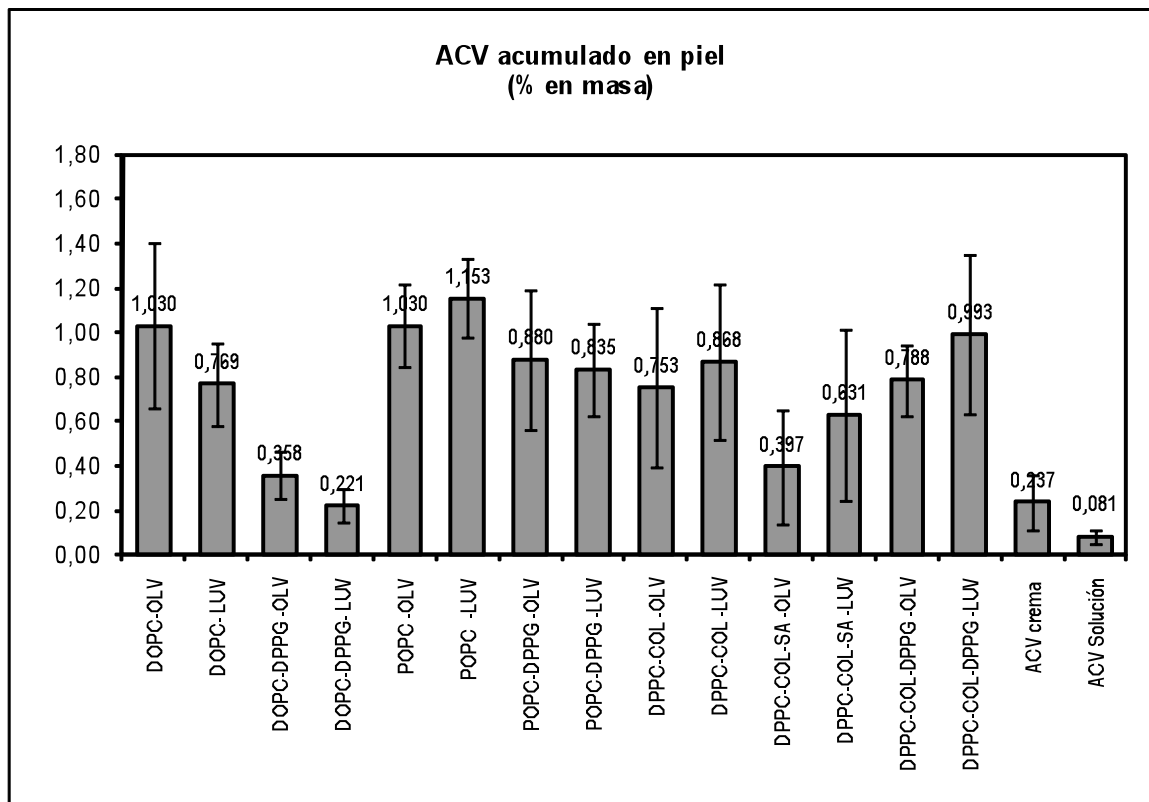


Fig. 64. ACV acumulado en piel de ratón sin pelo a partir de las diferentes formulaciones en estudio. Barras de error: intervalo de confianza ($p=0,05$). $n=6$ equivalente a dos ensayos.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE DATOS

Se realizó un estudio comparativo de los resultados de ACV cuantificados en piel total de ratón sin pelo. Para ello se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (tipo de formulación y ensayo), con varias muestras por grupo (celdas), usando un nivel de significación de $p=0,05$.

Los resultados obtenidos a través de dicho análisis fueron los siguientes:

- Diferencias entre ensayos
No significativa en ningún caso.
- Diferencias entre liposomas OLV y LUV
No significativa en ningún caso.
- Diferencias entre composiciones lipídicas:

Significativa entre DOPC-DPPG y el resto de composiciones, excepto con DPPG-COL-SA.

Significativa entre DPPC-COL-SA y composiciones DOPC y POPC.

- Diferencias entre ACV crema y ACV solución

Significativa. Mayor acumulación con formulación crema

- Diferencias entre liposomas y ACV solución:

Significativa para todas las composiciones salvo para DPPC-COL-SA. Mayor acumulación con liposomas.

- Diferencias entre liposomas y ACV crema:

Significativa en todas formulaciones, salvo para DPPC-COL-SA y DOPC-DPPG. Mayor acumulación con liposomas.

Las diferencias significativas encontradas en este estudio demostraron un aumento del ACV cuantificado en piel a partir de las formulaciones liposómicas estudiadas respecto al ACVNa en solución (excepto para DPPC-COL-SA) y respecto al ACV en crema (excepto para DPPC-COL-SA y DOPC-DPPG). Únicamente, la cantidad media acumulada de principio activo respecto a la formulación crema fue menor con DOPC-DPPG (LUV). Los datos obtenidos, al igual que en los estudios realizados por otros autores (Egbaria, K., *et al.*, 1990a), (Touitou, E., *et al.*, 1994a), (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2001a), (Verma, D.D. *et al.*, 2003b), confirmaron el uso potencial de los liposomas para el reparto en piel de principios activos hidrofílicos y su mejora respecto a sistemas convencionales que incorporan promotores de la penetración en su formulación.

Si tenemos en cuenta el estado termodinámico de la bicapa a la temperatura de la piel, los resultados obtenidos indican un aumento de la acumulación de ACV en piel a partir de las bicapas lipídicas más fluidas. Así, la cantidad media cuantificada de ACV acumulado en piel fue mayor a partir de las bicapas lipídicas puras DOPC y POPC respecto a las bicapas lipídicas mixtas DOPC/DPPG y POPC/DPPG donde la incorporación del fosfolípido DPPG en la bicapa lipídica disminuyó la fluidez de la misma, siendo la diferencia observada significativa en el caso de DOPC/DPPG. Dichos resultados coincidieron con los obtenidos por otros autores los cuales documentaron una correlación entre la fluidez de las vesículas a la temperatura cutánea y la penetración en piel de principios activos hidrofílicos (Coderch, L., *et al.*, 2000), (Pérez-Cullell, N., *et al.*, 2000), (El Maghraby, G.M., *et al.*, 2001a). Estos datos

demuestran el empleo favorable de vesículas en estado cristal líquido (fluido) frente a vesículas en estado de gel (rígido) en el reparto cutáneo de principios activos hidrofílicos.

La carga superficial en los liposomas podría modificar la interacción de dichas vesículas con la piel modificando la absorción cutánea del principio activo incorporado en la formulación. Ogiso y col. (Ogiso, T., *et al.*, 2001), publicaron que la penetración de diversos principios activos en piel era superior a partir de liposomas con carga negativa frente a liposomas con carga positiva. Esposito y col., (Esposito, E., *et al.*, 1998) observaron que la presencia de carga (aniónica y catiónica) en la bicapa, influía solo ligeramente en la absorción del principio activo hidrofílico (metil nicotinato) en piel artificial. En cambio, Kirjavainen y col. (Kirjavainen, M., *et al.*, 1996) publicaron que la carga negativa en la superficie del liposoma no afectaba en la penetración en el estrato córneo del marcador fluorescente lipídico en estudio. En el presente estudio no se ha observado una influencia clara de la carga en la bicapa. Las cantidades medias acumuladas de ACV en piel en nuestro estudio, indicaron respecto a los liposomas DPPC/COL, una disminución de ACV cuantificado en piel a partir de vesículas (DPPC/COL/SA) con carga positiva incorporada en la bicapa y un ligero aumento de ACV cuantificado en piel a partir de vesículas con carga negativa en la bicapa (DPPC/COL/DPPG).

Se ha investigado la influencia del tamaño del liposoma y la lamellaridad en el transporte del ACV a la piel. La relativa contribución del tamaño del liposoma en el transporte de un principio activo a piel es un tema de controversia. Du Plessis y col., sugirieron que existía un tamaño óptimo de partícula en el transporte de principios activos a piel (Du Plessis, J., *et al.*, 1994a). Verma y col, indicaron que la penetración en piel de la carboxifluoresceína estaba inversamente relacionada al tamaño de los liposomas (Verma, D.D., *et al.*, 2003a). Šentjurc, M. y col, observaron que el transporte de sustancias hidrofílicas en la piel disminuía significativamente en vesículas de tamaño < 200nm (Šentjurc, M., *et al.*, 1999). Así como, los estudios de diversos autores no revelaron diferencias significativas entre diferentes tamaños de vesículas en los estudios realizados en piel con la moléculas oestradiol (Magharaby, G.M.M., *et al.*, 1999), y cafeína (Kim, C., *et al.* 2002). Teniendo en cuenta la gran variedad de datos documentados, diversos autores demostraron que la influencia del tamaño del liposoma en la penetración depende de la composición lipídica de la vesícula, naturaleza lipofílica del principio activo y también de la naturaleza de la piel (Šentjurc, M., *et al.*, 1999). No se observaron diferencias significativas entre liposomas OLV (extrudidos diámetro poro

0,8 μ m) y LUV (extrudidos diámetro poro 0,2 μ m) a partir de los valores de ACV cuantificados en piel. Se asume la posibilidad de que vesículas intactas penetren la piel si a partir de una disminución en el tamaño de partículas se aumentara la cantidad de principio activo absorbido en piel. Los datos resultantes en el trabajo actual sugirieron, al igual que los datos obtenidos por otros autores (Du Plessis, J., *et al.*, 1994a), (Magharaby, G.M.M., *et al.*, 1999) que el mecanismo de acción de liposomas en piel no implica el paso intacto de las vesículas.

Por otra parte, se observó una mayor eficiencia de encapsulación en los liposomas constituidos por la bicapa lipídica DPPC-COL-DPPG (**Tabla 63**). Sin embargo, no se obtuvo una correlación entre la acumulación de ACV en piel y la eficiencia de encapsulación en las vesículas, al igual que en los estudios realizados por diversos autores (Coderch., L., *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos en el estudio actual coincidieron con otros autores, que demostraron que las vesículas constituidas por fosfolípidos no solo transportan a la piel la molécula encapsulada, sino también la no encapsulada (Kim, C., *et al.* 2002), (Verma, D.D. *et al.*, 2003b). En todas las formulaciones liposómicas ensayadas, la cantidad media de ACV acumulado en piel fue menor a partir de liposomas con principio activo libre frente a liposomas con ACV encapsulado. Tales resultados coincidirían con los estudios de Verma y col. (Verma, D.D. *et al.*, 2003b), que obtuvieron diferentes perfiles de absorción en piel entre liposomas con carboxifluoresceína encapsulada y liposomas con carboxifluoresceína libre, siendo la cantidad de principio activo absorbida en piel mayor a partir de aquellas formulaciones que presentaban la molécula atrapada.

A modo de resumen:

- La mayor acumulación en piel de ACV encapsulado en liposomas (LUV/OLV) de composición DOPC, POPC, POPC-DPPG, DPPC-COL y DPPC-COL-DPPG frente a la solución de ACVNa y a la formulación de ACV en crema demuestra la utilidad de dichas vesículas para incidir favorablemente sobre el proceso de reparto formulación/piel de principios activos hidrofílicos, y su mejora respecto a sistemas convencionales.

- El estado termodinámico de la bicapa lipídica que constituye el liposoma influye en el reparto de ACV en piel, siendo dicha penetración mayor a partir de aquellas bicapas lipídicas más fluidas como demuestran la diferencias significativamente superiores observadas en la bicapa lipídica fluida DOPC respecto a la bicapa lipídica mixta DOPC/DPPG, con una fluidez en la bicapa inferior debido a la incorporación de DPPG.
- El tamaño de las vesículas, la presencia de carga en la superficie, y la eficiencia de encapsulación, no son parámetros críticos en la penetración de ACV en piel de ratón sin pelo, ya que no proporcionan variaciones estadísticamente significativas.

- Una disminución en el tamaño de las vesículas no implica un aumento de la cantidad de principio activo acumulado en piel, hecho que sugiere que el mecanismo de interacción entre liposomas y piel, no conlleva un simple paso intacto de vesículas, debiendo explicarse dicha interacción a través de mecanismos más complejos.

- La acumulación de ACV en piel a partir de liposomas con principio activo libre y de liposomas con principio activo encapsulado, justifican la conveniencia de elaborar formulaciones liposómicas de ACV en el que dicho principio activo se encuentre, tanto encapsulado, como libre en disolución, no debiendo retirarse el ACV no encapsulado una vez elaborados los liposomas.

IV.5.3.

Acumulación en piel viable con formulaciones seleccionadas

Diversos autores publicaron que la acumulación de un principio activo en la epidermis viable y /o dermis no se podía predecir por la determinación de la cantidad de principio activo en piel total (Touitou E., *et al.*, 1994b). Con el fin de obtener datos más precisos de la cantidad de principio activo que alcanza la zona de acción del ACV (capa basal de la epidermis), se realizaron los siguientes ensayos de difusión a través de piel de ratón sin pelo donde se estudió, a partir de liposomas con ACV libre en el medio de dispersión, y liposomas con ACV encapsulado, ambos preparados mediante dispersión mecánica según se describe en apartados **III.3.2.1** y **III.3.2.2** respectivamente, el reparto del ACV únicamente a piel viable. En esta batería de ensayos también se estudió el ACV que difunde a compartimento receptor. Basándonos en estudios anteriores, se seleccionó entre las composiciones estudiadas, la POPC bicapa lipídica fluida con una Tc de - 4°C, y la DPPC/COL/DPPG (60/40/10)(mol/mol/mol), que presenta una mayor rigidez en su membrana. Tras finalizar los ensayos de difusión, y antes de iniciar la extracción cutánea del principio activo, se retiró el estrato córneo de la piel mediante 12 “stripping” obteniendo así, la piel viable. La extracción del ACV del área de piel permeada se realizó con NaOH 0,5N a 50°C, siguiendo el método descrito en apartado **III.4.2.4.4**. Los datos cuantificados de ACV en piel viable y difundidos a compartimento receptor a partir de vesículas, se compararon con los resultados obtenidos con la formulación crema y la solución de principio activo (preparadas según apartado **III.4.3.4.3**) en ensayos de difusión realizados con las mismos parámetros de trabajo.

Descripción de ensayos

- Difusión de liposomas LUV-DPPC/COL/DPPG con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas LUV- POPC con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas vacíos LUV- POPC con ACV libre en el medio de dispersión formulados en suspensión.
- Difusión de ACV en crema.

Caracterización físico química de los liposomas

Comp (relación molar)	ACV	Tipo	Lip total (M)	Z-ave (nm)	I.P.	ζ (mV)	E.E
DPPC/COL/DPPG (60/40/10)	encap.	LUV	0,011	209,6 ± 2,3	0,041 ± 0,039	-23,8 ± 0,6	14,8
POPC	encap.	LUV	0,015	164,6 ± 1,0	0,138 ± 0,010	-2,4 ± 1,7	8,8
POPC	Libre	LUV	0,013	215,8 ± 0,6	0,127 ± 0,015	-1,2 ± 0,9	

Tabla 64. Parámetros fisicoquímicos obtenidos a partir de liposomas LUV de diferentes composiciones con ACV encapsulado o libre. Valores medios ± desv. est. de tres determinaciones.

Las condiciones de preparación de las formulaciones de estudio se detallan en el apartado **III.4.3.4.3.**

Variables experimentales comunes

Los parámetros de trabajo seleccionados que se mantuvieron constantes en la realización de todos los estudios de difusión fueron las siguientes:

- Membrana de difusión: piel dorsal ratón sin pelo
- Condiciones no oclusivas
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32°C
- Concentración de principio activo en formulación donadora (C_0): 1000 µg/mL
- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,2ml
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 200 µg
- Solución receptora: solución amortiguadora fosfato salina PBS
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 0,5 mL/h
- Duración del ensayo: 16h
- Número de celdas por ensayo (n): 3
- N° de ensayos por formulación: 2 (Total: n= 6 celdas)
- Tiempo recogida receptores (t): 16h

RESULTADOS

La cantidad de ACV acumulado en piel viable (12 stripping) de ratón sin pelo y en receptor se recoge en la **Fig 65.**

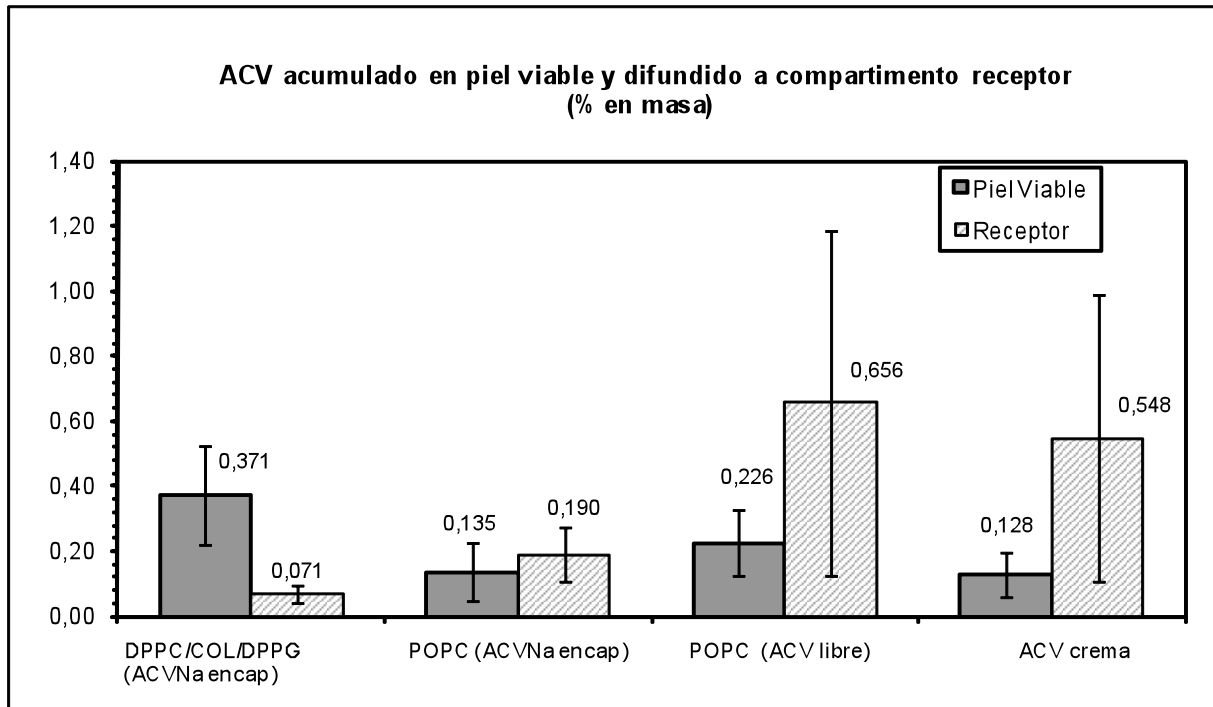


Fig. 65. ACV acumulado en piel viable (12 stripping) de ratón sin pelo y difundido a compartimento receptor a partir de las diferentes formulaciones en estudio. Barras de error: intervalo de confianza ($p= 0,05$). $n = 6$ equivalente a dos ensayos.

Resultados datos de acumulación de ACV en piel viable

- Diferencias entre ensayos:

No significativa

- Diferencias entre composiciones lipídicas:

No significativa

- Diferencias entre liposomas y ACV crema

Significativa para DPPC/COL/DPPG. Mayor acumulación de ACV a partir de esta formulación.

Resultados datos de acumulación de ACV en receptor

- Diferencias entre ensayos:

No significativa

- Diferencias entre composiciones lipídicas:

Significativa para DPPC/COL/DPPG. Menor difusión de ACV a receptor a partir de esta formulación.

- Diferencias entre liposomas y ACV crema

Significativa para DPPC/COL/DPPG. Menor difusión de ACV a receptor a partir de esta formulación.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE DATOS

En el estudio actual, no se observaron diferencias significativas respecto a la acumulación de ACV en piel viable entre las diferentes formulaciones liposómicas estudiadas, si bien se cuantificó un valor medio mayor para la composición DPPC/COL/DPPG, significativamente superior respecto a la formulación de ACV en crema. Cabe destacar en este estudio, el diferente comportamiento observado en relación a la difusión del principio activo a receptor entre las formulaciones ensayadas. Se cuantificaron mayores cantidades (considerando los valores medios) de ACV en receptor a partir del ACV en crema y los liposomas POPC vacíos con ACV libre en el medio de dispersión, frente a los liposomas DPPC/COL/DPPG y POPC, ambos con ACVNa encapsulado, siendo el valor obtenido significativamente inferior a partir de las vesículas de DPPC/COL/DPPG. Estos resultados demuestran un retardo en la difusión del ACV a receptor a partir de los liposomas con principio activo encapsulado, que indicaría una retención en piel del ACV, y una difusión rápida del principio activo a receptor a partir de formulaciones con ACV libre.

A modo de resumen:

- El comportamiento de difusión del ACV a receptor es diferente cuando se comparan formulaciones con ACVNa encapsulado frente a formulaciones con ACV libre. El retardo observado en la difusión del principio activo a receptor a partir de liposomas DPPC/COL/DPPG y POPC con ACV encapsulado, respecto a liposomas POPC con ACV libre y a la formulación de ACV en crema, indica una retención en piel del principio activo. Dicha retención podría significar la formación de un reservorio cutáneo que favorece una prolongada cesión del ACV a su zona de diana de actuación, la capa basal de la epidermis. Por otro lado, se demuestra una difusión rápida de principio activo a receptor a partir de formulaciones con ACV libre, que podría significar una difusión rápida del ACV a la zona de actuación.

IV.5.4.

Acumulación en piel viable: Influencia de la concentración en compartimento donador con DPPC/COL/DPPG

En la siguiente batería de ensayos, se investigó como influye de la concentración de ACV en la formulación donadora en el reparto a piel viable, y difusión a receptor del principio activo. Para ello, se prepararon mediante dispersión mecánica según se describe en apartado **III.3.2.1**, suspensiones liposómicas con diferente concentración de principio activo encapsulado. Basándonos en los valores medios cuantificados en piel viable en ensayos previos (**IV.5.3**), la bicapa lipídica seleccionada en estos ensayos fue la DPPC/COL/DPPG (60/40/10)(mol/mol/mol). Tras finalizar los ensayos de difusión, y antes de iniciar la extracción cutánea del principio activo, se retiró el estrato córneo de la piel mediante 12 “stripping” obteniendo así, la piel viable. La extracción del ACV del área de piel permeada se realizó con NaOH 0,5N a 50°C, siguiendo el método descrito en apartado **III.4.2.4.4**. Los datos cuantificados de ACV en piel viable y difundido a compartimento receptor a partir de vesículas, se compararon con los resultados obtenidos con la formulación crema (preparada según apartado **III.4.3.4.4**) en ensayos de difusión realizados con las mismos parámetros de trabajo.

Descripción de ensayos

- Difusión de liposomas LUV-DPPC/COL/DPPG (5 mg/ml) con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de ACV en crema (5 mg/mL).
- Difusión de liposomas LUV-DPPC/COL/DPPG (30 mg/mL) con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de ACV en crema (30 mg/mL).

Caracterización Físico química de los liposomas

Comp (relación molar)	ACV (mg/mL)	Tipo	Lip total (M)	Z-ave (nm)	I.P.	ζ (mV)	E.E
DPPC/COL/DPPG(60/40/10)	5	LUV	0,055	210,5 ± 1,2	0,030 ± 0,011	-26,8 ± 2,6	15,0
DPPC/COL/DPPG(60/40/10)	30	LUV	0,205	218,4 ± 3,0	0,021 ± 0,010	-20,5 ± 1,8	23,9

Tabla 65. Parámetros fisicoquímicos obtenidos a partir de liposomas LUV de composición DPPC/COL/DPPG (60/40/10) (mol/mol/mol) con diferente concentración de principio activo encapsulado. Valores medios ± desv. est. de tres determinaciones.

Las condiciones de preparación de las formulaciones de estudio se detallan en el apartado **III.4.3.4.4**.

Variables experimentales comunes

Los parámetros de trabajo seleccionados que se mantuvieron constantes en la realización de todos los estudios de difusión fueron las siguientes:

- Membrana de difusión: piel dorsal ratón sin pelo
- Condiciones no oclusivas
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32°C
- Concentración de principio activo en formulación donadora (C_0): 5000 $\mu\text{g/mL}$ / 30000 $\mu\text{g/mL}$
- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,2 mL/ 0,05 g
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 1000 μg / 1500 μg
- Solución receptora: solución amortiguadora fosfato salina PBS
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 0,5 mL/h
- Duración del ensayo: 16h
- Número de celdas por ensayo (n): 3
- Nº de ensayos por formulación: 2 (Total: n= 6 celdas)
- Tiempo recogida receptores (t): 16h

RESULTADOS

La cantidad de ACV acumulado en piel viable (12 stripping) de ratón sin pelo y difundido a compartimento receptor se recoge en la **Fig. 66.** y **Fig. 67.**

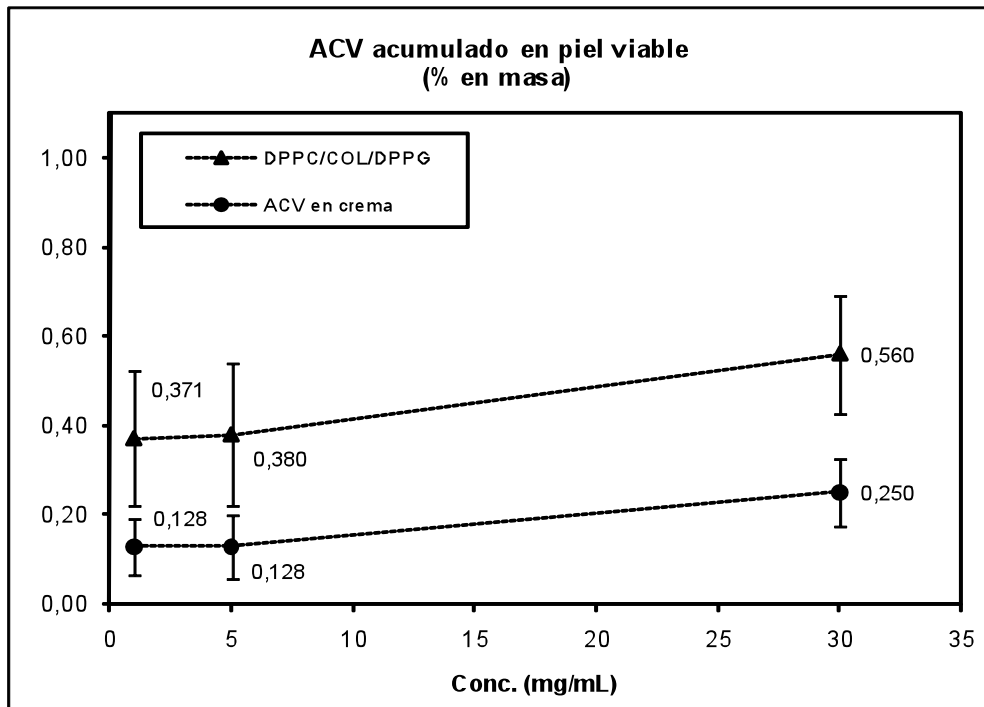


Fig. 66. ACV acumulado en piel viable (12 stripping) de ratón sin pelo a partir de formulaciones con diferente concentración de principio activo (1 mg/mL, 5 mg/mL y 30 mg/ml). Barras de error: intervalo de confianza ($p=0,05$). $n = 6$ equivalente a dos ensayos.

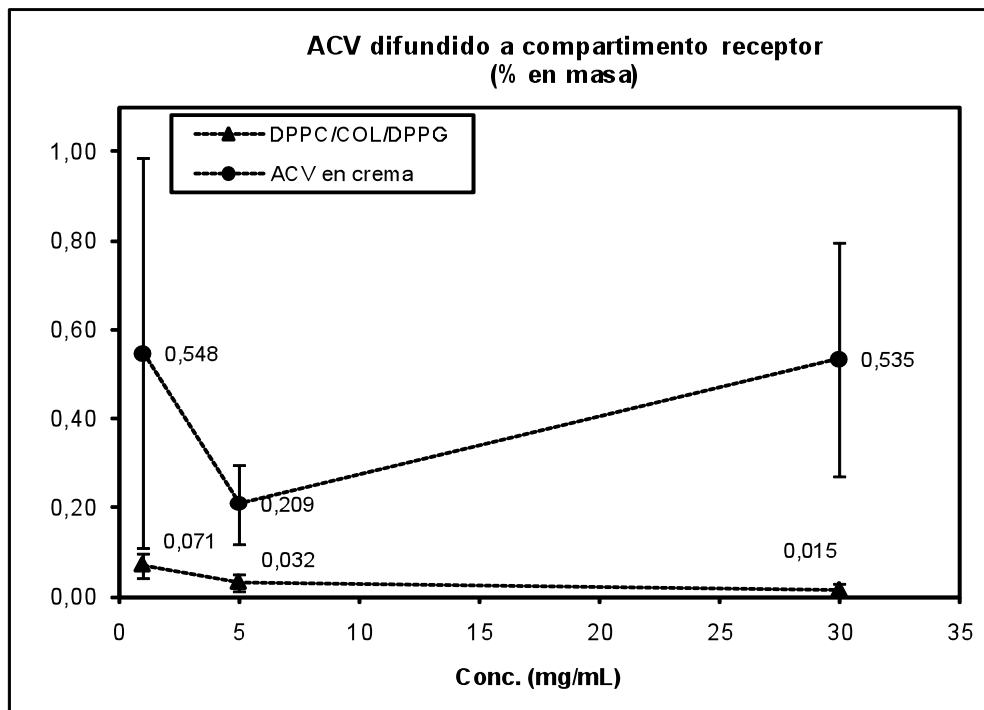


Fig. 67. ACV difundido a compartimento receptor a partir de formulaciones con diferente concentración de principio activo (1 mg/mL, 5 mg/mL y 30 mg/ml). Barras de error: intervalo de confianza ($p=0,05$). $n = 6$ equivalente a dos ensayos.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE DATOS

Los resultados obtenidos en este estudio no demostraron de una forma clara una relación directa entre la acumulación cutánea de ACV y la concentración de principio activo en la formulación aplicada. Si bien, el valor medio resultante de principio activo acumulado en piel viable, a la concentración de 30 mg/ml, respecto a las concentraciones de 1 y 5 mg/ml, fue aproximadamente 1,5 veces mayor en el caso de la formulación liposómica y 2 veces mayor en el caso de la formulación de ACV en crema.

Los datos cuantificados de ACV en piel viable, fueron significativamente superiores con un 95% de probabilidad para la suspensión liposómica DPPC/COL/DPPG en todas las concentraciones ensayadas (1, 5, 30 mg/mL) respecto al ACV en crema. Cabe destacar que estas diferencias se acentuaron tanto más cuanto mayores fueron las concentraciones de aciclovir. Respecto a los datos de ACV difundidos a receptor, fueron significativamente inferiores con un 95% de probabilidad para la suspensión de liposomas DPPC/COL/DPPG con el principio activo encapsulado frente a la formulación crema en todas las concentraciones de ACV ensayadas. Al igual que en los estudios anteriores (ver apartado **IV.5.3.**) los datos obtenidos podrían indicar una retención del principio activo en piel.

A modo de resumen:

- Entre las formulaciones estudiadas con diferente concentración de principio activo (1, 5, 30 mg/mL), se ha obtenido los mayores valores medios de ACV acumulado en piel viable a partir de la suspensión liposómica DPPC/COL/DPPG y la formulación de ACV crema a la concentración de 30 mg/mL. Sin embargo, teniendo en cuenta la variabilidad de los datos que acompaña siempre a este tipo de estudios, no ha quedado demostrada de forma clara una relación directa entre la concentración de ACV en la formulación y su acumulación en piel.

IV.5.5.

Acumulación en piel viable: Influencia del tamaño y lamelaridad de la vesícula con DPPC/COL/DPPG

En ensayos de difusión previos no se observaron diferencias significativas respecto a la acumulación de ACV en piel (estrato córneo + piel viable) entre liposomas OLV y LUV en las diversas composiciones lipídicas ensayadas. Con el objetivo de conocer, si podría existir tal diferencia en el reparto de ACV a piel viable (donde se encuentra la zona de acción del ACV) y su posterior difusión a receptor, se realizaron la siguiente batería de ensayos de difusión a partir de liposomas OLV y LUV con el principio activo encapsulado, preparados mediante dispersión mecánica según se describe en apartado **III.3.2.1**. Basándonos en los valores medios cuantificados en piel viable en ensayos anteriores (**IV.5.3**), la bicapa lipídica seleccionada en estos ensayos fue la DPPC/COL/DPPG (60/40/10)(mol/mol/mol). Tras finalizar los ensayos de difusión, y antes de iniciar la extracción cutánea del principio activo, se retiró el estrato córneo de la piel mediante 12 “stripping” obteniendo así, la piel viable. La extracción del ACV del área de piel permeada se realizó con NaOH 0,5N a 50°C, siguiendo el método descrito en apartado **III.4.2.4.4**. Los datos cuantificados de ACV en piel viable y difundido a compartimento receptor a partir de vesículas, se compararon con los resultados obtenidos con la formulación crema (preparada según apartado **III.4.3.4.5**) en ensayos de difusión realizados con las mismos parámetros de trabajo.

Descripción de ensayos

- Difusión de liposomas OLV-DPPC/COL/DPPG con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas LUV-DPPC/COL/DPPG con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión de ACV en crema.

Caracterización físico química de los liposomas

Comp (relación molar)	Tipo	Lip total (M)	Z-ave (nm)	I.P.	ζ (mV)	E.E
DPPC/COL/DPPG (60/40/10)	OLV	0,043	568,1± 3,1	0,285 ± 0,012	-24,6 ± 1,1	19,3
DPPC/COL/DPPG (60/40/10)	LUV	0,060	207,4 ± 2,2	0,045 ± 0,029	-28,5 ± 1,2	13,8

Tabla 66. Parámetros fisicoquímicos obtenidos a partir de liposomas OLV/ LUV de composición DPPC/COL/DPPG (60/40/10) (mol/mol/mol) con ACV encapsulado. Valores medios ± desv. est. de tres determinaciones.

Las condiciones de preparación de las formulaciones de estudio se detallan en el apartado **III.4.3.4.5.**

Variables experimentales comunes

Los parámetros de trabajo seleccionados que se mantuvieron constantes en la realización de todos los estudios de difusión fueron las siguientes:

- Membrana de difusión: piel dorsal ratón sin pelo
- Condiciones no oclusivas
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32°C
- Concentración de principio activo en formulación donadora (C_0): 5000 µg/mL
- Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,2ml
- Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 1000 µg
- Solución receptora: solución amortiguadora fosfato salina PBS
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 0,5 mL/h
- Duración del ensayo: 16h
- Número de celdas por ensayo (n): 3
- Nº de ensayos por formulación: 2 (Total: n= 6 celdas).
- Tiempo recogida receptores (t): 16h

RESULTADOS

La cantidad de ACV acumulado en piel viable (12 stripping) de ratón sin pelo y difundido a compartimento receptor se recoge en la **Fig. 68.**

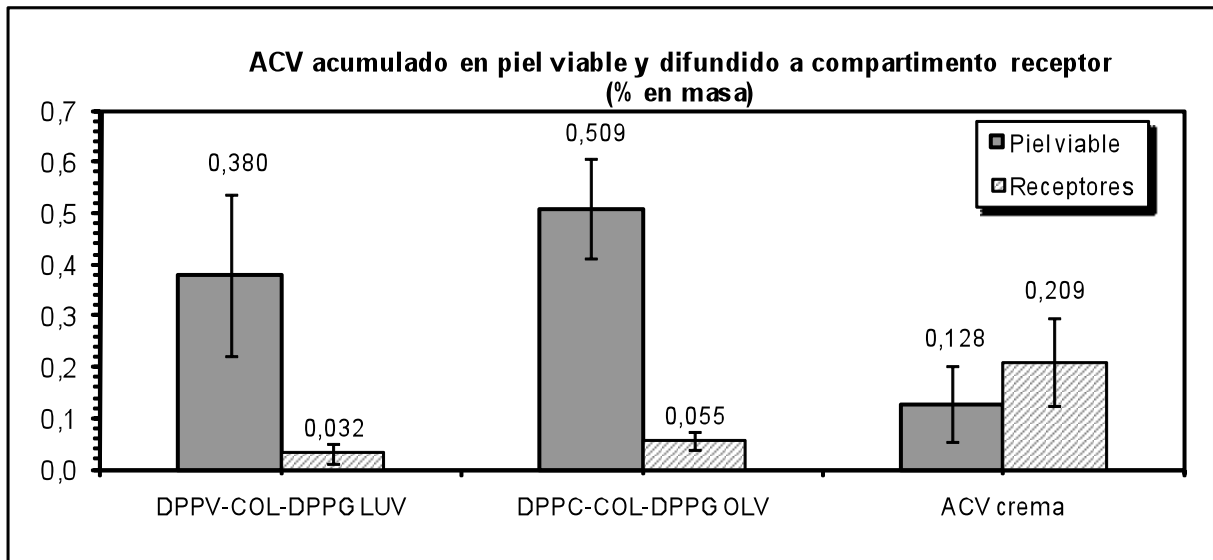


Fig. 68. ACV acumulado en piel viable (12 stripping) de ratón sin pelo y difundido a compartimento receptor expresado en % con respecto a Q_0 . Barras de error: intervalo de confianza ($p=0,05$). $n=6$ equivalente a dos ensayos.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE DATOS

La influencia del tamaño de vesícula en la acumulación de principios activos en piel es un tema de controversia (ver capítulo **IV.5.2**). Los resultados obtenidos no demostraron diferencias significativas con un 95% de probabilidad entre liposomas OLV y LUV, respecto a la cantidad de principio activo acumulado en piel viable y difundido a receptor. Al igual que en estudios previos (**IV.5.3**), se observó respecto a la formulación de ACV en crema una acumulación cutánea de principio activo significativamente superior a partir de vesículas DPPC/DPPG/COL, y una menor cesión de ACV al compartimento receptor con dicha formulación liposómica.

A modo de resumen:

- El tamaño de las vesículas no es un parámetro crítico en la acumulación de ACV en piel viable de ratón sin pelo y su difusión al compartimento receptor.

IV.5.6.

**Acumulación en piel viable: estudios
de difusión *in vivo* / *ex vivo***

La aplicación de ensayos *in vivo* - *ex vivo* en el presente trabajo experimental tiene como fundamento la estimación de la concentración efectiva de principio activo en la capa basal de la epidermis, zona de acción del ACV, y la predicción de la eficacia antiviral de la formulación en estudio siguiendo los modelos matemáticos descritos por Higuchi y colaboradores (Lee P.H., *et al.*, 1993) según se detalla en el apartado correspondiente **III.4.1.6**. Cada ensayo consta de una fase *in vivo* en la que se aplica la formulación siguiendo un régimen múltiple de dosis finitas seguido de una fase *ex vivo*, empleando las celdas de difusión *in vitro*, donde se realiza la última aplicación cutánea y se recoge el principio activo difundido a receptor en intervalos de tiempo determinados (método detallado en páginas 150-151). Se prepararon para estos ensayos suspensiones de liposomas LUV, con el principio activo encapsulado en vesículas mediante dispersión mecánica según descrito en apartado **III.3.2.1**, La bicapa lipídica seleccionada fue DPPC/COL/DPPG (60/40/10) (mol/mol/mol) basándonos en los valores medios cuantificados en piel viable en ensayos anteriores (**IV.5.3**). Tras finalizar los ensayos de difusión *ex vivo*, y antes de iniciar la extracción cutánea del principio activo, se retiró el estrato córneo de la piel mediante 12 “stripping” obteniendo así, la piel viable. La extracción del ACV del área de piel permeada se realizó con NaOH 0,5N a 50°C, siguiendo el método descrito en apartado **III.4.2.4.4**. Los datos cuantificados de ACV en piel viable y difundidos a compartimento receptor a partir de vesículas, se compararon con los resultados obtenidos con la formulación crema (preparadas según apartado **III.4.3.4.6**) en ensayos de difusión *in vivo-ex vivo* realizados con las mismos parámetros de trabajo.

Descripción de ensayos

- Difusión *in vivo/ex vivo* de liposomas LUV- DPPC/COL/DPPG con ACVNa encapsulado formulados en suspensión.
- Difusión *in vivo/ex vivo* de ACV en crema.

Caracterización físico química de los liposomas

Comp. (relación molar)	Tipo	Lip total (M)	Z-ave (nm)	I.P.	ζ (mV)	E.E
DPPC/COL/DPPG (60/40/10)	LUV	0,180	224,5 ± 0,6	0,015 ± 0,009	-18,2 ± 1,5	18,2
DPPC/COL/DPPG (60/40/10)	LUV	0,220	226,0 ± 1,2	0,078 ± 0,069	-12,2 ± 2,1	18,6
DPPC/COL/DPPG (60/40/10)	LUV	0,188	210,4 ± 2,0	0,034 ± 0,021	-17,5 ± 1,1	19,9

Tabla 67. Parámetros fisicoquímicos obtenidos a partir de liposomas LUV de composición DPPC/COL/DPPG (60/40/10) (mol/mol/mol). Valores medios ± desv. est. de tres determinaciones.

Las condiciones de preparación de las formulaciones de estudio se detallan en el apartado **III.4.3.4.6.**

Variables experimentales comunes

Los parámetros de trabajo seleccionados que se mantuvieron constantes en la realización de todos los estudios de difusión fueron los siguientes:

- Ensayo *in vivo*:
 - N° de aplicaciones: 3, a las 0, 8 y 24 h
 - Cantidad aplicada de muestra sobre piel dorsal (Q_m): 0,03mL/aplicación
 - Sacrificio de animales: 32 h

- Ensayo *ex vivo*
 - Membrana de difusión: piel dorsal ratón sin pelo
 - Condiciones no oclusivas
 - Aplicación de la dosis: 32 h
 - Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana):32°C
 - Concentración de principio activo en formulación donadora (C_0): 20000 μ g/mL
 - Cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m): 0,05 (mL/ o g)
 - Cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0): 1000 μ g
 - Solución receptora: solución amortiguadora fosfato salina PBS
 - Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 0,5 mL/h
 - Duración del ensayo: 16h
 - Número de celdas por ensayo (n):3
 - N° de ensayos por formulación: 3 (total: n= 9 celdas).

- Tiempo recogida receptores (t): Cada cuatro horas

Durante la realización de este tipo de ensayos, antes de colocar la suspensión de liposomas en el compartimento donador, se cuantificó la muestra recogida en el compartimento receptor durante el periodo de acondicionamiento de las pieles en las celdas de difusión.

RESULTADOS

La cantidad de ACV acumulado en piel viable (12 stripping) de ratón sin pelo y difundido a compartimento receptor por cada tiempo de muestreo se recoge se recoge en la **Fig. 69.** y **Fig. 70.**

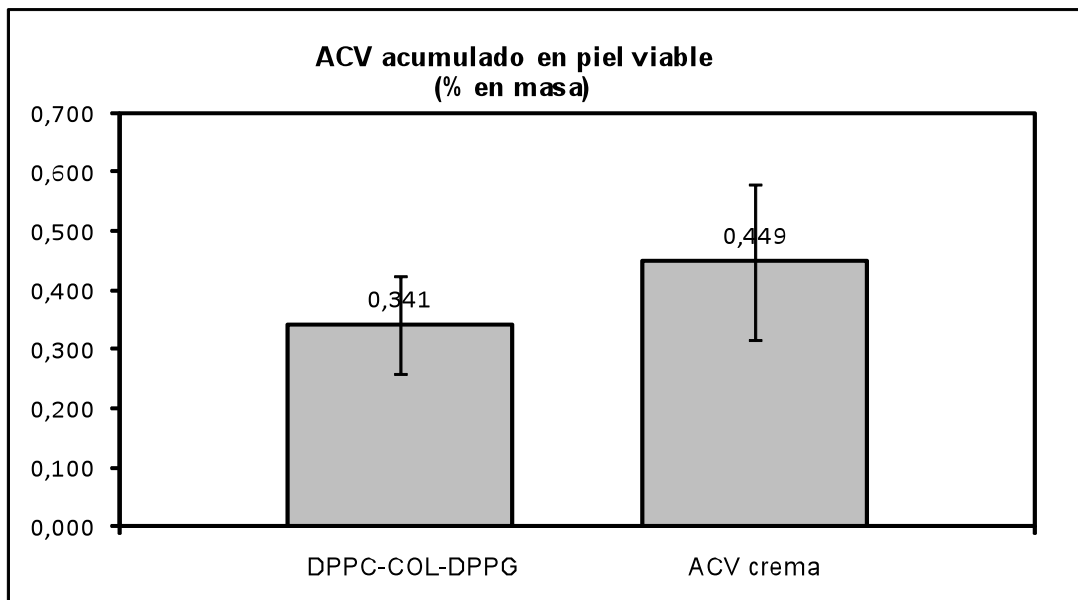


Fig. 69. ACV acumulado en piel viable (12 stripping) de ratón sin pelo tras finalizar ensayo in vivo/ex vivo. Barras de error: intervalo de confianza ($p= 0,05$). $n = 9$ equivalente a tres ensayos.

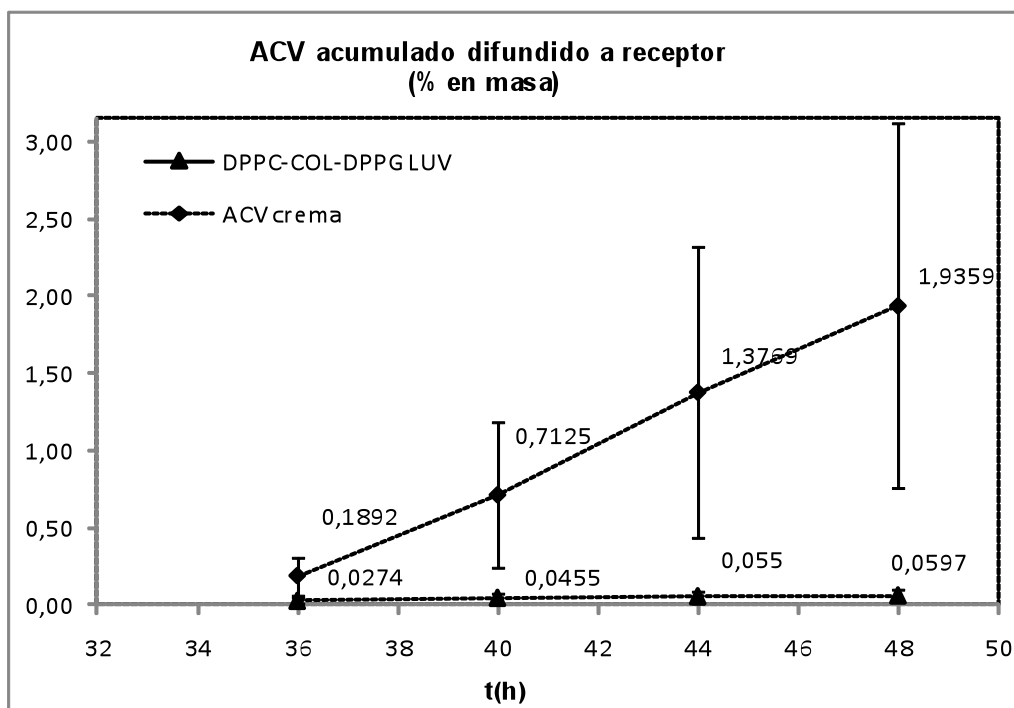


Fig. 70. ACV difundido a compartimento receptor por cada tiempo de muestreo tras finalizar ensayo *in vivo/ex vivo*. Barras de error: intervalo de confianza ($p=0,05$). $n = 9$ equivalente a tres ensayos.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS DATOS

Tras la finalización del ensayo *in vitro/ex vivo*, el retardo observado en la difusión de principio activo a receptor a partir de la formulación liposómica DPPC-COL-DPPG empleando un régimen múltiple de dosis finitas, respecto a la formulación de ACV crema sugiere, al igual que en estudios previos, que las vesículas DPPC-COL-DPPG o sus componentes pueden actuar como reservorio del ACV en la piel viable.

En el estudio actual, la estimación de concentraciones eficaces de ACV en la capa basal de la epidermis (C^*), de acuerdo a las C^* establecidas por Higuchi y colaboradores (Lee, P.H, *et al.*, 1993), (Patel, P.J., *et al.*, 1996), (Mehta, S.C., *et al.*, 1997), para la formulación liposómica DPPC-COL-DPPG no se considera válida, ya que la retención observada del principio activo ACV en piel a partir dicha formulación, modifica el coeficiente de permeabilidad (K_p) del principio activo respecto a la solución de ACV libre. Altas concentraciones de ACV en la capa basal de la epidermis son necesarias si se quiere conseguir una máxima inhibición de la replicación viral (Spruance, S., *et al.*, 1990), debido al

mecanismo de acción del ACV. Por ello, una cesión mantenida del principio activo al tejido diana podría ser relevante en el tratamiento antiviral.

A modo de resumen:

- La estimación de concentraciones eficaces de ACV en la capa basal de la epidermis (C*) basándonos en el método *in vivo/ ex vivo* desarrollado por Higuchi y colaboradores no es válida para la formulación liposómica DPPC-COL-DPPG con ACV encapsulado. La retención observada en piel viable del ACV a partir de dicha formulación modifica el coeficiente de permeabilidad (Kp) del principio activo respecto a la solución de ACV libre.

IV.6.

ESTUDIOS DE DIFUSIÓN A TRAVÉS DE PIEL HUMANA

La última batería de ensayos de difusión *in vitro* en la memoria de tesis actual se ha realizado utilizando piel humana, y evitando, de este modo, la extrapolación de datos de un modelo animal. En ensayos anteriores se ha demostrado con el empleo de formulaciones liposómicas, el transporte a la piel del ACV tanto encapsulado en vesículas como libre en el medio de dispersión. Así, con el principio activo no encapsulado, se quiere conseguir que el ACV difunda rápidamente a la capa basal de la epidermis, mientras que con el principio activo encapsulado se busca un efecto acumulativo del ACV en piel (ver estudio **IV.5.3**). Se prepararon mediante dispersión mecánica suspensiones de liposomas LUV y geles liposómicos (concentración de agente gelificante del 0,5%) ambos con el principio activo encapsulado en las vesículas y libre en el medio de dispersión según descrito en apartados **III.3.2.1.** y **III.3.2.3** respectivamente. Considerando que el estado fluido de las vesículas favorece el reparto cutáneo del ACV (ver estudio **IV.5.2.**), las bicapas lipídicas seleccionadas en estos ensayos fueron de composición POPC y DOPC, con una baja temperatura crítica de transición. Debido a la importancia de conocer la penetración cutánea del ACV a diferentes profundidades de la piel, una vez finalizados los ensayos, se cortó la piel en láminas mediante un criotomo según se describe en apartado **III.4.2.4.5** y se cuantificó la cantidad de principio acumulada en láminas de piel desde 20 μm a 160 μm englobando estrato córneo y epidermis. Los datos cuantificados de ACV en piel se compararon con los resultados obtenidos con la formulación comercial en ensayos de difusión realizados utilizando con el mismo tipo de membrana de difusión, piel humana.

Descripción de ensayos

- Difusión de liposomas LUV- POPC con ACV encapsulado y ACV libre formulados en suspensión.
- Difusión de una suspensión de liposomas LUV-DOPC con ACV encapsulado y ACV libre formulados en suspensión.
- Difusión de liposomas LUV-POPC con ACV encapsulado y ACV libre formulados en gel.
- Difusión de liposomas LUV- DOPC con ACV encapsulado y ACV libre formulados en gel.
- Difusión de la formulación comercial.

Caracterización Físico Química de los liposomas

Formulación	Composición	Tipo	[Lipido] (mM)	Z-ave (nm)	I.P.
Suspensión	POPC	LUV	34,12	176 ± 3	0,223 ± 0,011
Suspensión	DOPC	LUV	33,00	140 ± 11	0,119 ± 0,023

Tabla 68. Parámetros fisicoquímicos obtenidos a partir de liposomas LUV de diferentes composiciones con ACV encapsulado o libre. Valores medios ± desv. est. de tres determinaciones.

Las condiciones de preparación de las formulaciones de estudio se detallan en el apartado **III.4.3.5.**

Variables experimentales comunes

Los parámetros de trabajo seleccionados en la realización de todos los estudios de difusión fueron las siguientes:

- Membrana de difusión: piel humana abdominal
- Condiciones no oclusivas
- Temperatura (en el compartimento donador y superficie de la membrana): 32° C
- Solución receptora: solución amortiguadora fosfato salina PBS
- Flujo de líquido receptor (F_{rec}): 2 mL/h
- Duración del ensayo: 24h
- Número de celdas por ensayo (n): 3
- N° de ensayos por formulación: 1 (total: n= 3 celdas).
- Tiempo recogida receptores (t): 16h

Formulación	C_0 (mg/mL)	Q_m (g o mL)	Q_0 (µg)
LUV POPC ACV encaps. + libre	2,92	0,200 ± 0,000	584 ± 0,000
LUV DOPC ACV encaps. + libre	3	0,200 ± 0,000	600 ± 0,000
Gel LUV POPC ACV encaps. + libre	2,92	0,089 ± 0,005	325,6 ± 8,610
Gel LUV DOPC ACV encaps. + libre	3	0,091 ± 0,003	327,7 ± 11,20
Comercial	53,7	0,019 ± 0,011	1010,8 ± 576,7

Tabla 69. Datos resultantes (media ± desv.std) de concentración de principio activo en la formulación donadora (C_0), cantidad aplicada de muestra en el compartimento donador (Q_m), y cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q_0).

RESULTADOS

La cantidad de ACV acumulado en láminas de piel humana, de 20 μm de espesor, hasta una profundidad de 160 μm se recoge en la **Fig. 71**.

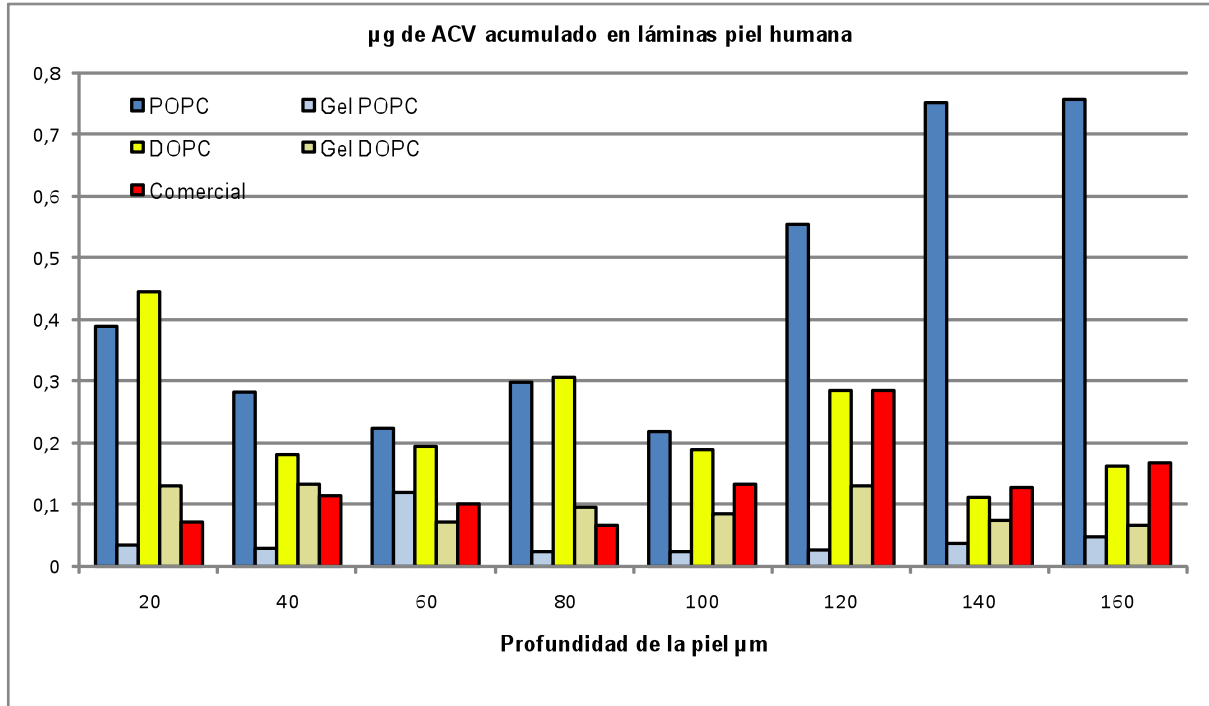


Fig. 71. Cantidades de ACV detectadas en cortes histológicos de la piel humana de 20 μm de espesor, hasta una profundidad de 160 μm . Valores medios, $n = 3$ equivalente a 1 ensayo.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS DATOS

La eficacia terapéutica de un principio activo en piel a menudo depende de crear una concentración suficiente de dicho agente en la epidermis viable y/o dermis (Touitou, E., *et al.*, 1994b). Por otra parte, el estrato córneo funciona como reservorio de principios activos. De este modo, a partir de principios activos acumulados en la capa córnea se puede mantener un reparto de los mismos a capas más profundas de la piel en tiempos posteriores a la aplicación inicial (Rougier, A., *et al.*, 1987), (Sheth, N.V., *et al.*, 1987). La importancia de la acumulación de una molécula en una determinada capa cutánea ha llevado a diversos autores a estudiar la absorción de principios activos en diferentes profundidades de la piel (Du Plessis, J., *et al.*, 1994a), (Touitou, E *et al.*, 1994a), (Verma, D.D., *et al.*, 2003b), (Puglia, C., *et al.*, 2010). En el estudio actual, la gran variabilidad obtenida en los datos de los ensayos llevados a cabo, debido a las características del ensayo y el tipo de piel utilizada, no permitió

conocer si existía una mayor acumulación del principio activo en el estrato córneo o epidermis viable, sin embargo si consideramos los valores medios cuantificados en láminas de piel (**Fig. 71**) se observa que con la formulación POPC se acumula, dentro del rango estudiado, mayor cantidad de ACV en las láminas cutáneas de mayor profundidad.

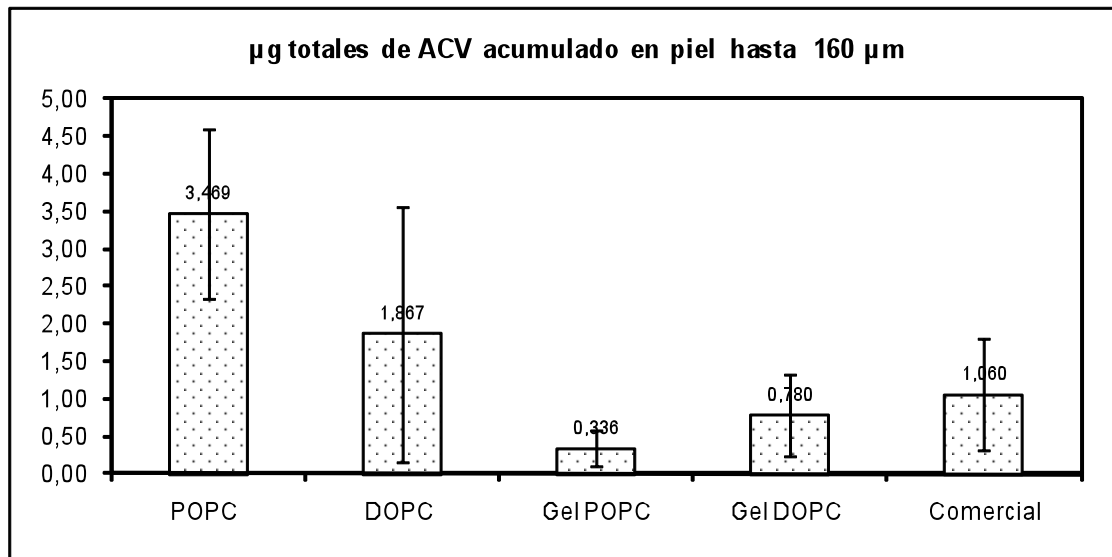


Fig. 72. ACV acumulado en piel humana hasta una profundidad de 160 µm. Barras de error: intervalo de confianza ($p=0,05$). $n=3$ equivalente a 1 ensayo.

Cabe destacar también en este estudio los mayores valores medios cuantificados de ACV en el total de láminas de piel (hasta una profundidad de 160 µm), a partir de las suspensiones de liposomas respecto a la formulación comercial (**Fig.72**). Dichos valores fueron además significativamente superiores para las vesículas constituidas por la bicapa lipídica de POPC. Estos datos indicarían una mejora en el reparto tópico de ACV al comparar las suspensiones liposómicas en estudio frente a sistemas convencionales, teniendo en cuenta el alto contenido en la formulación comercial de propilenglicol (40%), promotor de la penetración utilizado en formulaciones tópicas de ACV (Trottet, L., *et al.*, 2005). Igualmente hay que destacar que si comparamos los resultados de principio activo en piel según los µg inicialmente dispuestos (**Tabla 70**), se aprecia también una mayor acumulación cutánea de ACV en Gel DOPC frente a la formulación comercial.

Formulación	Q ₀ (µg)	µg en piel 160 µm	% Q ₀ en piel
Gel LUV POPC ACV encap. + libre	325,6± 8,610	0,336 ± 0,240	0,103 ± 0,073
Gel LUV DOPC ACV encap. + libre	327,7± 11,20	0,780 ± 0,481	0,238 ± 0,147
Comercial	1010,8 ± 576,7	1,060 ± 0,663	0,105 ± 0,066

Tabla 70. Datos resultantes de ACV acumulado en piel humana hasta una profundidad de 160 µm y en porcentaje respecto a la cantidad aplicada inicialmente de principio activo (Q₀)

Por otra parte, la menor acumulación de ACV en el total de láminas de piel a partir de geles liposómicos frente a suspensiones liposómicas, considerando los valores medios cuantificados, pudiera estar relacionada con la capacidad de retención de la estructura constatada en estudios anteriores (ver apartado **IV.3**).

A modo de resumen:

- Los resultados obtenidos demuestran un reparto tópico más favorable del principio activo ACV a partir de las suspensiones de liposomas en estudio, especialmente POPC, con la que se alcanzan niveles de ACV acumulados en piel humana (a una profundidad de 160 µm) hasta 3 veces superiores que los alcanzados con la formulación comercial de referencia. Dichos resultados justificarían continuar con el estudio del desarrollo de una formulación tópica de ACV a partir de un sistema liposómico. También hay que destacar, considerando los datos de ACV en porcentaje, la mayor acumulación en piel en gel DOPC frente a la formulación comercial.
- La mayor acumulación de principio activo en piel a partir vesículas LUV de DOPC y POPC formuladas como suspensión frente a las mismas vesículas formuladas como gel, indican el empleo favorable de suspensiones liposómicas en la aplicación tópica de principios activos frente a geles liposómicos. Este hecho se relaciona con la capacidad de retención del gel constatada en estudios anteriores.

V.

CONCLUSIONES

- 1- Las bicapas lipídicas fluidas DOPC y POPC presentan una mayor permeabilidad a la difusión del ACV encapsulado que la observada con la bicapa lipídica rígida H-SPC/COL a la temperatura experimental de 32 °C. La difusión de ACV resultó ser más rápida con la DOPC, que presenta menor temperatura de transición de fase (T_c), siendo por tanto más fluida.
- 2- Se ha demostrado que el polímero Carbopol®- 980 a las concentraciones de 0,5, 1 y 1,5% (p/p) constituye una barrera significativa a la difusión del ACV. El aumento de la viscosidad en el gel propiciado por el aumento de la proporción de polímero gelificante ralentiza la difusión del ACV a través de dicha estructura polimérica. Por consiguiente, se selecciona la concentración más baja (0,5 %) para el desarrollo de una formulación liposómica de aplicación tópica, ya que confiere una consistencia adecuada a la formulación y permite la difusión de principio activo ACV a través de su estructura. La incorporación de liposomas DOPC y POPC en geles de Carbopol®, conlleva un retardo en la difusión del principio activo. Se demuestra la existencia de dos barreras a dicha difusión en este tipo de sistema, la bicapa lipídica y la estructura gel.
- 3- El empleo de la membrana de PDMS como modelo de piel artificial en ensayos de difusión *in vitro* proporciona valores de ACV acumulado en piel favorables al desarrollo de una formulación liposómica de ACV, al no obtenerse diferencias significativas entre la suspensión de liposomas POPC en estudio y la formulación comercial de referencia, que incluye promotores de la penetración y dosis de ACV muy superiores.
- 4- La mayor acumulación de ACV en piel de ratón sin pelo hallada a partir de liposomas vacíos con principio activo libre, respecto a la disolución de ACV y a la formulación en crema con las composiciones DOPC, POPC y DPPC/COL/SA (sólo OLV) nos indica un posible efecto promotor de la penetración de dichos sistemas vesiculares. Este efecto fue encontrado también en los ensayos realizados a partir de liposomas con ACV encapsulado de composición DOPC, POPC, POPC/DPPG, DPPC/COL y DPPC/COL/DPPG. Estos datos nos permiten demostrar la capacidad de dichas vesículas para incidir favorablemente sobre el proceso de reparto formulación/piel de principios activos hidrofílicos, y su mejora respecto a sistemas convencionales. Los datos de acumulación en piel de ACV tanto a partir de liposomas con principio activo libre como encapsulado, justifican la conveniencia de elaborar formulaciones liposómicas en las que dicho principio activo se encuentre, tanto

encapsulado, como libre en el medio de dispersión no debiendo retirarse el ACV no encapsulado una vez elaborados los liposomas.

- 5- El estado termodinámico de la bicapa lipídica que constituye el liposoma influye en el reparto de ACV en piel de ratón sin pelo, siendo dicho reparto más favorable a la piel con aquellas bicapas más fluidas a la temperatura fisiológica. Así lo demuestran las diferencias observadas respecto al ACV acumulado en piel en bicapas DOPC frente a las de menor fluidez DOPC/DPPG. Por otra parte, se ha demostrado que el tamaño de las vesículas, la presencia de carga en la superficie, y la eficiencia de encapsulación, no son parámetros críticos en la acumulación cutánea de dicho principio activo. Cabe destacar, que una disminución en el tamaño de las vesículas no implica un aumento de la cantidad de ACV acumulado en piel, hecho que sugiere que el mecanismo de interacción entre liposomas y piel, no conlleva un simple paso intacto de vesículas, debiendo explicar dicha interacción a través de mecanismos más complejos.
- 6- El análisis de los datos de difusión de ACV al compartimento receptor en los ensayos con piel de ratón sin pelo nos permitió hallar diferencias significativas entre formulaciones liposómicas con ACV encapsulado y en forma libre. El retardo observado en la difusión del principio activo con liposomas DPPC/COL/DPPG y POPC con ACV encapsulado, respecto a liposomas POPC con ACV libre y a la formulación en crema, nos indica un efecto de retención en piel del principio activo, lo que podría suponer la formación de un reservorio cutáneo que favorece una cesión prolongada del ACV a su zona de diana de actuación, la capa basal de la epidermis. Por otro lado, se demuestra una difusión rápida de principio activo al compartimento receptor a partir de formulaciones con ACV libre. Este hecho demuestra que las formulaciones liposómicas con ACV libre y encapsulado presentan una difusión inicial en virtud de la cual el principio activo alcanza el órgano diana a gran velocidad, y una segunda fase en la que se forma un reservorio de principio activo en dicha zona gracias a las vesículas formuladas.
- 7- El tamaño y lamellaridad de las vesículas (OLV o LUV) no es un parámetro crítico en la acumulación de ACV en piel viable y su difusión al compartimento receptor, como indican los resultados obtenidos en piel de ratón sin pelo a partir de la suspensión de liposomas DPPC/COL/DPPG con ACV encapsulado.

- 8- A partir de los resultados obtenidos se ha demostrado que la estimación de concentraciones eficaces de ACV en la capa basal de la epidermis (C^*) basándonos en el método *in vivo* / *ex vivo* de Higuchi a partir de los datos de principio activo difundido al compartimento receptor no es un planteamiento válido en el estudio de la penetración en piel con las formulaciones liposómicas propuestas. Este hecho nos induce a pensar que los componentes de la bicapa son capaces de atravesar la barrera del estrato córneo y propiciar la acumulación del ACV en piel. La retención observada en piel viable del ACV a partir de dicha formulación modifica el coeficiente de permeabilidad (K_p) del principio activo respecto a la solución de ACV libre.
- 9- Los resultados obtenidos en ensayos de difusión con piel humana nos han permitido detectar un mayor fenómeno de acumulación de principio activo en piel a partir vesículas de DOPC y POPC con ACV encapsulado y libre, formuladas como suspensión frente a las mismas vesículas formuladas como gel. Este hecho se relaciona con la capacidad de retención del sistema gel previamente estudiado.
- 10- Se han observado características de reparto de ACV entre formulación y piel humana más favorables hacia la piel a partir de las suspensiones de liposomas POPC y DOPC con ACV encapsulado y libre. Cabe destacar la composición POPC, bicapa lipídica más fluida, con la que se alcanzan niveles de ACV acumulados en piel a una profundidad de 160 μm (que engloba el estrato córneo y epidermis viable) hasta 3 veces superiores que los alcanzados con la formulación comercial de referencia. Los resultados obtenidos nos permiten demostrar la utilidad de los sistemas vesiculares diseñados, en cuanto a su capacidad de promoción de la penetración del antiviral aciclovir a través de piel. Este efecto se traduce en la capacidad de incrementar de manera eficaz su concentración en el órgano diana de acción, la capa basal de la epidermis. Estos datos justifican continuar con el estudio del desarrollo de una formulación tópica de ACV a partir de una suspensión liposómica constituida por una bicapa lipídica fluida, que presente el ACV encapsulado y libre en el medio de dispersión.

VI.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, S.A., Edwards, K., Karlsson, G., Hudon, N., Mayer, L.D., Bally, M.B. (2004). An evaluation of transmembrane ion gradient-mediated encapsulation of topotecan within liposomes. *Journal of Controlled Release* 96, 449-461.
- Afouna, M.I., Mehta, S.C., Ghanem, A-H., Higuchi, W.I., Kern, E.R., Declercq, E., El-Shattawy, H.H. (1999). Influence of the treatment protocol upon the in vivo efficacy of cidofovir (HPMPC) and of acyclovir (ACV) formulations in topical treatment of cutaneous HSV-1 infection in hairless mice. *Journal of Pharmaceuticals Sciences* 88, 5, 530-534.
- Akomeah, F.K., Martin, G.P., Muddle, A.G., Brown, M.B. (2008). Effect of abrasion induced by a rotating brush on the skin permeation of solutes with varying physicochemical properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68, 724-734.
- Alarcón, A. (2001). Estudios de la interacción entre polímeros y bicapas fosfolípidos mediante difracción de rayos-x a alto y bajo ángulo. Tesina de licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.
- Artman, C., Röding, J., Ghyczy, M., Pratzel, H.G. (1990). Liposomes from soya phospholipids as percutaneous drug carriers: quantitative in vivo investigations with radioactivity labelled liposomes. *Arzneimittelforschung* 40 (12), 1365-1368.
- Babu, R.J., Kanikkannan, N., Kikwai, L., Ortega, C., Andega, S., Ball, K., Yim, S., Singh, M. (2003). The influence of various methods of cold storage of skin on the permeation of melatonin and nimesulide. *Journal of Controlled Release* 86, 49-57.
- Bangham, A.D., Standish, M.M., Watkins, J.C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 13, 238-252.
- Bardsley, W.G. The Simfit Reference Manual, <http://www.simfit.man.ac.uk>.
- Barry, B.W. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 14, 101-114.
- Bartlett G.R. (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *The Journal of Biological Chemistry* 234, 466-468.
- Berger, N., Sachse, A., Bender, J., Schubert, R., Brandl, M. (2001). Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International Journal of Pharmaceutics* 223, 55-68.
- Bermejo, C.L., Payá Cuenca, C.V. Enfermedades producidas por virus, En: Teixidor, J.R., Massó, J.G. (eds). *Medicina interna*, Masson, S.A., Barcelona, 2004, Vol 1, parte XII, pp 1798- 1808.
- Betz, G., Imboden, R., Imanidis, G. (2001). Interaction of liposome formulations with human skin in vitro. *International Journal of Pharmaceutics* 229, 117-129.
- Bhatia, A. (2004). Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 7 (2), 252-259.

Bond, J.R., Barry, B.W. (1988). Limitations of hairless mouse skin as a model for in vitro permeation studies through human skin: hydration damage. *Journal of investigative Dermatology* 90, 486-489.

Bouwstra, J.A., Honeywell-Nguyen, P.L., Gooris, G.S., Ponc, M. (2003). Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research* 42, 1-36.

Brain, K.R., Walters, K.A., Watkinson, A.C. Investigation of skin permeation in vitro, En: Roberts, M.S. and Walters K.A.(eds), *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1998, pp 161-187.

Brandl, M. (2001). Liposomes as drug carriers: a technological approach. *Biotechnology Annual Review* 7, 59-85.

Bravo, A. (2001). Estudios de solubilidad de un agente antiviral. Métodos analíticos de cuantificación. Tesina de licenciatura. Universidad Complutende de Madrid.

Bronaugh, R.L., Stewart R.F (1985). Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow- through diffusion cell. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 74 (1), 64-67.

Bronaugh R.L., Stewart, R.F., Simon, M. (1986). Methods for in vitro percutaneous absorption studies VII: use of excised human skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 75 (11), 1094-1097.

Bronaugh, R.L. Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques, En: Bronaugh, R.L., Maibach, H.I. (eds), *Percutaneous Absorption, Mechanisms-Methodology, Drug delivery*, Marcel Dekker, Inc, New York, 1989, pp 239-258.

Bronaugh, R.L., Hood, H.L., Kraeling M.E.K., Yourick, J.J. Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques, En: Bronaugh, R.L. and Maibach, H.I. (eds), *Percutaneous Absorption, Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, Marcel Dekker, Inc, New York, 1999, pp 229-233.

Budai, L., Hajdú, M., Budai, M., Gróf, P., Béni, S., Noszál, B., Klebovich, I., Antal, I. (2007). Gels and liposomes in optimized ocular drug delivery: Studies on ciprofloxacin formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 343, 34-40.

Burguillo, F.J. Ajuste de ecuaciones a curvas: introducción a la regresión lineal y no lineal. V curso práctico de análisis de datos, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 2004. <http://web.usal.es/~burgui/simfit/ajustecurvas.pdf>.

Caamaño, M.M., García, L.V., Elorza, B., Chantres, J.R. (1999). Improved RPLC determination of acyclovir using hexylamine as silanol masking agent. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21, 619-624.

Carrion, F.J., De la Maza, A., Parra, J.L. (1994). The influence of ionic strength and lipid bilayer charge on the stability of liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science* 164, 78-87.

Cevc, G., Blume, G. (1992). Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochimica et Biophysica Acta* 1104, 226-232.

Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schätzlein, A., Blume, G. (1998). Ultraflexible vesicles, transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1368, 201-215.

Coceani, N., Colombo, I., Grassi, M. (2003). Acyclovir permeation through rat skin: mathematical modelling and in vitro experiments. *International Journal of Pharmaceutics* 254, 197-210.

Coderch, L., Fonollosa, J., De Pera, M., Estelrich, J., De la Maza, A., Parra, J.L. (2000). Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. *Journal of Controlled Release* 68, 85-95.

Córdoba-Díaz, M., Nova, M., Elorza, B., Córdoba-Díaz, D., Chantres, J.R., Córdoba-Borrego, M. (2000). Validation protocol of an automated in-line flow-through diffusion equipment for in vitro permeation studies. *Journal of Controlled Release* 69, 357-367.

Corey, L., Spear, P.G. (1986). Infections with Herpes simplex viruses. *The New England Journal of Medicine* 13, 686-691.

Departamento Técnico del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. J.05. Antivirales, Uso sistémico, En: CGCOF (eds), Catálogo de medicamentos, Madrid, 2010, pp 1668-1689.

Dos Santos, N., Waterhouse, D., Masin, D., Tardi, P.G., Karlsson, G., Edwards, K., Bally, M.B. (2005). Substantial increases in Idarubicin plasma concentration by liposome encapsulation mediates improved antitumor activity. *Journal of Controlled Release* 105, 89-105.

Du Plessis, J., Ramachandran, C., Weiner, N., Müller, D.G. (1994a). The influence of particle size of liposomes on the deposition of drug into skin. *International Journal of Pharmaceutics* 103, 277-282.

Du Plessis, J., Weiner, N., Müller, D.G. (1994b). The influence of in vivo treatment of skin with liposomes on the topical absorption of a hydrophilic and a hydrophobic drug in vitro. *International Journal of Pharmaceutics* 103, R1-R5.

Dubey, V., Mishra, D., Asthana, A., Jain, N.K. (2006). Transdermal delivery of a pineal hormone: Melatonin via elastic liposomes. *Biomaterials* 27, 3491-3496.

Dubey, V., Mishra, D., Jain, N.K. (2007a). Melatonin loaded ethanolic liposomes: physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 67, 398-405.

Dubey, V., Mishra, D., Dutta, T., Nahar, M., Saraf, D.K., Jain, N.K. (2007b). Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes. *Journal of Controlled Release* 123, 148-154.

Durrheim, H., Flynn, G.L., Higuchi, W.I., Behl, C.R. (1980). Permeation of hairless mouse skin I: experimental methods and comparisons with human epidermal permeation by alkanols. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 69 (7), 781-786.

Edwards, K.A., Baeumner, A.J. (2006). Analysis of liposomes. *Talanta* 68, 1432-1441.

Egbaria, K, Weiner, N. (1990a). Liposomes as a topical drug delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews* 5, 287-300.

Egbaria, K., Ramachandran, C., Kittayanond,D., Weiner, N. (1990b). Topical delivery of liposomally encapsulated interferon evaluated by in vitro diffusion studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34 (1), 107-110.

El Maghraby, G.M., Williams, A.C., Barry, B.W. (1999). Skin delivery of oestradiol from deformable and traditional liposomes: mechanistic studies. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 51, 1123-1134.

El Maghraby, G.M., Williams, A.C., Barry, B.W. (2000). Skin delivery of oestradiol from lipid vesicles: importance of liposome structure. *International Journal of Pharmaceutics* 204, 159-169.

El Maghraby, G.M., Williams, A.C., Barry, B.W. (2001a). Skin delivery of 5-fluorouracil from ultradeformable and standard liposomes in-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53, 1069-1077.

El Maghraby, G.M., Williams, A.C., Barry, B.W. (2001b). Skin hydration and possible shunt route penetration in controlled estradiol delivery from ultradeformable and standard liposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 53, 1311-1322.

El Maghraby, G.M., Williams, A.C., Barry, B.W. (2006). Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin?. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58, 4, 415-429.

El Maghraby, G.M., Barry, B.W. Williams, A.C. (2008). Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutics Sciences* 34, 203-222.

Elias, J.J. The microscopic structure of the epidermis and its derivatives, En: Bronaugh, RL and Maibach, H.I. (Eds), *Percutaneous Absorption, Mechanisms- Methodology- Drug Delivery*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1989, pp 3- 12.

Elion, G.B. (1982). Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *The American Journal of Medicine* 73 (1A), 7-13.

Elorza, B., Elorza, M.A., Sainz, M.C., Chantres, J.R. (1993). Comparison of particle size and encapsulation parameters of three liposomal preparations. *Journal of microencapsulation* 10, 2, 237-248.

Esposito, E., Zanella, C., Cortesi, R., Menegatti, E., Nastruzzi, C. (1998). Influence of liposomal formulation parameters on the in vitro absorption of methyl nicotinate. *International Journal of Pharmaceutics* 172, 255-260.

- Essig, S., Kovar, K.A. (2001). Quantitative determination of phospholipids in a pharmaceutical drug by scanning and video densitometry: planar chromatographic procedures in pharmaceutical analysis. *Journal of AOAC International* 84 (4), 1283-1286.
- Estelrich, J., Gallardo, M. (2000). El potencial Zeta y sus aplicaciones. *Afinidad LVII*, 485, 25-30.
- Foged, C., Nielsen, H.M., Frokjaer, S. (2007). Liposomes for phospholipase A₂ triggered siRNA release: Preparation and *in vitro* test. *International Journal of Pharmaceutics* 331, 160-166.
- Foldvari, M. (2000). Non- invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. *Pharmaceutical Science and Technology Today* 3 (12) 417-425.
- Franz, T.J. (1975). Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. *Journal of Investigative Dermatology* 64, 190-195.
- Fresno Contreras, M.J., Jiménez Soriano, M.M., Ramírez Diéguez, A. (2005). *In vitro* percutaneous absorption of all-trans retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 297, 134-145.
- Fresta, M., Puglisi, G. (1996). Application of liposomes as potential cutaneous drug delivery systems. *In vitro* and *in vivo* investigation with radioactivity labelled vesicles. *Journal of Drug Targeting* 4, 95-101.
- Fritze, A., Hens, F., Kimpfler, A., Schubert, R., Peschka-Süss, R. (2006). Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758, 1633-1640.
- Fry, D.W., White, J.C., Goldman, I. D. (1978). Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution. *Analytical Biochemistry* 90, 809-815.
- Ganesan, M.G, Weiner, N.D., Flynn, G.L., Ho, N.F.H. (1984). Influence of liposomal drug entrapment on percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics* 20, 139-154.
- Gaspar, M.M., Cruz. A., Penha, A.F., Reymão, J., Sousa, A.C., Eleutério, C.V., Domingues, S.A., Fraga, A.G., Filho, A.L., Cruz, M.E.M., Pedrosa, J. (2008). Rifabutin encapsulated in liposomes exhibits increased therapeutic activity in a model of disseminated tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31 (1), 37-45.
- Ghosh, S., Jhanji, V., Lamoureux, E., Taylor, H.R, Vajpayee, R. B. (2008). Acyclovir therapy in prevention of recurrent herpetic keratitis following penetrating keratoplasty . *American Journal of Ophthalmology* 145, 198-202.
- Glavas-Dodov, M., Goracinova, K., Mladenovska, K., Fredro-Kumbaradzi, E. (2002). Release profile of lidocaine HCl from topical liposomal gel formulation. *International Journal of Pharmaceutics* 242, 381-384.
- Gonsho, A., Imanidis, G., Vogt, P., Kern, E.R., Tsuge, H., Su, M-H., Choi, S-H., Higuchi, W.I. (1990). Controlled (trans)dermal delivery of an antiviral agent (acyclovir). I: An *in vivo*

animal model for efficacy evaluation in cutaneous HSV-1 infections. *International Journal of Pharmaceutics* 65, 183-194.

Gupta, M., Goyal, A.K., Paliwal, S.R., Paliwal, R., Mishra, N., Vaidya, B., Dube, D., Jain, S.K., Vyas, S.P. (2010). Development and characterization of effective topical liposomal system for localized treatment of cutaneous candidiasis. *Journal of Liposome Research* 20 (4), 341-350.

Gutiérrez, R. (1998). Estudio del módulo elástico de monocapas de fosfolípidos. Su modificación por agentes con actividad superficial. Tesina de licenciatura. Universidad Complutense de Madrid.

Guy, R.H., Hadgraft, J. (1989). Mathematical models of percutaneous absorption, En: Bronaugh, R.L., Maibach, H.I. (eds), *Percutaneous Absorption, Mechanisms-Methodology-Drug delivery*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp 13- 26.

Hadgraft, J., Wolff, H.M., In vitro/in vivo correlations in transdermal drug delivery, En: Roberts, M.S., Walters, K.A. (eds), *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1998, pp 269-279.

Hadgraft, J. (2001). Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics* 224, 1-18.

Han, I., Kim, M., Kim, J. (2004). Enhanced transfollicular delivery of adriamycin with a liposome and iontophoresis. *Experimental Dermatology* 13 (2), 86-92.

Harrison, D.J., Knutson, K. (1995). Accurate determination of skin flux from flow-through diffusion cell data. *Pharmaceutical Research* 12 (12), 2003-2011.

Hofland, H.E.J., Bouwstra, J.A., Boddé. H.E., Spies, F., Junginger, H.E. (1995). Interactions between liposomes and human stratum corneum in vitro: freeze fracture electron microscopical visualization and small angle X-ray scattering studies. *British Journal of Dermatology* 132, 853-856.

Hojyo-Tomoka, M.T., Kligman, A.M. (1972). Does cellophane tape stripping remove the horny layer?. *Archives of Dermatology* 106, 767-768.

Honeywell-Nguyen, P.L., Bouwstra, J.A. (2005). Vesicles as a tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discovery Today: Technologies* 2 (1), 67-74.

Hope, M.J., Bally, M.B., Webb, G., Cullis, P.R. (1985). Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volumen and ability to maintain a membrane potencial. *Biochimica et Biophysica Acta* 812, 55-65.

Horwitz, E., Pisanty S., Czerninski, R., Helser, M., Eliav, E., Touitou, E. (1999). A clinical evaluation of a novel liposomal carrier for acyclovir in the topical treatment of recurrent herpes labialis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 87, 700-705.

Imanidis, G., Song, W-Q., Lee, P-H, Su, M-H., Kern, E.R., Higuchi, W.I (1994). Estimation of skin target site acyclovir concentrations following controlled (trans)dermal drug delivery in

topical and systemic treatment of cutaneous HSV-1 infections in hairless mice. *Pharmaceutical Research* 11 (7), 1035-1041.

Jain, S., Jain, N., Bhadra, D., Tiwary, A.K., Jain, N.K. (2005). Transdermal delivery of an analgesic agent using elastic liposomes: preparation, characterization and performance evaluation. *Current Drug Delivery* 2, 223-233.

Jiang, M., Qureshi, S., Midha, K., Skelly, J. (1998). In vitro evaluation of percutaneous absorption of an Acyclovir product using intact and tape-stripped human skin. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 1(3), 102-107.

Jones, M.N. (1995). The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation. *Advances in Colloid and Interface Science* 54, 93-128.

Jousma, H., Talsma, H., Spies, F., Joosten, J.G.H., Junginger, H.E., Crommelin, D.J.A. (1987). Characterization of liposomes. The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particle size distribution and number of bilayers. *International Journal of Pharmaceutics* 35, 263-274.

Katare, O.P., Raza, K., Singh, B., Dogra, S. (2010). Novel drug delivery systems in topical treatment of psoriasis: rigors and vigors. *Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology* 76 (6), 612-621.

Kim, C., Shim, J., Han, S., Chang, I. (2002). The skin-permeation-enhancing effect of phosphatidylcholine: caffeine as a model active ingredient. *Journal of Cosmetic Science* 53, 363-374.

Kirjavainen, M., Urtti, A., Jääskeläinen, I., Suhonen, T.M, Paronen, P., Valjakka-Koskela, R., Kiesvaara, J., Mönkkönen, J. (1996). Interaction of liposomes with human skin in vitro- the influence of lipid composition and structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1304, 179-189.

Koleng, J.J., McGinity, J.W. Carbomer, En: Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Owen, S.C. (eds), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Pharmaceutical Press, London, American Pharmacist Association, Washington , 2006, pp 111-115.

Koppel, D.E. (1972). Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants. *The Journal of Chemical Physics* 57, 4814-4820.

Korting, H.C., Stolz, W., Schmid, M.H., Maierhofer, G. (1995). Interaction of liposomes with human epidermis reconstructed in vitro, *British Journal of Dermatology*. 132, 571-579.

Kristl, A., Mrhar, A., Kozjek, F., Kobe, J. (1989). Lipophilicity of guanine derivatives. *International Journal of Pharmaceutics* 57, 229-234.

Kristl, A., Mrhar, A., Kozjek, F. (1993). The ionisation properties of acyclovir and deoxyacyclovir. *International Journal of Pharmaceutics* 99, 79-82.

Lasch, J., Laub, R., Wohrab, W. (1991). How deep do intact liposomes penetrate into human skin?. *Journal of Controlled Release* 18, 55-58.

- Lasic, D.D. (1998). Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16, 307-321.
- Lauer, A.C., Lieb, L.M., Ramachandran, C., Flynn, G.L. and Weiner, N.D. (1995). Transfollicular drug delivery. *Pharmaceutical Research* 12, 2, 179-186.
- Lauer, A.C. Percutaneous drug delivery to the hair follicle, En: Bronaugh, R.L., Maibach, H.I, (Eds), *Percutaneous Absorption, Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1999, pp. 427-449.
- Law, S.L., Hung, H.Y. (1998). Properties of acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 161, 253-259.
- Le Roy Boehm, A-L, Fessi, H. (2000). Applications pharmaceutiques du potentiel zeta-intérêt pour la caractérisation des vecteurs colloïdaux. *Journal de pharmacie de Belgique* 55, 2, 40-48.
- Lebel, A., Boivin, G. (2006). Pathogenicity and response to topical antiviral therapy in a murine model of acyclovir-sensitive and acyclovir-resistant Herpes simplex viruses isolated from de same patient. *Journal of Clinical Virology* 37, 34-37.
- Lee, P.H., Su, M-H., Kern, E.R., Higuchi, W.I. (1992). Novel animal model for evaluating topical efficacy of antiviral agents: flux versus efficacy correlations in the acyclovir treatment of cutaneous Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infections in hairless mice. *Pharmaceutical Research* 9 (8), 979-989.
- Lee, P.H., Su, M-H., Ghannem, A-H, Inamori, T, Kern, E.R., Higuchi, W.I. (1993). An application of the C* concept in predicting the topical efficacy of finite dose acyclovir in the treatment of cutaneous HSV-1 infections in hairless mice. *International Journal of Pharmaceutics* 93, 139-152.
- Lee, S., Lee, J., Choi, Y.W. (2007). Skin permeation enhancement of ascorbyl palmitate by liposomal hydrogel (lipogel) formulation and electrical assistance. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30 (2), 393-396.
- Lieb, L.M., Ramachandran, C., Egbaria, K., Weiner, N. (1992). Topical delivery enhancement with multilamellar liposomes into pilosebaceous units: I. in vitro evaluation using fluorescent techniques with the hamster ear model. *Journal of Investigative Dermatology* 99, 108-113.
- López-Pinto, J.M., González Rodríguez, M.L, Rabasco, A.M. (2005). Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 298, 1-12.
- Makino, K., Yamada, T., Kimura, M., Oka, T., Ohshima, H., Kondo, T. (1991). Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. *Biophysical Chemistry* 41, 175-183.
- Marsh, D., Transition temperatures, En: Marsh, D (ed), *Handbook of lipid Bilayers*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990, pp 211-228.

- Mayer, L.D., Hope, M.J., Cullis, P.R. (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica et Biophysica Acta* 858, 161-168.
- Mehta, S.C., Afouna, M.I., Ghannem, A-H, Higuchi, W.I, Kern, E.R. (1997). Relationship of skin target site free drug concentration (C*) to the in vivo efficacy: an extensive evaluation of the predictive value of the C* concept using acyclovir as a model drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86 (7), 797-801.
- Mezei, M., Gulasekharam, V. (1980). Liposomes – a selective drug delivery system for the topical route of administration. I. Lotion dosage form, *Life Sciences* 26, 1473-1477.
- Mezei, M., Gulasekharam, V. (1982). Liposomes – a selective drug delivery system for the topical route of administration : gel dosage form. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 34, 473-474.
- Mishra, D., Mishra, P.K., Dubey, V., Nahar. M., Dabadghao, S., Jain, N.K. (2008). Systemic and mucosal immune response induced by transcutaneous immunization using Hepatitis B surface antigen-loaded modified liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 33, 424-433.
- Moser, K., Kriwet, K., Naik, A., Kalia, Y.N., Guy, R.H. (2001). Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 52, 103-112.
- Mourtas, S., Fotopoulou, S., Duraj, S., Sfika, V., Tsakiroglou, C., Antimisiaris, S.G. (2007). Liposomal drugs dispersed in hydrogels effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 55, 212-221.
- Mourtas, S., Haikou, M., Theodoropoulou, M., Tsakiroglou, C., Antimisiaris, S.G. (2008). The effect of added liposomes on the rheological properties of a hydrogel: A systematic study. *Journal of Colloid and Interface Science* 317, 611-619.
- New, R.R.C. Introducción, En: New, R.R.C. (ed), *Liposomes, a practical approach*, IRL Press, Oxford, 1990a, pp 1-32.
- New, R.R.C. Preparation of liposomes, En: New, R.R.C. (ed), *Liposomes, a practical approach*, IRL Press, Oxford,, 1990b, pp 33-104.
- New, R.R.C. Characterization of liposomes, En: New, R.R.C. (ed) *Liposomes, a practical approach*, IRL Press, Oxford, 1990c, pp 105-161.
- Ogiso, T., Yamaguchi, T., Iwaki, M., Tanino, T., Miyake, Y. (2001). Effect of positively and negatively charged liposomes on skin permeation of drugs. *Journal of drug targeting* 9, 49-59.
- Olson, F., Hunt, C.A., Szoka., F.C., Vail, W.J., Papahadjopoulos, D. (1979). Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 557, 9-23.
- Ostrowsky, N. (1993). Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids* 64, 45-56.

Parry, G.E., Bunge, A.L., Silcox, G.D., Pershing, L.K., Pershing, D.W. (1990). Percutaneous absorption of benzoic acid across human skin. I. In vitro experiments and mathematical modelling. *Pharmaceutical Research* 7 (3), 230-236.

Parry, G.E., Dunn, P., Shah, V.P., Pershing, L.K. (1992). Acyclovir bioavailability in human skin. *Journal of investigative Dermatology* 98, 856-863.

Patel, P.J., Ghanem, A-H., Higuchi, W.I., Srinivasan, V., Kern, E.R. (1996). Correlation of in vivo topical efficacies with in vitro predictions using acyclovir formulations in the treatment of cutaneous HSV-1 infections in hairless mice: an evaluation of the predictive value of the C* concept. *Antiviral Research* 29, 279-286.

Pavelić Ž, Škalko-Basnet, N., Schubert, R. (2001). Liposomal gels for vaginal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 219 (1-2), 139-149.

Pavelić Ž, Škalko-Basnet, N., Filipovic-Grčić, J., Martinac, A., Jalšenjak, I. (2005). Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *Journal of Controlled Release* 106, 34-43.

Peña, M.D., Muntaner, A.R. Cinética formal, En: *Química Física*, (Volumen 2), Alhambra, Madrid, 1975, pp 1053-1080.

Pérez- Cullell, N., Coderch, L., de la Maza, A., Parra, J.L., Estelrich, J. (2000). Influence of the fluidity of liposome compositions on percutaneous absorption. *Drug Delivery* 7 (1), 7-13.

Poirier, J., Cohen, I., Bernaudin, J.F. Histología de la piel y sus anexos, En, *Cuadernos de histología* 3, Marbán, Madrid, 1985, pp 537-565.

Puglia, C., Bonina, F., Rizza, L., Cortesi, R., Merlotti, E., Drechsler, M., Mariani, P., Contado, C., Ravani, L., Esposito, E. (2010). Evaluation of percutaneous absorption of naproxen from different liposomal formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99 (6), 2819-2829.

Qiu, L., Jing, N., Jin, Y (2008). Preparation and in vitro evaluation of liposomal chloroquine diphosphate loaded by a transmembrane pH- gradient method. *International Journal of Pharmaceutics* 361, 56-63.

Quesada V., Isidoro A., López, L.A. En: *Cursos y ejercicios de estadística*, Alhambra, S.A., Madrid, 1982.

Randolph, L.K., Ciminera, J.L. Estadística, En: *Remington Farmacia, Médica Panamericana*, Buenos Aires, 1987.

Reddy, M.B., Guy, R.H., Bunge, A.L. (2000). Does epidermal turnover reduce percutaneous penetration?. *Pharmaceutical Research* 17, 11, 1414-1419.

Reynolds, J.E.F. (ed). *MARTINDALE, The Extra Pharmacopoeia*. 31th ed. Royal Pharmaceutical Society, London, 1996, pp. 642-645.

- Rougier, A., Dupuis, D., Lotte, C., Roguet, R., Schaefer, H. (1983). In vivo correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption. *The Journal of Investigative Dermatology* 81, 275-278.
- Rougier A., Lotte, C., Maibach, H.I. (1987). In vivo percutaneous penetration of some organic compounds related to anatomic site in humans: predictive assessment by the stripping method. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 76, 6, 451-454.
- Roy, M.T., Gallardo, M., Estelrich, J. (1998). Influence of size on electrokinetic behaviour of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine lipid vesicles. *Journal of Colloid and Interfaces Science* 206, 512-517.
- Schaefer, H., Redelmeier, T.E. Structure and dynamics of the skin barrier, En: *Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption*, Karger, Basel, 1996a, pp 1-42.
- Schaefer, H., Redelmeier, T.E. Composition and structure of the stratum corneum, En: *Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption*, Karger, Basel, 1996b, pp 43 -86.
- Schaefer, H., Redelmeier, T.E., Factores effecting percutaneous absorption, En: *Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption*. Karger, Basel, 1996c, pp 153 – 212.
- Schaefer, H., Redelmeier, T.E., Prediction and measurement of percutaneous absorption, En: *Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption*, Karger, Basel, 1996d, pp 118 – 152.
- Schaefer, H., Redelmeier, T.E., The Practical application of techniques to measure percutaneous absorption En: *Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption*, Karger, Basel, 1996e, pp 213-262.
- Schreier, H, Bouwstra, J. (1994). Liposomes and niosomes as topical drug carriers: dermal and transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release* 30, 1-15.
- Šentjurc, M., Vrhovnik, K., Kristl, J. (1999). Liposomes as a topical delivery system: the role of size on transport studied by the EPR imaging method. *Journal of Controlled Release* 59, 87-97.
- Seth, A.K., Misra, A., Umrigar, D., Vora, N. (2003). Role of Acyclovir gel in Herpes simplex: clinical implications. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of experimental and clinical research* 9, 7, 193-198.
- Sharma, A., Sharma, U.S. (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* 154, 123-140.
- Sheth, N.V., McKeough, M.B., Spruance, S.L. (1987). Measurement of the stratum corneum drug reservoir to predict the therapeutic efficacy of topical iododeoxyuridine for Herpes Simplex Virus infection. *Journal of investigative Dermatology* 89, 598-602.
- Shimoyama Y, Fujii M, Kanda Y, Mizoguchi A, Oda H, Koizumi N, Watanabe Y. (2010). Effects of application method on skin penetration of carboxyfluorescein incorporated in liposomes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 58(3), 429-431.

Simonsen, L., Petersen, M.B., Groth, L. (2002). In vivo skin penetration of salicylic compounds in hairless rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 17, 95-104.

Škalko, N., Čajkovac, M., Jalšenjak, I. (1998). Liposomes with metronidazole for topical use: the choice of preparation method and vehicle. *Journal of Liposome Research* 8 (2), 283– 293.

Spruance, S.L., Freeman, D.J. (1990). Topical treatment of cutaneous Herpes simplex virus infections. *Antiviral Research* 14, 305- 321.

Stamatialis, D.F., Papenburg, B.J., Gironés, M., Saiful, S., Bettahalli, S.N.M., Schmitmeier, S., Wessling, M. (2008). Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *Journal of Membrane Science* 308, 1-34.

Surber, C., Schwarb, F.P., Smith, E.W. Tape-stripping technique. En: *Percutaneous Absorption, Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, Bronaugh, RL, Maibach, H.I. (eds) Marcel Dekker, New York, 1999, pp 395- 409.

Sznitowska, M., Janicki, S., Baczek, A. (2001). Studies on the effect of pH on the lipoidal route of penetration across stratum corneum. *Journal of Controlled Release* 76, 327-335.

Tabbakhian, M., Tavakoli, N., Jaafari, M.R., Daneshamouz, S. (2006). Enhancement of follicular delivery of finasteride by liposomes and niosomes 1. In vitro permeation and in vivo deposition studies using hamster flank and ear models. *International Journal of Pharmaceutics* 323, 1-10.

Takayama, M., Itoh, S., Nagasaki, T., Tanimizu, I. (1977). A new enzymatic method for determination of serum choline containing phospholipids. *Clinica Chimica Acta* 79, 93-98.

Tatulian, S.A. (1983). Effect of lipid phase transition on the binding of anions to dimyristoylphosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et Biophysicac Acta* 736, 189-195.

Torre-Enciso, M. (2004). Optimización de la deformabilidad de liposomas para su administración dérmica. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia.

Touitou, E., Schaffer, F.L., Dayan, N., Alhaique, F., Ricciari, F. (1994a). Modulation of caffeine skin delivery by carrier design: liposomes versus permeation enhancers. *International Journal of Pharmaceutics* 103, 131-136.

Touitou, E., Junginger, H.E., Weiner, N.D., Nagai, T., Mezei, M. (1994b). Liposomes as carriers for topical and transdermal delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83, 9, 1189-1203.

Touitou, E., Meidan, V.M., Horwitz, E. (1998). Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *Journal of Controlled Release* 56, 7-21

Touitou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B., Eliaz, M. (2000). Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *Journal of Controlled Release* 65, 403-418.

Trottet, L., Owen, H., Holme, P., Heylings, J., Collin, I.P., Breen, A.P., Siyad, M.N., Nandra, R.S., Davis, A.F. (2005). Are all acyclovir cream formulations bioequivalent?. *International Journal of Pharmaceutics* 304, 63-71.

Twist, J.N., Zatz, J.L. Interaction of vehicles with model skin membranes in the permeation process, En: Bronaugh, RL and Maibach, H.I. (Eds), *Percutaneous Absorption, Mechanisms-Methodology-Drug delivery*, Marcel Dekker, New York, 1989, pp 147-173.

Van Kuijk-Meuwissen, M.E.M.J. Junginger, H.E, Bouwstra, J.A. (1998). Interactions between liposomes and human skin in vitro, a confocal laser scanning microscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1371, 31-39.

Verma, D.D., Verma, S. Blume, G., Fahr, A. (2003a). Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics* 258, 141-151.

Verma, D.D., Verma, S. Blume, G., Fahr, A. (2003b). Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 55, 271-277.

Volpato, N.M., Santi, P., Laureri, C., Colombo, P. (1997). Assay of acyclovir in human skin layers by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 16, 515-520.

Vrhovnik, K., Kristl, J., Šentjerc, M., Smid-Korbar, J. (1998). Influence of liposome bilayer fluidity on the transport of encapsulate substances into the skin as evaluated by EPR. *Pharmaceutical Research* 15, 525-530.

Wagstaff, A.J., Faulds D., Goa, K.L. (1994). Aciclovir, A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 47 (1), 153-205.

Weiner, N., Williams, N., Birch, G., Ramachandran, C., Shipman, JR, C., Flynn, G. (1989). Topical delivery of liposomally encapsulated interferon evaluated in a cutaneous herpes guinea pig model. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 33, 1217-1221.

Wertz, P.W., van den Bergh B. (1998). The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chemistry and Physics of Lipids* 91, 85-96.

Wester, R.C., Christoffel, J., Hartway, T., Poblete, N., Maibach, H.I., Forsell, J. (1998). Human cadaver skin viability for in vitro percutaneous absorption: storage and detrimental effects of heat- separation and freezing. *Pharmaceutical Research* 15 (1), 82-84.

Wester R.C., Maibach H.I. In vivo methods for percutaneous absorption measurements. En: Bronaugh, R.L. and Maibach, H.I. (eds), *Percutaneous Absorption, Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, Marcel Dekker, Inc, New York, 1999, pp 215-227.

Yamamoto, T., Yokojama, M., Opanasopit, P., Hayama, A., Kawano, K., Maitani, Y. (2007). What are determining factors for stable drug incorporation into polymeric micelle carriers?. Consideration on physical and chemical characters of the micelle inner core. *Journal of controlled release* 123, 11-18.

Yokomizo, Y., Sagitani, H. (1996). The effects of phospholipids on the percutaneous penetration of indomethacin through the dorsal skin of the guinea pig, in vitro.2. The effects of hydrophobic group in the phospholipids and a comparison with general enhancers. *Journal of Controlled Release* 42, 37-46.

Zellmer, S., Pfeil, W., Lasch, J. (1995). Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum. *Biochimica et Biophysica Acta* 1237, 176-182.

Zhou, Y., Wei, Y-H., Zhang G-Q., Wu, X-A. (2010). Synergistic penetration of ethosomes and lipophilic prodrug on the transdermal delivery of acyclovir. *Archives of Pharmacal Research* 33 (4), 567-574.

