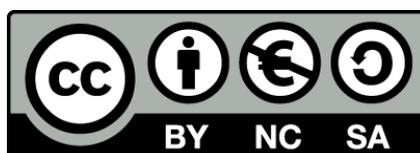




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudio de formulaciones de ketorolaco de trometamina para aplicación sobre mucosas y piel

Mireia Mallandrich Miret



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y  
CONTROL DE MEDICAMENTOS

ESTUDIO DE FORMULACIONES DE KETOROLACO DE TROMETAMINA  
PARA APLICACIÓN SOBRE MUCOSAS Y PIEL

MIREIA MALLANDRICH MIRET  
2017



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y  
CONTROL DE MEDICAMENTOS

ESTUDIO DE FORMULACIONES DE KETOROLACO DE TROMETAMINA  
PARA APLICACIÓN SOBRE MUCOSAS Y PIEL

Memoria presentada per Mireia Mallandrich Miret para optar al título de doctor por la  
Universidad de Barcelona

Directores de Tesis:

Ana Cristina Calpena Campmany

Francisco Fernández Campos

Doctoranda:

Mireia Mallandrich Miret

Tutora:

Ana Cristina Calpena Campmany

MIREIA MALLANDRICH MIRET  
2017



*Vull fer una especial dedicació a la meva família, que han viscut en primera persona el curs d'aquest projecte.*

*Sense el vostre suport no hauria sigut possible.*



## **AGRADECIMIENTOS**



Este trabajo ha sido posible gracias a las subvenciones del Ministerio de Ciencia e Innovación (MAT2011-26994)

Y de la Beca pre-doctoral APIF de la Universitat de Barcelona. Durante su realización se ha disfrutado de una *Ayuda de movilidad para la obtención de la Mención Europea en el título de Doctor*.



Muchas personas han contribuido indirecta o directamente en este trabajo. Me gustaría agradecer a todas aquellas que me habéis ayudado durante estos años para que este Proyecto saliera adelante. Muchas gracias por vuestra guía, consejos, paciencia, apoyo... Todos formáis parte de esto.

Un especial agradecimiento a mis directores de tesis doctoral, **Ana C. Calpena** y **Francisco Fernández-Campos**, por su dedicación y guía. A Ana también por ser una amiga, hermana mayor y segunda madre. Por todo lo que hemos compartido, los buenos momentos y los que no, tanto de trabajo como personales. A Fran, amigo y compañero, por tu siempre pragmático punto de vista, por tirar del carro cuando ha sido necesario, por creer en mí y decirme *todo saldrá bien* en los momentos críticos. Eres un modelo a seguir. Ha sido un viaje extraordinario a vuestro lado, y que sin duda volvería a hacer.

También quiero agradecer a **María Luisa García López**, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitir adentrarme en el apasionante mundo de las nanopartículas. A **Marta Espina** y **Maria Antonia Egea** que han compartido su tiempo y conocimiento. Gracias.

A todos los compañeros de laboratorio, qué gran equipo y qué gran familia. Me llevo muy buenos recuerdos de las largas permeaciones días, noches, fines de semana, vacaciones... Ha sido un placer, **Helen Alvarado**, **Guadalupe Abrego**, **Alexander Parra**, **Martha Vázquez**, **Elena Sánchez**, **Gladys Ramos**, **Joana Fanguero**, **Ana Flo**, **Cristina Cañadas**, **Berenice Andrade**, **María Luisa Garduño**. Todo lo que hemos aprendido juntos y unos de otros. Gracias también a **Marcelle**, **Roberto** y **Paulina**. Un sincero agradecimiento a **Elisabeth González** y **Veva Morral** por animarme en este Proyecto, y por los buenos ratos en vuestra compañía.

En esta gran familia no puede faltar **Álvaro Gimeno**, gracias Álvaro, sin ti esta tesis ni muchas otras no hubieran sido posible. **Nora Provenza** y **Roser Sanz** tenéis un sitio en mi corazón. Un enorme agradecimiento a **Beatriz Clares**, por toda tu ayuda, los consejos, por tenerme siempre en cuenta. Te agradezco muchísimo la dedicación que me has regalado, te has implicado como si fuera tu doctoranda. Muchas cosas me has

enseñado y he aprendido; no sólo a nivel laboral, también personal, y merece destacar la perseverancia y resiliencia.

Un profundo agradecimiento a **Cristina Alonso** y **Lluïsa Coderch**, por vuestra ayuda y colaboración activa en esta tesis doctoral. Quiero mostrar mi agradecimiento a **Alfons del Pozo**, **Joan Blasi** e **Immaculada Gómez** de Aranda por su colaboración desinteresada, la cual ha dado lugar a contenido científico de calidad.

A mis estudiantes **Araceli Barreto**, **Oihana Pereda**, **Lidia Garreta**, **Àlex Gutiérrez**, **Salima Moussaoui**, **Àlvar Castelló**... que han estado a mi lado, incluso fuera de sus horarios, y me han ayudado en las partes más tediosas. Con muchos de vosotros nos más que una relación profesor-alumno, un vínculo de amistad. He aprendido con vosotros también. Gracias.

A los compañeros del Máster, **Alba**, **Griselda**, **Jaume**, **Magdalena**, **María Jesús**, **Sergio**, **Anna**, **Barbara**, **Gemma**, **Ginebra**, **Helena**, **José Luís**, **Laia**, **María**, **Marina**, **Meritxell**, **Rebeca**, **Roman**... Gracias por las infinitas muestra de apoyo y ánimos que me habéis brindado. Gracias a **Lourdes Marzo** por su infinita paciencia y siempre buena predisposición, por escucharnos y tener en cuenta las necesidades y particularidades de cada uno.

Una mención especial a **Cristina Silva**, a **Joaquim Suñer**, y a **Lyda Halbaut**, por estar siempre dispuestos a echar una mano. Vuestro granito de arena ha sumado para formar una bonita playa. A **Tina Baladrón**, por su sincera preocupación por mi tesis y mi bienestar. Gracias.

Siempre recordaré con cariño las inolvidables experiencias con los compañeros de la UCL School of Pharmacy. *A special thanks to **Majella Lane** for accepting my research stay request in her lab. I also want to thank the people from Skin Lab **Lin Luo**, **Miguel Paz**, **Nicola Parisi**, **Nicolas Brand**, **Nidhin Raj**, **Tasnuva Haque**, **Mohamed Sattar**. To **Haydar Abdalghafor**, thank you for your time, I really appreciate your guide and assistance. I only regret not being longer under your supervision. I also want to thank*

to **Ijeoma, Nich Hobson, Rash, Sheiliza Carmali, Raquel Romero**. *You made me feel at home. Specially, Álvaro Goyanes.*

Mi más sincero agradecimiento a **Josep Maria Raigal**, tu apoyo en mis primeros días en Londres fue conmovedor. Tú y tu familia me hicisteis sentir como en casa.

Quiero agradecer a **Helena Colom** su disposición a escuchar y ayudar. Gracias por las explicaciones a lo largo de estos años. Me has hecho sentir arropada. También te debo el hecho de conocer a **Jaume Pascual** y **Joan Puig**. Gracias por vuestra comprensión y apoyo en la fase final de la tesis doctoral. Gracias por facilitarme el camino.

A **Marc**, mi querido esposo, por estar a mi lado todo este tiempo, apoyarme en este proyecto y por tu infinita paciencia. Me has acompañado a congresos, has aguantado charlas científicas, has estado ahí en mi primera comunicación oral - que por cierto era en inglés, qué emocionada estaba ante tal oportunidad, pero al mismo tiempo qué nervios y aprensión -. No tengo palabras para agradecerte el esfuerzo y sacrificio que has hecho, especialmente, durante mi estancia en Londres. Tu amor fue más fuerte que tu miedo a volar. Siempre me preguntaré si yo hubiera estado a la altura.

A nuestro pequeño **Èric** que ha vivido parte del proceso. Espero que algún día puedas comprender que *Mami* se escondiera unas horas para escribir. Agradezco todo lo que aportas y enriqueces mi vida. Estoy aprendiendo tanto contigo. Me encanta la posibilidad de ver las cosas desde otros puntos de vista, que no están sesgados por la visión y mentalidad, a veces encajonada, de los adultos. Esta es una importante cualidad para un investigador.

A mis suegros, **Carme y Joan**. Os quiero como a unos padres, y es que me habéis aceptado como a una hija. Cuanto me habéis aportado y enriquecido mi vida. Vuestra ayuda y apoyo ha sido, y sigue siendo, incondicional.

A mis padres, **Jaume y Maria Josep**, no hubiera podido tener unos padres mejores. Por la educación y los valores que me habéis transmitido. Gracias a vosotros soy quien soy y he llegado hasta aquí. A mis hermanos, **Núria, Jaume y Gerard**. Gracias Núria por

abrirme los ojos y mostrarme el camino, en muchas ocasiones has sido un faro para mí. Jaume y Gerard gracias por estar ahí, por vuestra ayuda con los ordenadores, por facilitarme el camino, por escucharme. Una especial mención a la creatividad de Gerard. **Àvia Pepita**, ¡por fin he acabado de escribir este libro! A mi cuñado, **David**, por estar siempre dispuesto a escuchar. Gracias por tus consejos. A mi querida amiga de la infancia **Anna Gallart**, *forever and ever*. Gracias por ser parte de la familia, eres como una hermana para mí.

Y para finalizar, gracias al resto de bellísimas personas que habéis confluído en este periodo.

## **ÍNDICE GENERAL**



## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE GENERAL.....	11
ABREVIATURAS .....	19
RESUMEN.....	23
ABSTRACT .....	25
1. INTRODUCCIÓN .....	27
1.1 INFLAMACIÓN .....	29
1.2 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINEs).....	31
1.2.1. Mecanismos de acción.....	31
1.2.2. Ketorolaco de Trometamina .....	32
Estructura.....	32
Propiedades.....	33
Vías de administración .....	35
1.3 HIDROGELES .....	36
1.3.1. Consideraciones generales de hidrogeles. ....	36
1.3.2. Clasificación de hidrogeles.....	36
1.3.3. Propiedades físicas, químicas y toxicológicas de los hidrogeles.....	39
1.3.4. Sistemas de liberación controlada con hinchamiento sensible a los estímulos exteriores.....	40
1.3.5. Polímeros para la elaboración de los geles.....	42
Carbopol .....	42
Pluronic.....	44
Carboximetilcelulosa sódica.....	45
1.4 MUCOADHESIVOS .....	46
1.4.1. Mucoadhesivos como sistemas de transporte de principios activos.....	47
1.4.2. Interacciones en bio adhesión.....	49

1.4.3.	Polímeros bioadhesivos .....	50
1.5.	NANOPARTÍCULAS .....	51
1.5.1.	Preparación de nanopartículas .....	52
1.5.2.	Aplicaciones .....	57
1.6.	PIEL.....	58
1.6.1.	Fisiología de la piel .....	58
La epidermis .....	59	
La dermis .....	60	
La hipodermis .....	60	
1.6.2.	Sistemas de administración transdérmica.....	61
1.7.	MUCOSA ORAL .....	64
1.7.1.	Fisiología de la mucosa oral .....	64
1.7.2.	Sistemas de administración transmucosa oral .....	67
1.8.	EL OJO .....	68
Fisiología del ojo .....	70	
1.9.	PENETRACION TRANSDERMICA Y TRANSMUCOSA.....	75
1.9.1.	Factores que influyen en la absorción percutánea.....	79
Factores biológicos:.....	79	
Factores físico-químicos:.....	80	
1.9.2.	Ecuaciones que definen las cinéticas de penetración transdérmica.....	91
1.9.3.	Cuantificación del fármaco en la piel .....	95
2.	AIMS.....	97
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	101
3.1.	MATERIALES .....	103
3.2.	MÉTODOS.....	106
3.2.1.	Elaboración de formulaciones de Ketorolaco de Trometamina .....	106
Preparación de hidrogeles.....	106	
Preparación de nanopartículas poliméricas.....	107	
3.2.2.	Diseño factorial.....	109
3.3.	CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES .....	109

3.3.1.	Caracterización de los hidrogeles dérmicos .....	109
	Reología.....	110
	Swelling .....	112
	Perfil de degradación .....	112
	Porosidad .....	113
	Estudio morfológico .....	114
	Estabilidad óptica a corto plazo.....	115
3.3.2.	Caracterización de las NPs .....	115
	Caracterización fisicoquímica .....	117
	Estudios morfológicos .....	117
	Eficacia de encapsulación (EE%):.....	118
	Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	118
	Predicción de estabilidad a corto plazo .....	119
3.4.	MÉTODO ANALÍTICO .....	120
3.4.1.	Condiciones cromatográficas .....	120
3.4.2.	Contenido de KT en las formulaciones .....	120
3.5.	ESTUDIO DE LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	121
	Ajustados cinéticos .....	124
3.6.	ESTUDIO DE PERMEACIÓN <i>EX VIVO</i> .....	125
3.6.1.	En piel.....	125
	Estimación de los parámetros de permeación: (cinética de absorción):.....	126
	Distribución del KT en las diferentes capas de la piel .....	127
3.6.2.	En mucosa .....	128
3.6.3.	En ojo.....	131
	Permeación ex vivo .....	131
	Permeación in vivo .....	131
3.6.4.	Cantidad retenida en las membranas biológicas.....	132
3.7.	TEST DE IRRITACIÓN OCULAR <i>IN VITRO</i> – HET-CAM.....	133
3.8.	EFICACIA ANTI-INFLAMATORIA DÉRMICA <i>IN VIVO</i> .....	136
3.8.1.	Eficacia anti-inflamatoria dérmica .....	136
	Inducción de la inflamación .....	136
	Estudio histológico .....	137

3.9.	ESTUDIOS DE LOS PARÁMETROS CUTÁNEOS EXPERIMENTALES TRÁS LA APLICACIÓN DE LAS FORMULACIONES.....	138
3.9.1.	Protocolo estudio de los parámetros cutáneos experimentales.....	138
3.9.2.	Estandarización de las condiciones y parámetros .....	140
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	143
4.1.	CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES .....	145
4.1.1.	Para aplicación dérmica.....	145
4.1.2.	Mucoadhesivos .....	155
4.2.	DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLÍMEROS DE POLI-LÁCTICO CO-GLICÓLICO) .....	157
4.2.1.	Optimización de las nanopartículas de KT-PLGA .....	158
4.2.2.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	165
4.2.3.	Estabilidad óptica a corto plazo.....	168
4.3.	CONTENIDO DE KT EN LAS FORMULACIONES .....	170
4.4.	ESTUDIO DE LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	170
4.4.1.	Estudio de liberación <i>in vitro</i> para hidrogeles .....	170
4.4.2.	Estudio de liberación <i>in vitro</i> para las nanopartículas.....	172
4.5.	ESTUDIO DE PERMEACIÓN EX VIVO .....	175
4.5.1.	En piel.....	175
	Parámetros de permeación.....	175
	Absorción percutánea y distribución del KT en las capas de la piel .....	177
4.5.2.	En mucosa bucal.....	179
	Intrínseca .....	179
	Formulaciones mucoadhesivas .....	182
4.5.3.	Estudio de penetración transcorneal y transescleral.....	188
	Permeación <i>in vivo</i> .....	193
4.6.	ESTUDIOS DE TOLERANCIA OCULAR .....	195
4.7.	ESTUDIOS DE EFICACIA ANTI-INFLAMATORIA.....	197
4.7.1.	Eficacia anti-inflamatoria dérmica <i>in vivo</i> .....	197
	Estudio histológico .....	198
4.8.	PARÁMETROS CUTÁNEOS EXPERIMENTALES.....	199

5. CONCLUSIONES .....	203
BIBLIOGRAFÍA .....	207
ANNEXOS .....	237
Publicaciones .....	237



## **ABREVIATURAS**



AINE	Anti-inflamatorio no esteroideo
CAM	Membrana corioalantoidea
CMC	Carboximetilcelulosa
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EE	Eficiencia de encapsulación
HG	Hidrogel
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IdP	Índice de polidispersión
KT	Ketorolaco
KT-C940-HG	Hidrogel de carbopol al 2% de Ketorolaco
KT-P407-HG	Hidrogel de pluronic al 2% de Ketorolaco
NPs	Nanopartículas
PBS	Solución tamponada de fosfatos
PCS	Espectroscopía de correlación fotónica
PLGA	Ácido poli-láctico-co-glicólico
PVA	Polivinil alcohol
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato



## RESUMEN

En los últimos años, la investigación farmacéutica se ha centrado en mejorar el efecto de terapias actuales desarrollando nuevas formas farmacéuticas o vías de administración. Las rutas de administración transdérmica y transmucosa son una atractiva alternativa a la vía oral y a la parenteral, puesto que permiten evadir algunas desventajas que presentan estas vías tales como el efecto de primer paso hepático o disminuyendo efectos adversos como las irritaciones o ulceraciones gástricas. El Ketorolaco Trometamina es un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo que por vía oral presenta dichas desventajas.

Con el fin de obtener vehículos dérmicos de ketorolaco trometamina (KT) para el tratamiento local de la inflamación y restringir los efectos secundarios indeseables de los niveles sistémicos se desarrollaron hidrogeles (HG) de poloxámero y carbómero y se caracterizaron. Se estudió la liberación *in vitro*, la permeación *ex vivo* y se estudió la distribución del fármaco en las diferentes capas de la piel. Finalmente, se evaluó también la eficacia antiinflamatoria *in vivo* y la tolerancia de las formulaciones en la piel. Los HGs fueron transparentes y estables durante 3 meses exhibiendo valores de pH biocompatibles. Ambos HGs presentaron un perfil de liberación rápida siguiendo una cinética de primer orden. La mayor cantidad de Ketorolaco trometamina se encontró en la superficie de la piel, seguido de la epidermis para KT-C940-HG y el estrato córneo para KT-P407-HG. La eficacia anti-inflamatoria de KT-P407-HG reveló suficiente biodisponibilidad de Ketorolaco trometamina para alcanzar fácilmente el sitio de acción. La aplicación de las formulaciones desarrolladas en voluntarios no indujo ninguna irritación visual de la piel. El KT-P407-HG se propuso como formulación dérmica adecuada para el tratamiento local anti-inflamatorio sin efecto secundario teórico sistémico.

También se desarrollaron y estudiaron geles mucoadhesivos para la administración bucal; el KT se vehiculizó en dos excipientes mucoadhesivos, Carbopol y Carboximetil celulosa sódica, a una concentración del 2% de principio activo. La permeación los dos

geles mucoadhesivos sobre mucosa bucal y sublingual de cerdo, mostró que ambas formulaciones eran capaces de alcanzar concentraciones plasmáticas teóricas suficientes para proporcionar efecto farmacológico sistémico, hecho que lleva a considerar el posible uso de dichas formulaciones mucoadhesivas como alternativa a la vía oral.

La visión afecta significativamente la calidad de vida de las personas; las patologías asociadas al ojo son tanto molestas como difíciles de tratar. Las formulaciones tópicas oftálmicas convencionales son soluciones o suspensiones; las cuales han sido utilizadas durante siglos por su aceptación social y su bajo coste de fabricación, pero tienen ciertas limitaciones. El 98% dosis administrada en forma de colirio, es eliminada en pocos minutos. Además, los colirios son útiles para el tratamiento de enfermedades del segmento anterior del ojo, pero la mayoría de problemas visuales en los países industrializados están asociados al segmento posterior, cuyas necesidades no están bien cubiertas. Por este motivo, se han ido creando y mejorando nuevas formulaciones para el segmento posterior. Para la mayoría de los tratamientos para el segmento posterior, las formas de administración más utilizadas son las inyecciones intravitreales, este método es eficaz, seguro, pero poco cómodo para los pacientes. Por ello, surgen métodos nuevos que resuelvan estos problemas. En esta tesis doctoral se han desarrollado nanopartículas (NPs) con el fin de superar las limitaciones expuestas. Las NPs se caracterizaron, se llevaron a cabo estudios de liberación del KT de las NPs, estudio de la permeación *ex vivo* del KT a través de la córnea y tejido esclerótico y test de tolerancia ocular por métodos alternativos, HET-CAM. Las NPs poliméricas de ketorolaco desarrolladas y optimizadas presentaron un tamaño de partículas y características adecuadas para la administración ocular. La permeación del KT a través de la córnea y del tejido esclerótico fue mayor en las NPs que en el colirio comercial Acular®. Según demostró la permeación *in vivo*, las NPs penetran hasta el humor vítreo y el humor acuoso a las 8 horas de su administración. Dicha penetración fue superior al colirio Acular® usado como referencia.

## ABSTRACT

Recently, pharmaceutical research has focused on improving the effect of current therapies by developing new pharmaceutical forms or routes of administration. The transdermal and transmucosal routes are an attractive alternative to the oral and parenteral ones, since they allow avoiding some disadvantages that present these routes such as the First-pass hepatic effect or decreasing adverse effects for instance, gastric irritations or ulcerations. Ketorolac Tromethamine is a non-steroidal anti-inflammatory drug which exhibits the disadvantages abovementioned.

In order to obtain dermal vehicles of ketorolac tromethamine (KT) for the local treatment of inflammation and restrict undesirable side effects of systemic levels hydrogels (HGs) of poloxamer and carbomer were developed and characterized. Moreover, *in vitro* release, *ex vivo* permeation and distribution of KT into the skin layers was evaluated. Finally, *in vivo* anti-inflammatory efficacy and skin tolerance were also assessed. HGs exhibit suitable physical-chemical and rheological properties. Rapid release profiles were observed through first order kinetics. Following the surface the highest concentration of KT from C940-HG was found in the epidermis and the stratum corneum for P407-HG. Relevant anti-inflammatory efficacy of KT-P407-HG revealed enough ability to provide sufficient bioavailability KT to reach easily the site of action. The application of developed formulations in volunteers did not induce any visual skin irritation. KT-P407-HG was proposed as suitable formulation for anti-inflammatory local treatment without theoretical systemic side effect.

The permeation of two mucoadhesive gels (Carbopol and Carboxymethylcellulose Sodium) 2% Ketorolac tromethamine, on porcine mucosa, both buccal and sublingual, showed that these formulations would be able to reach plasma concentrations within the therapeutic range. These results lead to consider the mucoadhesive formulations developed as an alternative to the oral route.

Visual disturbances significantly affect people's quality of life. Eye drops are the most common dosage forms however they present certain limitations; the 98% of the applied dose is eliminated in a few minutes. In addition, eye drops are useful for treatment of diseases of the anterior segment of the eye, but most visual impairments are associated with the posterior segment. In this doctoral thesis, we developed nanoparticles (NPs) in order to overcome these limitations. NPs were characterized, and in vitro release and ex vivo permeation studies through the cornea and sclerotic tissue were performed. Ocular tolerance test was also assessed by alternative methods, HET-CAM. The developed NPs were suitable for ocular administration. The permeation of KT through the cornea and sclerotic tissue was greater in NPs than in commercial Acular® eye drops. In vivo permeation demonstrated that NPs penetrated into the vitreous humor and aqueous humor within 8 hours of administration. Such penetration was superior to Acular® used as reference.

# **1.INTRODUCCIÓN**



## 1.1 INFLAMACIÓN

En el año 35 A.C., Celcus describió los signos cardinales de la inflamación “*rubor et tumor cum calore et dolore*”. En el siglo XIX de Rudolph Virchow añadió “*functio laesa*”. Estos signos de enrojecimiento, hinchazón, calor, dolor y pérdida de función, representan los signos externos de una reacción vascular, inmunológica y celular; que implican muchos mediadores solubles de la inflamación. Este fenómeno patológico es la respuesta del organismo a la agresión y sirve para minimizar los efectos dañinos de un agente amenazante mediante dilución, localización, destrucción y, si es posible, eliminación del mismo. La respuesta inflamatoria genera una acumulación de células inmunitarias en el foco inflamatorio (Higgins y Lees, 1984). Las células endoteliales también participan en la respuesta inflamatoria y facilitan la extravasación de leucocitos del torrente sanguíneo a las zonas de inflamación (Fabbri et al. 1999). Los neutrófilos y macrófagos se suman a estas inflamadas donde ejercen su acción fagocítica y además liberan al medio extracelular sustancias que amplifican la respuesta inflamatoria, desde prostaglandinas, leucotrienos y citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12) a especies del oxígeno altamente reactivas. Pero a la vez poseen un gran poder lesivo para los tejidos circundantes. Siendo a veces difícil discernir entre los aspectos beneficiosos y los perjudiciales.

El proceso de inflamación puede iniciarse en cualquier parte vascularizada del cuerpo. Consiste en una serie de etapas, y sigue un curso que es generalmente uniforme en su secuencia; pero puede variar en intensidad y duración, dependiendo del tipo y grado del estímulo inicial. (Higgins y Lees, 1984).

La familia de las ciclooxigenasas es un grupo de enzimas que catalizan la síntesis de eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclinas y tromboxanos) a partir del ácido araquidónico. Se conocen como COX-1 y COX-2 (Vane et al. 1998). COX-1 fue la primera enzima en identificarse, está presente en casi todos los tejidos en niveles constantes. Sus metabolitos a partir del ácido araquidónico son los responsables de mantener las condiciones fisiológicas básicas del organismo, por ejemplo, la protección de la mucosa gástrica y la homeostasia (Whittle et al., 1980, Xie et al., 1992). COX-2 en cambio, no se encuentra en la mayoría de tejidos, está implicada en la síntesis de

prostaglandinas que participan en procesos inflamatorios, patológicos y de estrés. Se expresa como respuesta a estímulos pro-inflamatorios, factores de crecimiento o agentes tumorigénicos (Harizi et. Al 2008; Ricciotti y FitzGerald 2011, Boyce y col., 1994, Mitchell et al., 1994; Seibert et al., 1994).

La COX-1 y la COX-2 catalizan la síntesis del ácido araquidónico a prostaglandina (PG) G<sub>2</sub> que es rápidamente reducida a PGH<sub>2</sub> por la acción de una peroxidasa. La PGH<sub>2</sub> da lugar a otras prostaglandinas (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> PGF<sub>2</sub>α), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) o tromboxanos (TXA<sub>2</sub>) (Capdevila et al. 2000; Vane et al. 1998). Paralelamente, el ácido araquidónico puede ser convertido a leucotrienos o a eicosanoides por la vía de la lipooxigenasa (LOX) (figura 1).

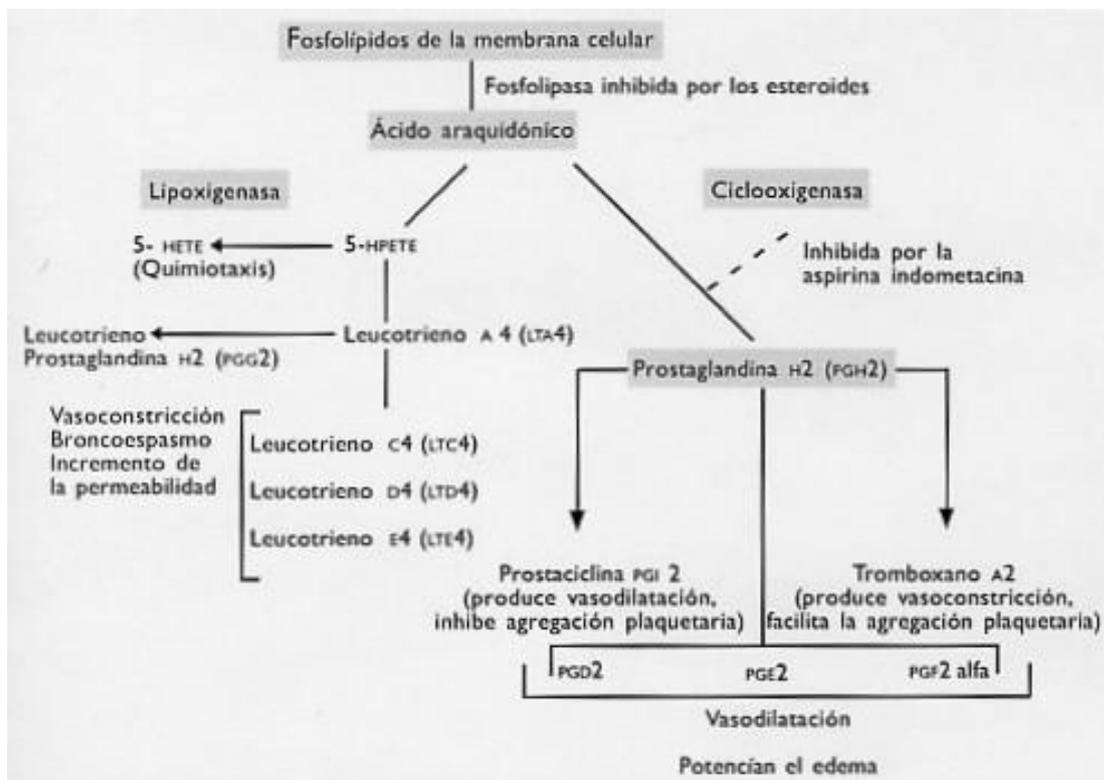


Figura 1. tomada del libro Patología Estructural y Funcional. Robbins Mc Graw-Hill Inter Americana. 75.

## **1.2 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINEs)**

### **1.2.1. Mecanismos de acción**

La oxigenación de ácidos grasos poliinsaturados tales como el ácido araquidónico, por la enzima ciclooxigenasa (COX) o los sistemas enzimáticos de la lipoxigenasa conduce a la formación de varios lípidos biológicamente activos del proceso inflamatorio entre ellos, las prostaglandinas, el tromboxano y la prostaciclina (Samuelsson et al., 1978) y leucotrienos (Samuelsson et al., 1980). Estos compuestos, conocidos como eicosanoides, tienen un papel vital en la iniciación y mantenimiento de varios componentes de la inflamación como la vasodilatación, el aumento de permeabilidad vascular, dolor, broncoconstricción y agregación plaquetaria.

En 1971, John Vane y sus colaboradores descubrieron que la Aspirina y la indometacina inhibía la biosíntesis, y por lo tanto la liberación, de PGs a partir de tejidos homogeneizados (Vane et al., 1971). El hallazgo de que la producción de PGs fuera suprimida mientras que no afectaba la liberación de la Fosfolipasa, indicaba que los AINE actúan inhibiendo la conversión del ácido araquidónico en PG (Smith y Willis, 1971). Posteriormente, Vane en 1976, propuso que la inhibición de COX puede ser la denominador común de los efectos terapéuticos y secundarios de los AINE.

El sitio activo de la enzima COX-1 es un canal hidrofóbico que fue descubierto mediante cristalografía de rayos X (Loll et al., 1995). Los inhibidores de las ciclooxigenasas, conocidos como AINEs, se prescriben habitualmente en procesos que cursan con fiebre e inflamación.

### 1.2.2. Ketorolaco de Trometamina

El Ketorolaco de Trometamina (KT) es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que ejerce su acción antiinflamatoria mediante la inhibición no selectiva de la ciclooxigenasa (COX). Este mecanismo también es responsable de los efectos adversos de tipo gastrointestinales (hemorragia gastrointestinal, gastritis, perforación y úlcera péptica). Entre los efectos adversos secundarios se encuentra la hemorragia post-operativa y el fallo renal.

La actividad analgésica del Ketorolaco se ha relacionado con la inhibición de la síntesis de PG (Rooks et al., 1982, Rauk y Laifer, 1993); Sin embargo, se han estudiado otros posibles mecanismos para explicar su potencia y eficacia. Se ha demostrado que el ketorolaco es incapaz de unirse a *mu*, *kappa* y *delta* de los receptores opioides (Lopez-Munoz et al., 1987). Sin embargo, Uphouse et al. (1993) investigó la acción antagonista de la nor-binaltorfimina (un antagonista *kappa*) sobre el efecto analgésico del Ketorolaco. Domer (1990) sugirió que la liberación de opioides endógenos podría estar involucrada en el efecto analgésico de este fármaco.

#### **Estructura**

El Ketorolaco forma parte del grupo pyrrolo-pyrrole de los AINE. El nombre químico es (±) -5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina-1- ácido carboxílico, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (figura 2). El Ketorolaco es una mezcla racémica de los isómeros dextrógiro D(+) y levógiro L(-). Como con la mayoría de los AINEs, el efecto biológico está asociado con la forma L del fármaco (Hayball et al., 1993). El Ketorolaco Es soluble en agua y tiene un pKa de 3,5 permitiendo de este modo, que se absorba rápidamente en un medio ácido como el estómago. Una vez absorbido en la circulación (pH 7,4), la mayoría del fármaco está en la forma ionizada. El Ketorolaco tiene un coeficiente de partición de n-octanol/agua (logP) de 0,26 sugiriendo que está distribuido internamente por todo el cuerpo después de alcanzar el equilibrio. El peso molecular del ketorolaco trometamina es 376,4. Su forma comercial se presenta como sal de

Trometamina que tiene más solubilidad en agua en comparación con el Ketorolaco base (Fleeger, 1996).

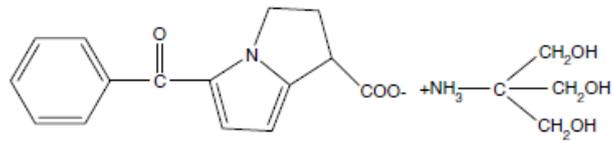


Figura 2. Estructura química del Ketorolaco de Trometamina.

## ***Propiedades***

### **Propiedades farmacocinéticas**

El KT está clasificado en la Clase 1 del Sistema de Clasificación Farmacéutica (BCS) (Figura 3) teniendo en cuenta sus propiedades farmacocinéticas. Los fármacos que se encuentran en esta clase, poseen una elevada solubilidad en agua y una gran permeabilidad.

<b>Grupo I</b> ↑ Solubilidad ↑ Permeabilidad	<b>Grupo II</b> ↓ Solubilidad ↑ Permeabilidad
<b>Grupo III</b> ↑ Solubilidad ↓ Permeabilidad	<b>Grupo IV</b> ↓ Solubilidad ↓ Permeabilidad

Figura 3. X Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

Es un fármaco rápidamente absorbido y la concentración plasmática máxima se obtiene antes de una hora tanto en la administración oral (30-40 minutos) como en la

intramuscular (45-50 minutos) y su tiempo de semi-vida es de unas cinco o seis horas, independientemente de la dosis administrada. El Ketorolaco no sufre metabolismo pre-sistémico y su biodisponibilidad final es de 87%. El metabolismo es mayoritariamente vía conjugación con ácido glucurónico y hidroxilación del hígado. La excreción es vía renal en un 91,4% y biliar en un 6,1%.

### **Propiedades farmacodinámicas**

El Ketorolaco presenta, además, una alta acción analgésica comparable a la de los opiáceos, pero sin los efectos adversos de éstos y su farmacocinética, seguridad y utilidad han sido documentados en detalle (Buckley y Brogden, 1990).

También presenta acción antipirética. Es un analgésico potente pero de actividad antiinflamatoria moderada. Además, de sus efectos antiinflamatorios y analgésicos, el Ketorolaco inhibe la agregación plaquetaria inducida por el ácido araquidónico y el colágeno.

Después de la cirugía, trauma o inflamación severa, el control del dolor es de primordial importancia (Hansen, 1994). La utilización a nivel terapéutico debido a su efecto analgésico se basa en el tratamiento a nivel pre-operatorio, intra-operatorio y post-operatorio, incluyendo operaciones abdominales, ginecológicas, orales, ortopédicas o urológicas.

Por vía oftálmica, se utiliza tanto en el tratamiento de la conjuntivitis alérgica estacional, como en post-operatorio y en el dolor e inflamación ocular.

Además, se usa para aliviar el dolor en el cólico renal agudo asociado a un traumatismo y en el dolor visceral asociado al cáncer.

Sus efectos adversos, anteriormente citados, son los que limitan su administración, ya que son bastante graves. Para evitarlos, se están estudiando nuevas formas de administración relacionadas con la administración transdérmica de KT, se ha observado

que permite un efecto terapéutico duradero y que se reducen los efectos adversos gastrointestinales.

### ***Vías de administración***

La tabla 1 muestra de entre las formas de administración, para este fármaco, las que presentan productos comercializados.

Tabla 1. Formas farmacéuticas comercializadas del KT

<b>Vías de administración</b>	<b>Formulación</b>	<b>Laboratorio</b>	<b>condiciones</b>
<b>Vía oral</b>	<i>QUALIGEN</i> ® 10 mg comprimidos recubiertos con película EFG	Qualigen, S.L.	Uso hospitalario
<b>Vía intramuscular</b>	<i>TORADOL</i> ® 30 mg/1ml solución	Roche Farma, S.A.	Uso hospitalario
<b>Vía intravenosa</b>	inyectable.		
<b>Vía oftálmica</b>	<i>ACULAR</i> ® 5 mg/ml Colirio en solución	Allergan, S.A	Sujeto a prescripción médica

Se puede administrar por vía oral (en forma de comprimido o cápsula), vía intramuscular (inyectables) y vía oftálmica. Recientemente, se está investigando una nueva forma de administración basada en la vía intranasal de KT para el tratamiento a largo plazo del dolor leve a moderado severo que requiere analgesia a nivel opiode.

## **1.3 HIDROGELES**

### **1.3.1. Consideraciones generales de hidrogeles.**

Los hidrogeles son estructuras basadas en redes poliméricas tridimensionales, hidrofílicas, capaces de absorber grandes cantidades de agua o de fluidos biológicos. Las redes están compuestas por homopolímeros (con la misma clase de monómeros) o copolímeros (con distintos tipos de monómeros), y son insolubles debido a la presencia de entrecruzamientos químicos (enlaces covalentes) o físicos (presentados por los complejos interpoliméricos y que son debidos a interacciones secundarias no covalentes como interacciones de Van der Waals, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y electrostáticas). Estos entrecruzamientos proporcionan la estructura de la red y su integridad física. Estos hidrogeles poseen compatibilidad termodinámica con el agua, lo que les permite hincharse en medio acuoso (Pepas y col., 2000 y Peniche y col., 1998). Hay numerosas aplicaciones de estos sistemas poliméricos, en concreto, en los sectores de la medicina y farmacia. Los hidrogeles se parecen al tejido vivo más que ninguna otra clase de biomaterial sintético. Esto es debido a su alto contenido en agua, y a su consistencia suave, similar al tejido natural. Además, el alto contenido en agua contribuye a su biocompatibilidad. Por lo tanto, los hidrogeles pueden emplearse como lentes de contacto, membranas para biosensores, componentes de corazones artificiales, materiales para piel artificial y sistemas de administración de fármacos.

### **1.3.2. Clasificación de hidrogeles.**

Los hidrogeles se pueden clasificar según diferentes criterios, los cuales son los siguientes:

- La naturaleza de sus grupos funcionales: neutros o iónicos.
- Sus características mecánicas y estructurales: afines o compatibles laxas.
- El método de preparación: red homopolimérica o copolimérica.

- La estructura física de la red: amorfas, semicristalinas, estructuras unidas por puentes de hidrógeno, estructuras supermoleculares y agregados hidrocoloidales.

Los hidrogeles pueden mostrar también un comportamiento de hinchamiento que depende de las características del medio externo. Estos polímeros son hidrogeles que responden a ciertos estímulos fisiológicos, y como consecuencia los complejos poliméricos pueden romperse o hincharse como resultado de los cambios en el medio externo. Estos sistemas tienden a mostrar cambios drásticos en sus valores de hinchamiento. Algunos de los factores que influyen en estos polímeros que responden a ciertos estímulos fisiológicos incluyen: el pH, la temperatura, la fuerza iónica y las radiaciones electromagnéticas (de la Torre et al., 2003).

Una buena manera para clasificar los hidrogeles es según la naturaleza de sus grupos laterales. La naturaleza química y el número de los grupos pueden ser controlados con precisión eligiendo las entidades químicas o **monómeros** que se emplearán en la síntesis de los polímeros.

Los hidrogeles se han usado también como vehículos de principios activos que pueden interactuar con la mucosa que recubre el tracto gastrointestinal, el colon, la vagina y la mucosa nasal, y otras partes del cuerpo gracias a su habilidad para prolongar sus tiempos de permanencia en el lugar de administración. Primeramente se ha pensado que esta interacción entre los polímeros y las glicoproteínas de la mucosa tiene lugar mediante puentes de hidrógeno. Consecuentemente, materiales que contienen una alta densidad de grupos carboxílicos e hidroxílicos pueden ser prometedores para este tipo de aplicaciones. Los monómeros más usados para la síntesis de polímeros mucoadhesivos incluyen ácido acrílico y metacrílico. También se han utilizado otros polímeros, como el polietilenglicol (PEG), como promotores de la adhesión. El PEG ha mostrado alargar la semivida biológica y reducir la reacción inmunológica producida por ciertas sustancias de alto peso molecular.

El que un hidrogel sea adecuado como sistema de administración de principios activos en una determinada zona depende en gran medida de su **estructura polimérica**.

Los parámetros más importantes para caracterizar la red polimérica de los hidrogeles son los siguientes:

- La fracción volumétrica del polímero, cuando éste se encuentra en la fase de hinchamiento, es la medida de la cantidad de fluido absorbido y retenido por el hidrogel.
- Peso molecular de la cadena polimérica entre dos entrecruzamientos (que pueden ser físicos o químicos) consecutivos: es la medida del grado de entrecruzamiento del polímero. Debido al proceso aleatorio de polimerización solo se puede calcular un valor medio.
- Tamaño de malla, es la distancia correlativa entre dos entrecruzamientos o uniones adyacentes, la cual proporciona la medida del espacio disponible o accesible entre las cadenas macromoleculares para la difusión del principio activo. Es un valor medio.

Hay dos técnicas que sirven para elucidar la estructura de los hidrogeles, las cuáles son las siguientes:

- Teoría del equilibrio del hinchamiento: la estructura de los hidrogeles que no contienen grupos iónicos puede ser analizada por la teoría de Flory-Rehner. Esta teoría termodinámica afirma que un gel polimérico entrecruzado, el cual cuando es sumergido en un fluido donde se le permite alcanzar un equilibrio con el ambiente externo, está sujeto a dos fuerzas opuestas: la fuerza termodinámica de mezclado y la fuerza retroactiva de las cadenas poliméricas.
- Teoría de la elasticidad: los hidrogeles parecen materiales plásticos naturales, ya que al someterles a una fuerza presentan propiedades elásticas. Un hidrogel sometido a una deformación relativamente pequeña, menor de un 20%, podrá recobrar su tamaño original de una manera rápida. Este comportamiento elástico de los hidrogeles puede ser utilizado para elucidar su estructura por medio de la teoría de la elasticidad plástica, aplicada a hidrogeles preparados en presencia de un solvente (Peppas y col., 1977).

### **1.3.3. Propiedades físicas, químicas y toxicológicas de los hidrogeles.**

Entre los factores que afectan al hinchamiento de los geles se encuentra la proporción de entrecruzamiento, calculada como el cociente de los moles de agente entrecruzante entre los moles de polímero. Cuanta mayor sea esta relación menor será el grado de hinchamiento, ya que el entrecruzamiento impide la movilidad de las cadenas poliméricas. También influye la estructura química del polímero, ya que al tener grupos hidrofílicos favorecerá el grado de hinchamiento. En el caso de los hidrogeles que son sensibles a cambios en el medio externo, su hinchamiento dependerá de estímulos específicos, como variaciones de temperatura, pH, fuerza iónica, campos magnéticos o luz del medio. Al aumentar el grado de entrecruzamiento se obtienen geles más fuertes, se tiene que alcanzar un grado óptimo para que el gel mantenga todavía sus propiedades elásticas. También influye la estructura química de los monómeros, ya que éstos pueden propiciar la formación de enlaces no covalentes como por ejemplo puentes de hidrógeno que aumenten la fuerza de la estructura polimérica.

La cinética de hinchamiento se puede clasificar como: controlada por difusión (fickiana), o controlada por la relajación (no fickiana). Cuando la difusión de agua hacia el interior del hidrogel ocurre mucho más deprisa que la relajación de las cadenas poliméricas la cinética de hinchamiento es controlada por la difusión.

Los cultivos celulares, conocidos como pruebas de citotoxicidad, pueden ser utilizados para evaluar la toxicidad de los hidrogeles. La mayoría de los problemas de toxicidad están asociados a restos de monómeros que no han reaccionado, agentes entrecruzantes o iniciadores de reacciones químicas que permanecen en la estructura del hidrogel, ya que no se han eliminado bien. Para solventar este problema se han modificado las reacciones de polimerización, para que sean extensivas, se ha llevado a cabo el lavado de hidrogeles para eliminar restos de agentes entrecruzantes, se han utilizado técnicas de polimerización que no necesitan de este tipo de agentes o iniciadores, o se han unido las cadenas poliméricas mediante uniones físicas.

#### **1.3.4. Sistemas de liberación controlada con hinchamiento sensible a los estímulos exteriores.**

La liberación controlada de principios activos desde hidrogeles poliónicos puede responder a cambios en los parámetros ambientales, como: el pH, la temperatura y otros estímulos. Así, hidrogeles inter-poliméricos como ácido poliacrílico/ alcohol polivinílico o ácido poli metacrílico unido a polietilenglicol pueden formar complejos reversibles según las condiciones de temperatura y de pH del medio externo (Shin y col., 1997 y Bell y col., 1996).

En el caso de algunos hidrogeles poliónicos o polielectrolíticos, el equilibrio de hinchamiento y el tamaño de malla fueron causados por el porcentaje de componente iónico y por el grado de ionización del principio activo (Bell y col., 1996; Khare y col., 1993 y Bettini y col., 1995). Por ejemplo, Peniche y col. (1998) han verificado la habilidad de formar complejos del ácido salicílico y derivados del ácido acrílico con ligandos polivalentes catiónicos como el chitosán. Asimismo, en copolímeros de ácido polimetacrílico unido a etilenglicol Bell y col. (1996) han descrito que la presencia de iones específicos modificaba la difusión del soluto.

Por otra parte, Gabrieli y col. 1998, estudiaron las propiedades de hinchamiento de hidrogeles de chitosán sometidos a la influencia de varios pH y concentraciones de cloruro sódico (0,075 M y 0,15 M). El efecto de adición de cloruro sódico podría ser explicado por el aumento de la cantidad total de iones que disminuye la relación entre los iones de dentro del hidrogel y el medio externo. Por lo tanto, en condiciones extremas de pH (pH=3 y pH=12) el grado de hinchamiento disminuye cuando la fuerza iónica del medio aumenta.

### **Aplicaciones de los hidrogeles en la administración de principios activos.**

Los hidrogeles pueden ser empleados como sistemas de transporte de fármacos al ser materiales muy diversos y versátiles, ya que pueden ser sintetizados a partir de multitud de precursores y de maneras muy diferentes para ajustar sus propiedades a la aplicación determinada. Los hidrogeles e pueden utilizar en la administración en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal, rectal, ocular, transdérmica y subcutánea. La administración de principios activos en la cavidad oral tiene múltiples aplicaciones, entre las cuales se encuentra: enfermedades de la boca, como estomatitis, periodontitis, infecciones fúngicas y virales, y cánceres de la cavidad oral. Para conseguir la administración de fármacos en esta zona se deben obtener adhesiones que puedan resistir el copioso flujo de la saliva.

Asimismo, se pueden emplear ungüentos basados en hidrogeles para el tratamiento de ciertas enfermedades en la cavidad oral. Y no solo se puede utilizar como un sistema de administración de fármacos sino como vehículo de administración de liposomas (que contienen el principio activo encapsulado en su interior), este último tiene la ventaja, frente a los ungüentos convencionales, que los liposomas alcanzan un mayor efecto local y menor concentración plasmática del principio activo, lo cual evita efectos secundarios no deseados.

De todas las posibles rutas de administración la vía oral es la más simple y segura. Sin embargo, el tracto gastrointestinal presenta entornos heterogéneos y complejos con diversas funciones adecuadas a los requerimientos fisiológicos. Pero por otra parte, esta complejidad proporciona una oportunidad única para diseñar hidrogeles con mecanismos que permitan controlar la liberación del fármaco.

En la administración rectal, los hidrogeles presentan propiedades bioadhesivas, que ayudan a lograr una cesión sostenida en el mismo lugar incrementando la biodisponibilidad de algunos principios activos que sufren un extensivo efecto de primer paso en el hígado.

En la administración ocular los hidrogeles presentan mayor retención en el ojo debido a sus propiedades elásticas, y por su alto contenido en agua producen un menor malestar en los pacientes. Concretamente, los hidrogeles que se forman in situ, son muy prometedores como sistemas de liberación ocular, ya que se dosifican en forma de líquido y se retienen durante tiempos prolongados como geles después de la dosificación.

Los hidrogeles también son adecuados para la administración de principios activos por vía subcutánea debido a que poseen una alta biocompatibilidad.

### **1.3.5. Polímeros para la elaboración de los geles.**

Los hidrogeles son una buena alternativa a otras formas farmacéuticas semi-sólidas como cremas, ungüentos o parches para que la gran cantidad de agua que contienen favorece la hidratación y elasticidad de la piel y también son bien aceptados por los usuarios gracias a la sensación agradable que deja a la hora de aplicarse sobre la piel.

Hay varios polímeros utilizados para la preparación de hidrogeles, los más importantes y conocidos son los biopolímeros que provienen de polisacáridos (de celulosa, alginato, hialurónico...) o proteínas (colágenos, gelatinasalbúminas...). También se utilizan polímeros sintéticos como polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, polietilenglicol y poliacrilatos.

#### ***Carbopol***

El Carbopol (carbomer), es un polímero sintético, derivado del ácido acrílico, entrecruzado con alil sucrosa o alilpentaeritritol. Es un polvo blanco, esponjoso e higroscópico, es soluble en agua, alcohol y glicerina (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2000), es un ácido débil y posee un gran peso molecular (aproximadamente 3500000 daltons) (Jacques y col., 1997), y es de carácter aniónico. Algunos de estos

polímeros, como el Carbopol, poseen la capacidad de sostener la cesión de las fármacos dispersas en la matriz y son aptos para su administración por vía oral, transdérmica, ocular, etc.

Cada molécula de Carbopol está formada por ácidos carboxílicos (figura 4). Se trata de un polímero hidrófilo que en presencia de agua aumenta su volumen gracias a los ácidos carboxílicos. Su utilización como matriz para la liberación controlada de fármacos, y sus propiedades mucoadhesivas han sido ampliamente estudiadas (Singla y col., 2000). Como estos compuestos son polianiónicos poseen la capacidad de formar complejos poliónicos con otros policationes, como el chitosán (Wang y col., 1997). El hinchamiento del carbopol depende del pH del medio, proporciona una cesión sostenida del principio activo, pero cede más rápidamente el fármaco en medios de pH más alto, es decir en el tracto intestinal (Kratz y col., 2000, Nakanishi y col., 1998, Slovin y col., 1997, Shin y col., 1996 y Meshali y col., 1996). Asimismo, estos compuestos han sido utilizados con éxito como agentes protectores de mucosa (Copeman y col., 1994).

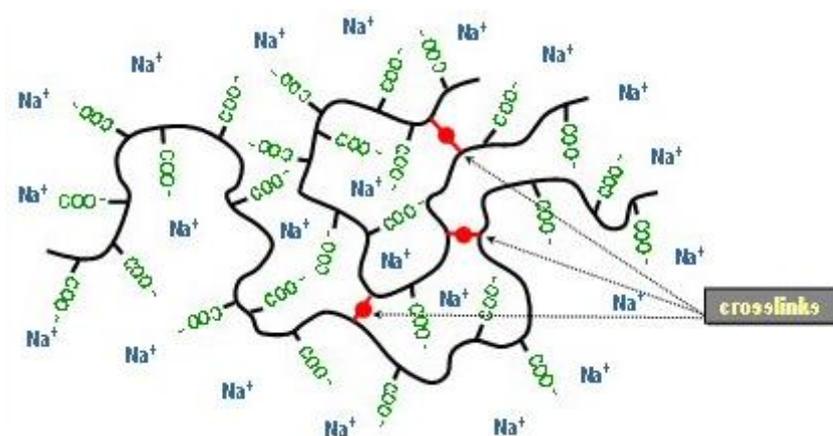


Figura 4. Representación de las reticulaciones del polímero de Carbopol. (Lubrizol, 2016)

El Carbopol es útil en la producción de geles para la textura viscosa al dispersarse en agua. Al ser un agente viscosizante, suspensor y gelificante se ha empleado en diferentes formas farmacéuticas como soluciones, suspensiones, cremas, geles y pomadas, de administración oftálmica, rectal y dérmica.

Como espesante se aprovecha para formar geles neutros transparentes y, como agente aglutinante para la formulación de comprimidos.

Las industrias médicas, farmacéuticas y cosméticas utilizan el Carbopol para producir productos como:

- Geles desinfectantes
- Pastas dentales
- Geles de aplicación dérmica (incluido por el cuero cabelludo e indicado para pieles grasas)
- Cápsulas médicas (sobre todo de acción prolongada)
- Lágrimas artificiales
- Gel de contacto para ecografías

En general, el gel de Carbopol presenta incompatibilidades ante concentraciones superiores al 35% de alcohol (algunos tipos de Carbopol toleran hasta el 50% de alcohol); ante iones metálicos como:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Na}^+$ ; y en combinación con sustancias ácidas ( $\text{pH} < 6$ ), básicas ( $\text{pH} > 9-11$ ) o sustancias iónicas (por ejemplo: ácido salicílico, ácido azelaico, neomicina sulfato, ...); y radiaciones UV (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009.).

### ***Pluronic***

El pluronic o también llamado poloxamer, es un copolímero no iónico de polietileno (PEO)-polipropileno (PPO) donde el ratio PPO-PEO (*a* y *b*) varía en función del grado farmacéutico descrito (P188-P407) (figura 5). Su masa molecular relativa media varía entre 9.840 hasta 14.600 daltons. Su punto de fusión es de aproximadamente 50°C.

El Pluronic F-127 o Lutrol 127, se trata de un polímero blanco en polvo de consistencia cerosa que contiene una cantidad adecuada del antioxidante BHT. Una de las características más llamativas del Lutrol 127 es que posee una gelificación

termorreversible, es decir, dependiendo de la temperatura a la que se encuentre, será líquido o de consistencia gel. Es un polímero muy soluble en agua i etanol al 96%.

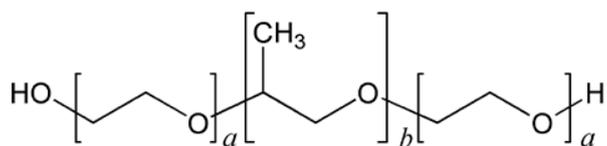


Figura 5. Representación de la estructura del poloxamer o pluronic P407. a= PEO = 95-105; b= PPO = 54-60 (Commons Wikimedia, 2017)

Se utiliza por vía dérmica, mucosa y ocular (Pluronic Lecithin Organogeles). Posteriormente a su aplicación sobre la piel, el gel forma una capa pegajosa al tacto que después de un minuto se seca formando un entramado viscoelástico sobre la piel. En la industria cosmética es útil para disolver ingredientes oleosos en agua. Otros usos son:

- Colutorios bucales
- Soluciones de limpieza para lentes de contacto (eliminar por películas de lípidos de la lente)

No obstante, presenta ciertas incompatibilidades; no es recomendable la adición de alcohol ya que puede afectar a la estructura micelar del polímero.

### ***Carboximetilcelulosa sódica***

La Carboximetilcelulosa (CMCNa) (figura 6) es un coloide hidrófilo de acción y usos similares a la metilcelulosa. Da geles de buena consistencia pero sin una gran transparencia y de color pardo acaramelado. Tienen una gran adhesividad, lo que les hace muy útiles como excipientes semisólidos bucales. Dicha propiedad es gracias a la

existencia de grupos funcionales (grupos carboxilos libres  $\text{COO}^-$ ) capaces de interaccionar con la mucosa oral. Los geles que forma con el agua son de carácter aniónico y estables a  $\text{pH} = 4 - 10$ . Sin embargo los aumentos de temperatura provocan una pérdida de viscosidad (Acofarma, 2016).

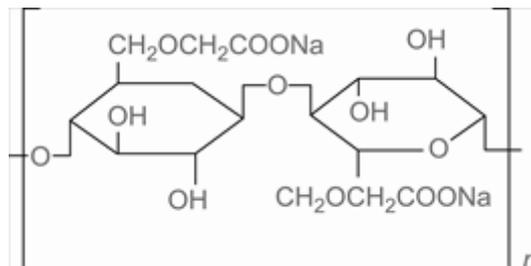


Figura 6. Representación de la estructura de la Carboximetilcelulosa sódica. (Medicines Complete, 2017)

#### 1.4 MUCOADHESIVOS

En los últimos años la industria farmacéutica ha mostrado particular interés de novedosos sistemas de administración que mejoren las propiedades de los principios activos y que al mismo tiempo sea de fácil aplicación para los pacientes y así satisfacer sus necesidades (Martin, 2009).

Entre estos sistemas de administración se encuentran formas mucoadhesivas, que tienen su nacimiento por 1947 utilizando en aquel entonces, goma de tragacanto y polvos adhesivos dentales que incorporaban penicilina para uso odontológico. Posteriormente se desarrolló el Orabase con excipientes mucoadhesivos para la cavidad oral, es una mezcla de carboximetilcelulosa sódica, pectina y gelatina en una base de aceite mineral/polietileno. En la década de los ochenta se lleva a cabo una amplia investigación acerca de estos sistemas, sobretodo de las limitaciones que imponen las variables fisiológicas de los diferentes lugares donde se aplicarán, así como también del estudio e incorporación de nuevos biopolímeros adhesivos responsables de su

interacción con las mucosas tomándose en consideración que se requieren formas de liberación durante largos períodos en el sitio de la aplicación (Rodríguez et al., 2000).

Existen polímeros de origen natural que son biocompatibles, biodegradables, higroscópicos, sin embargo, cuentan con la desventaja de presentar pobres propiedades mecánicas y la pérdida de propiedades biológicas durante su formulación. Por su parte los sintéticos tienen la gran ventaja de ser económicos, versátiles, con excelentes propiedades mecánicas y resistencia química, pero algunos no son biocompatibles ni biodegradables y su reciclado suele ser costoso. En los últimos años se ha trabajado en la obtención de diversos biocompuestos, que reunirían diferentes ventajas de ambos tipos de polímeros y al mismo tiempo disminuir algunas desventajas. (Rocha, 2015). Los sistemas biodegradables incluyen el uso del ácido poli (láctico-co-glicólico) que es hidrofóbico e incompatible con proteínas y fármacos nucleótidos solubles en agua. Entre los sistemas poliméricos hidrofílicos se encuentran, el polietilenglicol (PEG) y la gelatina. (Gupta et al., 2004). Entre los no biodegradables se encuentra el Carbopol 974P NF. Otra opción es la fibra alimentaria que puede soluble en donde se incluye a aquellas que son solubles en disolución tampón con enzimas que emulen soluciones enzimáticas propias del sistema digestivo (pectinas, goma y mucílagos). Las insolubles están representadas por componentes de la pared celular vegetal como la celulosa, la lignina y la hemicelulosa, así como polímeros como el almidón resistente, la quitina y sus derivados.

#### **1.4.1. Mucoadhesivos como sistemas de transporte de principios activos**

Actualmente se estudian mecanismos que permitan la sustentividad de los principios activos en el sitio de la aplicación.

Bioadhesión es el término que se ha utilizado en los últimos años para describir la capacidad que suelen tener ciertas macromoléculas ya sea de origen sintético o bien biológico para poder adherirse a los tejidos del organismo. (Mathiowitz, 1999). Cuando el tejido biológico es una mucosa, entonces hablamos de mucoadhesión.

Estos sistemas bioadhesivos se han aprovechado en el área de la salud, específicamente para ciertas aplicaciones odontológicas y ortopédicas, así mismo para su uso en el campo quirúrgico y oftalmológico. En cirugía se utiliza para la liberación controlada y localizada de principios activos sobre las mucosas, ya que cualquier material puede tener la capacidad de adherirse a tejidos naturales o biológicos. Para esto se presentan interrelaciones entre agrupaciones químicas (polímeros) y los tejidos naturales. (Rodríguez, 2000).

La vía por donde se administran los fármacos está revestida de una capa de mucus. A las formas de administración que se incrustan a las mucosas se les llama mucoadhesivas, y su función principal es fijarse al lugar donde se realiza la liberación del fármaco. (Patel, 2012).

Con el sistema de bioadhesión se busca que el medicamento permanezca por más tiempo en el sitio de la aplicación para aumentar su efectividad y optimizar su absorción a través de la mucosa. Dichas sustancias se pueden formular como sistemas de liberación prolongada o bien de tipo controlada de la sustancia activa.

Entre las ventajas que tienen los mucoadhesivos es que se pueden aplicar en las cavidades gastrointestinales, rectal, bucal, nasal, respiratoria, oftálmicas y en la zona vaginal. De acuerdo a la necesidad terapéutica del paciente pueden estar en forma de comprimidos, multiparticulares (nanopartículas), pomadas, geles y películas o parches mucoadhesivos. (Duchêne, 1989).

La administración tópica siempre será más efectiva cuanto más tiempo permanezca el principio activo en contacto con la mucosa lesionada, sin embargo es complejo debido a la presencia de la saliva y a los movimientos generados con la lengua. Por tanto, es importante aumentar el tiempo de permanencia del fármaco en la boca, esto puede conseguirse mediante el incremento voluntario de la retención del mismo por parte del paciente, lo cual suele tornarse difícil debido a que los pacientes pueden no colaborar. Al diluirse el principio activo en la saliva y a la deglución involuntaria del paciente, existe riesgo de que se pierda la mayor parte de la sustancia activa. Sin embargo esto puede ser eficaz mediante el uso de diversos adhesivos que facilitarían la retención del

sistema polimérico sobre la mucosa oral durante más tiempo sin la colaboración del paciente. (Beiro et al., 2003).

La capa de mucus y la mucina en concreto, son el componente de mayor implicación en el fenómeno de adhesión. El mucus es una secreción viscosa, translúcida que forma una capa continua, delgada y adherente en la superficie de la mucosa epitelial. Las funciones principales son la lubricación y la protección de las células epiteliales de agresiones de tipo mecánico o químico y a la degradación bacteriana. El mucus está en constante renovación habiéndose establecido un equilibrio dinámico entre la cantidad continuamente secretada por las células y la pérdida por acción mecánica o proteólisis. En su composición destacan las mucinas, glicoproteínas de alto peso molecular, sales inorgánicas, proteínas y lípidos (Rodríguez et al. 1990).

#### **1.4.2. Interacciones en bioadhesión**

La dilucidación de los mecanismos de interacción entre substratos biológico y los agentes bioadhesivos son fundamentales para el desarrollo de estas formas farmacéuticas.

**Interacciones físicas o mecánicas.** Se producen a través del contacto íntimo entre el polímero bioadhesivo y la superficie irregular del mucus. Se trata de uniones semipermanentes, no específicas, que si bien no pueden considerarse de importancia en bioadhesión, suponen una primera fase que promueve la posterior interacción química propiamente bioadhesiva.

**Enlaces químicos.** Los de tipo covalente, o primarios, son enlaces muy estables de interés en odontología y ortopedia. Los enlaces secundarios, de menor energía, poseen características más idóneas a la bioadhesión por su transitoriedad. Para que pueda ocurrir mucoadhesión, la atracción debe ser mayor que la repulsión no específica. Las interacciones atractivas provienen de las fuerzas de Van der Waals, atracciones

electrostáticas, enlaces de hidrógeno e interacción hidrófoba. Las interacciones repulsivas ocurren por la repulsión electrostática y estérica (Rodríguez et al. 1990).

### **1.4.3. Polímeros bioadhesivos**

Son muchos los investigadores que buscan desarrollar formas mucoadhesivas destinadas a que su administración sea sobre la mucosa bucal, gingival, rectal, nasal y ocular. (Singhal, 2010). Las preparaciones pueden ser en forma de tabletas, parches, películas y semisólidos como los geles y pomadas.

Los sistemas bioadhesivos deben sus propiedades a moléculas poliméricas que, en condiciones apropiadas, establecen interacciones con la superficie biológica. Dichas condiciones apropiadas dependen de las características químicas y estructurales del polímero bioadhesivo, de factores fisiológicos y variaciones experimentales.

Una de las características estructurales es el peso molecular, donde los que tengan un bajo peso ven favorecida su difusión a través de la mucosa, aunque este no parece ser un parámetro determinante.

En cuanto a estructura y grupos funcionales, las moléculas de mucina están cargadas negativamente a pH neutro por tanto, debido a las fuertes interacciones que se establecen entre electrolitos de carga contraria, los policatiónicos podrían ser excelentes mucoadhesivos a pH neutro; por el contrario, a bajos valores de pH, donde la mucina no se encuentra cargada, los policatiónicos serán poco efectivos. También es importante mencionar otros factores como la flexibilidad de las cadenas del polímero para la interpenetración, donde a mayor densidad de enlaces cruzados la longitud efectiva de la cadena que puede penetrar en el mucus disminuye reduciéndose la fuerza mucoadhesiva. La concentración del polímero debe ser optimizada porque altas concentraciones de polímero son las que controlan la cinética de liberación del fármaco, pero al mismo tiempo es limitante para la adhesión al mucus porque el polímero

adquiere una conformación replegada no disponiendo de grupos suficientes para el establecimiento de interacciones adhesivas.

La consideración de factores de tipo fisiológico contribuye al éxito del diseño mucoadhesivo. La renovación de mucina produce un sustancial incremento de moléculas solubles de mucina. Estas interaccionan con el sistema mucoadhesivo antes de que tengan la oportunidad de realizarlo con la capa de mucus, lo que supone una contaminación de la superficie y un hecho desfavorable a la mucoadhesión con la superficie de los tejidos.

El estado patológico también es un factor a tener en cuenta. Se sabe que las propiedades fisicoquímicas del mucus se modifican. Dado que los mucoadhesivos han de usarse en estados patológicos las características de los mucoadhesivos han de evaluarse bajo las mismas condiciones (Rodríguez et al. 1990).

## **1.5. NANOPARTÍCULAS**

Las nanopartículas se definen como sólidos, partículas coloidales de tamaño en el rango de 100-1000 nm. El término de nanopartículas poliméricas (NPs) incluye nanoesferas y nanocápsulas (figura 7). Las nanoesferas son partículas en forma de matriz sólida en la superficie de la que se adsorben las moléculas o fármacos. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares que conforman una cavidad interior, compuesta por un núcleo líquido (acuoso o aceitoso), en la que quedan confinados los fármacos (Rao et al., 2011).

La incorporación del fármaco en nanopartículas (NPs) tiene ventajas frente a las formulaciones clásicas, entre ellas destacan que pueden disminuir la toxicidad del fármaco o modificar su liberación y/o biodisponibilidad. Existe gran variedad de vehículos nanoestructurados, pero en particular, las nanopartículas poliméricas biodegradables han sido utilizadas ampliamente durante las últimas décadas para potenciar la biodisponibilidad de fármacos en aplicación tópica. El polímero derivado del ácido poliláctico-glicólico (PLGA) es biocompatible y biodegradable, de naturaleza

no tóxica, y además, está aprobado por la FDA como excipiente en productos farmacéuticos (dos Santos et al. 2012, Danhier et al. 2012, Nagarwal et al. 2009b).

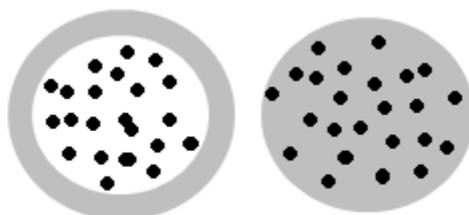


Figura 7. Nanopartículas: Nanocápsula (izda.) y nanoesfera (dcha)

Las nanopartículas poliméricas biodegradables, que son ampliamente utilizadas para mejorar la biodisponibilidad de los fármacos administrados por vía tópica. El ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) es el polímero biodegradable más utilizado por sus propiedades de compatibilidad, mucoadhesividad y naturaleza no antigénica (dos Santos et al. 2012, Danhier et al. 2012, Nagarwal et al. 2009b). Permite incorporar moléculas hidrófilas e hidrofóbicas y obtener una liberación sostenida del fármaco así como protegerlo de la degradación. La hidrólisis de PLGA da lugar a ácido láctico y ácido glicólico, los cuales como monómeros endógenos, son fácilmente metabolizados por el organismo por medio del ciclo de Krebs (Kumari et al. 2009). Los polímeros están disponibles comercialmente en diferentes pesos moleculares y proporción de copolímeros, variables que condicionan el tiempo de degradación del mismo (desde pocos meses a varios años). Estudios de otros autores demuestran que las NPs basadas en PLGA son absorbidas en mayor proporción por el sistema del retículo endotelial (*RES* en inglés) de las áreas inflamadas resultando un incremento de la concentración de NPs en las áreas mencionadas (Danhier et al. 2012).

### 1.5.1. Preparación de nanopartículas

La preparación de NPs se tiene que considerar una tecnología de última generación que requiere escoger la técnica adecuada de entre todos los métodos posibles, el uso de surfactantes y/o cosurfactantes apropiados con tal de obtener NP con propiedades óptimas para la aplicación deseada.

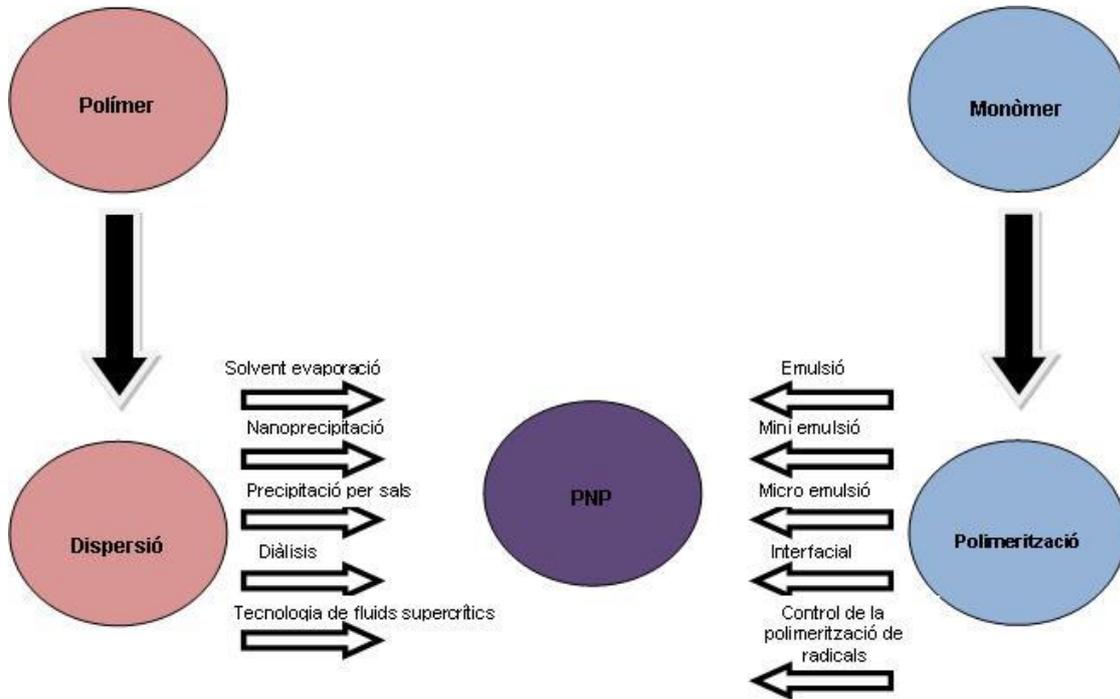


Figura 8. Esquema de la preparación de NPs (Llabot et al. 2008)

En general hay 2 estrategias principales para la preparación de las NPs:

- La dispersión de polímeros preformados
- La polimerización de monómeros

Métodos tales como *evaporación solvente*, *“salting-out”*, *diálisis*, tecnología de *fluidos supercríticos* pueden usarse para la preparación de NPs a partir de polímeros preformados. Por otro lado, las NPs pueden sintetizarse directamente mediante la polimerización de monómeros por técnicas de polimerización: micro-emulsión, mini-emulsión, emulsión sin surfactante o polimerización interfacial (figura 8). El tipo de sistema polimérico, el área de

aplicación y el tamaño requerido son algunos de los parámetros a tener en cuenta en la selección del método de preparación (Rao et al. 2011).

*Solvent evaporation* fue el primer método desarrollado para la preparación de NPs basadas en polímeros en el sector farmacéutico. Este método consiste en la preparación de soluciones de polímeros en disolventes volátiles y la obtención de emulsiones. En un inicio los disolventes más usados eran el diclorometano y el cloroformo, pero actualmente estos han sido reemplazados por el acetato de etilo ya que presenta un mejor perfil toxicológico. La emulsión se convierte en suspensión de nanopartículas al evaporarse el disolvente del polímero. Esta técnica es la más empleada para preparar NPs.

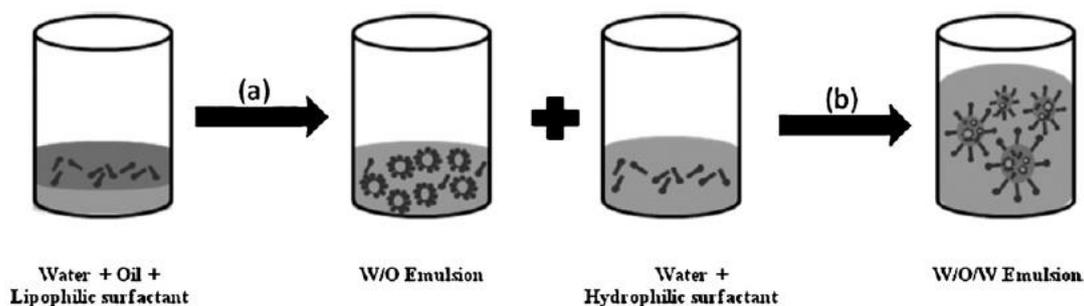


Figura 9. Esquema de la preparación de una doble emulsión w/o/w por el método solvent evaporation: (a) emulsificación mediante alta-cizalla y (b) emulsificación mediante baja-cizalla (Rao et al. 2011).

Existen dos estrategias para la formación de emulsiones: la preparación de emulsiones simples, por ejemplo, aceite en agua (*o/w* en inglés) y las dobles emulsiones, por ejemplo, agua en aceite en agua (*w/o/w* en inglés). Estos métodos requieren homogenización a alta velocidad o bien ultrasonificación, seguido de la evaporación del disolvente, tanto en continua agitación magnética a temperatura ambiente como en condiciones de vacío (figura 9).

El proceso es el siguiente: primero, el fármaco hidrófilo junto con el tensioactivo elegido se disuelven en agua y por otro lado, tenemos una solución del polímero en un disolvente orgánico. La emulsión primaria es preparada por la dispersión de la fase

acuosa en la fase orgánica. Después, se realiza una re-emulsificación con una nueva fase acuosa que también contiene tensioactivo (figura 10).

Finalmente, se elimina el solvente por evaporación y se recolectan las nanopartículas. La evaporación del solvente puede realizarse mediante agitación magnética a temperatura ambiente durante varias horas o mediante rotavapor. (Llabot et al. 2008, Rao et al. 2011)

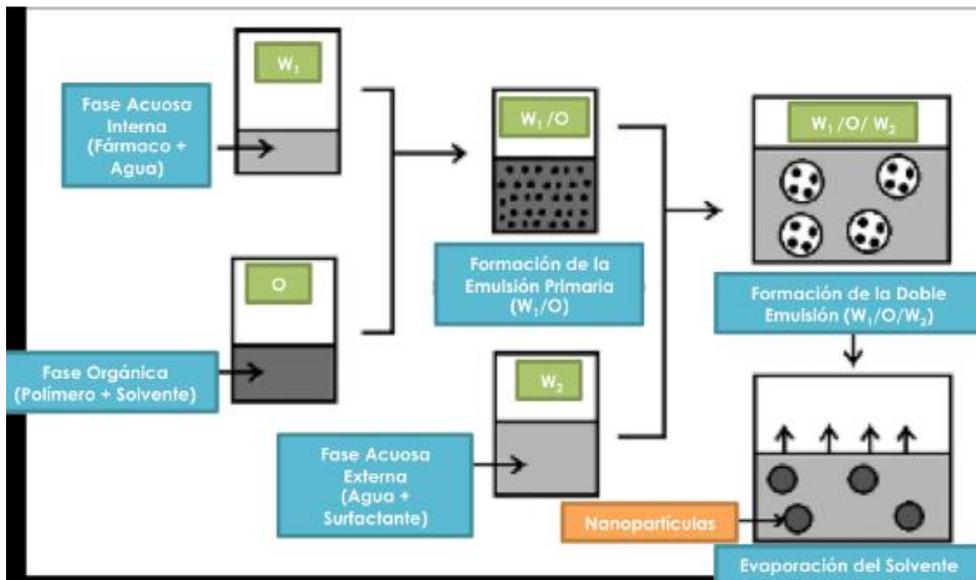


Figura 10. Preparación de una nanopartícula por el método de doble emulsión (Rao et al. 2011)

Las NPs pueden purificarse por ultracentrifugación y después de un lavado con agua destilada para eliminar el tensioactivo, son liofilizadas. Generalmente, el polímero es disuelto en un disolvente orgánico que conforma la fase oleosa, mientras que la fase acuosa contiene el estabilizante (Rao et al. 2011).

La producción de nanopartículas tiene muchas variables independientes. El polímero que se utiliza para formular las nanopartículas afecta la estructura, propiedades y aplicaciones de las partículas, así que no existe un polímero único para todos los fármacos. Hay dos características que se necesita considerar al formular con nanopartículas poliméricas para una determinada vía de administración: el tamaño de

las partículas y la eficacia de encapsulación. Por ejemplo, si lo que se quiere lograr es una absorción rápida, entonces el tamaño de la nanopartícula debe ser de 100 nm o menos. El potencial z, es una medida de la carga de la partícula, como tal y cuanto mayor es el valor absoluto del potencial zeta mayor es la cantidad de carga de la superficie, es decir, representa un índice de estabilidad de las partículas (Llabot et al. 2008).

Zambaux y colaboradores (1998) estudiaron la influencia de ciertos parámetros experimentales (temperatura de preparación, método de evaporación del disolvente, concentración de surfactante, peso molecular del polímero) en el tamaño promedio de partícula, índice de polidispersión y potencial Z de NPs elaboradas por el método de la doble emulsión. De su trabajo se concluyó que concentraciones elevadas de surfactante (3% p/v, o superior) garantizaban un proceso de emulsificación exitoso, partículas de menor tamaño y un índice de polidispersión satisfactorio. Otros factores influyen en las características de las NPs de PLGA preparadas a partir del método de la doble emulsión *w/o/w solvent evaporation*, Bilati y colaboradores (Bilati et al. 2003) estudiaron la influencia del proceso de sonicación, analizando la modificación del tamaño y distribución de las NPs en función de la duración e intensidad de sonicación. El trabajo puso de manifiesto que la duración de la segunda etapa de homogenización, aquella que proporciona la doble emulsión (*w/o/w*), tenía mayor influencia en el tamaño de partícula que la primera homogenización (emulsión *w/o*). El tamaño de partícula disminuye al aumentar el tiempo de sonicación de la segunda emulsificación. Los resultados del estudio también sugirieron que la intensidad de sonicación también influía en la morfometría de las NPs. El disolvente utilizado puede influir en las propiedades finales de las NPs, Mainardes (2005) evaluó este efecto en su trabajo, comparando el tamaño de partícula obtenido al elaborar NPs de PLGA con dos disolventes orgánicos: cloruro de metileno y acetato de etilo. Se concluyó que el cloruro de metileno proporcionaba NPs de mayor tamaño que cuando éstas eran elaboradas con acetato de etilo como disolvente. La selección del método depende, por tanto, de varios factores que deben ser valorados a fin de obtener las NPs con las características y propiedades deseadas. (Llabot et al. 2008).

### **1.5.2. Aplicaciones**

En el área de la oftalmología, el KT es útil en el tratamiento de glaucoma, uveítis, retinopatía diabética, conjuntivitis alérgica estacional y también es efectivo reduciendo la irritación intraocular, el edema cistoide macular secundario a una extracción de cataratas o una implantación de lentes y en la reducción de la conjuntivitis sin causar opacidad corneal ni producir un aumento en la presión intraocular.

La solución de KT al 0.5% también ha mostrado eficacia en el tratamiento de conjuntivitis causadas por *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* (Radwan et al. 2010, Sinha et al. 2009).

Los colirios presentan la limitación de que sólo una pequeña parte de la dosis instilada (1-3%) penetra la córnea y llega a los tejidos intraoculares debido al drenaje lagrimal y la dilución del fármaco por las lágrimas. La mayor parte de la dosis instilada es absorbida a vía sistémica a través de la conjuntiva y el conducto naso-lagrimal. Los efectos adversos sistémicos que el KT puede presentar son hipertensión, taquicardia y asma bronquial. Teniendo en cuenta que la terapia por vía sistémica requiere elevadas dosis de fármaco, prolongar el tiempo de residencia pre-corneal es un objetivo de gran importancia. Grandes esfuerzos se han llevado a cabo en este campo, mientras que el uso de geles (basados en un incremento de la viscosidad de la formulación) ha dado resultados limitados porque estas formulaciones son drenadas fácilmente y requiere un uso cauteloso de los potenciadores de la viscosidad, las nanopartículas presentan unos resultados prometedores por sus propiedades de biocompatibilidad, mucoadhesividad, liberación sostenida y tamaño de partícula nanométrico (Gupta et al. 2000, Nagarwal et al. 2009).

## 1.6. PIEL

### 1.6.1. Fisiología de la piel

La piel constituye el órgano corporal más extenso que separa al organismo del medio externo. En términos generales la piel realiza funciones de protección mecánica, regulación térmica, equilibrio hídrico, excretora, sensorial, inmunitaria.

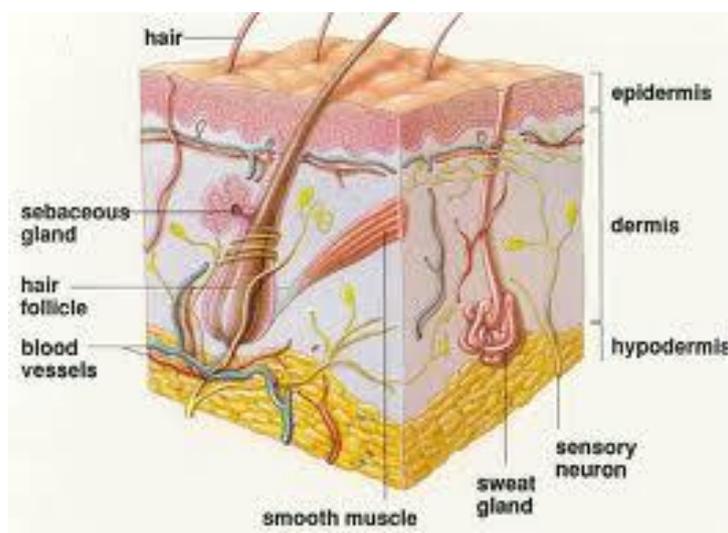


Figura 11. Estructura de la piel humana

Está formado por tres capas (Figura 11) que desde el exterior al interior son la epidermis, dermis y tejido subcutáneo. Contiene además glándulas sebáceas, sudoríparas y folículos pilosos. La superficie de la piel está normalmente cubierta por una emulsión epicutánea o manto hidrolipídico que se forma a partir de los ácidos grasos de las secreciones sebáceas de los queratinocitos y el agua que proviene de las glándulas sudoríparas. Este coadyuva al mantenimiento de su función protectora y flora cutánea (Montagna, 1961).

### ***La epidermis***

Es un epitelio plano estratificado, queratinizado y no vascularizado de un espesor que varía entre 0.02 y 0.2 mm según la zona anatómica. Posee un alto contenido lipídico (colesterol, ceramidas y ácidos grasos) y muy bajo contenido en agua (20-30%). Los queratinocitos al ascender hacia la superficie se vuelven más anchas y aplanadas, va perdiendo gradualmente el núcleo y orgánulos y se van enriqueciendo en queratina (Wertz, 1996).

En la epidermis puede diferenciarse cinco estratos:

- Estrato basal o germinativo: es una única capa de células casi cubicas enlazadas entre si por desmosomas y a la lámina basal sobre la que se apoya por hemidesmosomas. Este estrato es el encargado de la regeneración constante del resto de capas celulares epidérmicas por su continua replicación celular. Además de los queratinocitos también se encuentra melanocitos, células de Langergans (relacionados con el sistema inmune) y células de Merkel (del sistema neuroendocrino)
- Estrato espinoso lo forman células que están unidas por puentes intercelulares a modo de espinas con continuidad citoplasmática
- Estrato granuloso está compuesto por células que contienen gránulos de queratohialina (cuya degradación final produce sustancias higroscópicas responsables de la hidratación natural de la piel. Los gránulos también contienen glicolípidos y esteroides. Estos son excretados a medio extracelular, siendo uno de los responsables de la impermeabilidad de la epidermis.
- El estrato lúcido está ubicado entre la capa granulosa y el estrato corneo. En esta capa las células empiezan a perder los orgánulos celulares por la acción de proteasas y nucleasas.
- El estrato corneo es la parte más externa de la epidermis y la principal barrera del medio externa, siendo el principal responsable de la impermeabilidad de la

piel y la resistencia a la difusión de fármacos o cualquier otra sustancia (Hearnden y cols. 2012). Está formado por células aplanadas altamente queratinizadas, llamada corneocitos, unidos entre si por una sustancia cementante de naturaleza lipídica y estratificada en múltiples capas (Elias, 1983). Estos lípidos intercelulares están compuestos por aproximadamente un 70% de lípidos neutros (esteroles libres, 14%; ácidos grasos libres, 19.3%; triglicéridos, 25.2%; ésteres de colesterol y ésteres grasos, 5.4%; escualeno, 4.8%; alcanos, 6.1%), en un 18% por esfingolípidos (ceramidas y glucosilceramidas), un 5% de lípidos polares (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, esfingomielina y lisolecitina) (Lampe y cols. 1983). Esta composición lipídica junto con la constante descamación y renovación el estrato corneo (Tanner T, Marks, 2008) son los principales responsables de la función barrera del estrato corneo.

### ***La dermis***

Tiene un espesor mayor que la epidermis (1-3mm de grosor). Esta contiene colágeno, elastina, células inmunitarias, fibroblastos, vasos sanguíneos y linfáticos y nervios entre otros muchos componentes, lo que la hace un tejido altamente irrigado y la vía de entrada de fármacos a la circulación sistémica tras haber atravesado el estrato corneo. Posee una matriz amorfa rica en glucosaminoglucanos de alto poder humectante que nutre e hidrata la epidermis. También tienen corpúsculos sensoriales del tacto, dolor y temperatura (Wilkes y cols.1973).

### ***La hipodermis***

El tejido subcutáneo o hipodermis está compuesto por tejido graso y fibras elásticas. Se encuentra altamente irrigado y vascularizado. Es el origen de las glándulas sebáceas y de los folículos pilosos. Estos apéndices cutáneos pueden ser importante en el paso de

fármacos a circulación sistémica, ya que en estas zonas el grosor del estrato corneo disminuye, pudiendo llegar a desaparecer (Wilkes y cols.1973).

### **1.6.2. Sistemas de administración transdérmica**

Existe un gran número de formulaciones que clásicamente han sido utilizadas para la aplicación tópica (soluciones, emulsiones, ungüentos, lociones, pastas, polvos, etc.). En un primer momento se utilizó para obtener un efecto local en un área específica de la piel, pero en la actualidad la administración de estas formulaciones también persigue obtener un efecto sistémico.

Encontramos numerosos productos en el mercado con esta finalidad, parches para el tratamiento sustitutivo de la nicotina (Gore AV, Chien YW. 1998), anticonceptivos hormonales (Burkman, 2002), analgésicos opioides (Park y cols. 2008), psicoestimulantes como el metilfenidato para el tratamiento del síndrome de déficit de atención (Elia y cols. 2011), lidocaína (Galer y cols. 2004) y antieméticos (Nachum y cols. 2006), entre otros.

De forma general se acepta que la elevada organización cristalina de las lamelas lipídicas desempeña un papel esencial en las propiedades de barrera del estrato córneo. Como se mencionará más adelante, diversas técnicas se han dirigido a perturbar y debilitar la gran organización de los lípidos intercelulares en un intento por mejorar el transporte de la droga a través de la piel intacta o bien para aumentar la fuerza impulsora para la penetración de fármacos. En este sentido, una de las estrategias más estudiadas en la actualidad es el uso de formulaciones nanovesiculares y/o nanoparticulares como sistemas de administración cutáneos.

La justificación del uso de estos sistemas en la administración dérmica y transdérmica de fármacos es múltiple. Por un lado, tienen la ventaja de proteger a la sustancia que contienen, aumentando la vida útil del fármaco. Por otro, estos podrían ser

potenciadores de la penetración así como depósitos para la liberación sostenida del activo constituyendo una limitación de la absorción sistémica de los fármacos.

Entre los más conocidos, se encuentran, los liposomas. Estos se definen como vesículas microscópicas constituidas por una o varias bicapas fosfolipídicas concéntricas alternando con compartimentos acuosos. Poseen una forma, estructura y tamaño diversos, aunque sus dimensiones suelen oscilar entre 10 nm y varias micras. Dada su constitución, tienen la capacidad de captar una gran variedad de sustancias activas hidrosolubles, liposolubles o anfifílicas. La versatilidad de los liposomas se refleja tanto en su arquitectura como en sus propiedades físicas como la carga superficial, el tamaño, la permeabilidad/rigidez de la pared o su capacidad de carga.

En los últimos años muchas investigaciones han sido llevadas a cabo para la administración transdérmica de antibióticos (Manosroi y cols. 2004), antivirales (Dubey y cols. 2010), anestésicos (Shim y cols. 2010) y antiinflamatorios (Clares y cols. 2009) en liposomas.

En un intento por mejorar las propiedades de los liposomas surgen niosomas, etosomas y transfersomas.

Los niosomas son vesículas compuestas de tensioactivos no iónicos. Si se comparan con liposomas convencionales ofertan una mayor estabilidad química y menores costos, Los niosomas de aplicación tópica pueden aumentar el tiempo de residencia de las drogas en el estrato córneo y la epidermis, así como reducir la absorción sistémica del fármaco. Se cree que mejoran las propiedades de la capa córnea, tanto por la reducción de la pérdida de agua transepidérmica como por la reposición de lípidos perdidos de la piel. En los últimos años, la atención se ha centrado en el uso de tensioactivos a base de azúcar por ser menos tóxicos y altamente biodegradable (Choi y Maibach, 2005).

En cuanto a los etosomas, son liposomas con un alto contenido en alcohol (hasta 45%), capaces de mejorar la penetración de activos en los tejidos profundos y circulación

sistémica. Precisamente es el alcohol quien fluidifica los lípidos etosomales y lípidos del estrato córneo permitiendo así su penetración (Dubey et. al. 2010).

Mientras que los liposomas son incapaces de atravesar poros menores de 50 nm, transfersomas de hasta 500nm son capaces de penetrar la barrera del estrato córneo espontáneamente. En este caso se habla de vesículas lipídicas ultradeformables, compuestas de fosfolípidos como su principal ingrediente, 10-25% de tensioactivo y 3-10% de etanol (Dubey et. al. 2006).

Como alternativa a otros sistemas como las emulsiones, liposomas o nanopartículas poliméricas en 1990 se desarrollan las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN). Son dispersiones acuosas de matrices lipídicas sólidas estabilizadas por tensioactivos. (Müller et. al. 2007). Protegen las moléculas de fármacos susceptibles de degradarse bajo la influencia de agentes externos como la luz y el agua, presentan una mejor biodisponibilidad y podrían ser diseñadas para dar perfiles de liberación prolongada de sustancias activas poco solubles en agua, al incorporarlas en la matriz lipídica sólida. Entre sus desventajas estarían el posible crecimiento de las partículas durante su almacenamiento, la tendencia hacia una gelificación impredecible, la existencia de cambios inesperados en sus transiciones polimórficas y su inherente baja capacidad de incorporación de fármacos limitada por la estructura cristalina del lípido sólido.

Una nueva generación de nanopartículas lipídicas son los Transportadores Lipídicos Nanoestructurados (NLC). Estos sistemas tendrían las mismas ventajas que las SLN sin embargo minimizan o evitan algunos de los inconvenientes anteriormente mencionados, como la capacidad de carga, segregación durante el almacenamiento y alto contenido en agua de las dispersiones de SLN.

## 1.7. MUCOSA ORAL

### 1.7.1. Fisiología de la mucosa oral

La mucosa oral está compuesta principalmente por dos capas: el epitelio y el tejido conectivo subyacente (lámina basal, lámina propia y submucosa). Ambas capas están separadas por la membrana basal. (Figura 12 y 23) También contiene numerosas glándulas exocrinas, vasos sanguíneos y nervios.

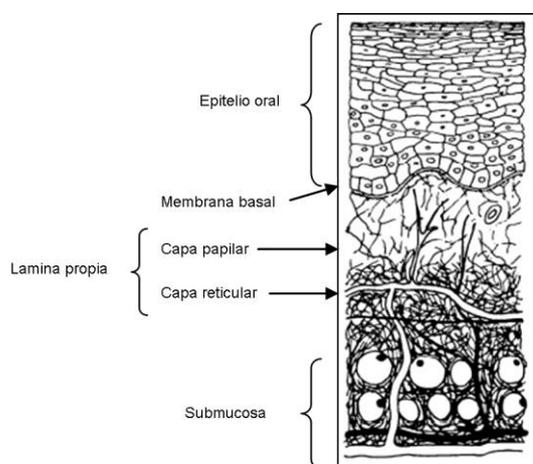


Figura 12. Anatomía de la mucosa bucal con las capas que la conforman

En la mucosa oral pueden observarse dos tipos de epitelio, queratinizado, con un alto contenido en ceramidas y acilceramidas (que se encuentra en la superficie masticatoria: paladar duro y encías) y no queratinizado, sin acilceramidas y con bajo contenido en ceramidas (paladar blando, superficie ventral de la lengua, suelo de la boca y mejillas) (Patel y cols.2011). Se estima que el grosor del epitelio de la mucosa bucal es de 500-800  $\mu\text{m}$  (500-600  $\mu\text{m}$  en su parte no queratinizada), posee una tasa de recambio celular de 5-7 días, una superficie total de 50  $\text{cm}^2$  y un flujo sanguíneo de 20.3  $\text{ml}/\text{min}/100 \text{ g}$  tejido aproximadamente (Sudhakar y cols.2006).

Por otro lado, la mucosa sublingual posee un espesor de 100-200  $\mu\text{m}$ , posee una tasa de recambio celular de 20 días, una superficie total de 26  $\text{cm}^2$  y un flujo sanguíneo de 12.2  $\text{ml}/\text{min}/100 \text{ g}$  tejido aproximadamente (Patel y cols.2011).

En las capas celulares más superficiales el epitelio se pueden observar gránulos membranosos que parecen fundirse con la membrana de la célula epitelial, expulsando los lípidos que contienen al espacio extracelular. Estos gránulos son esféricos de unos 0.2  $\mu\text{m}$  (Sudhakar y cols.2006).

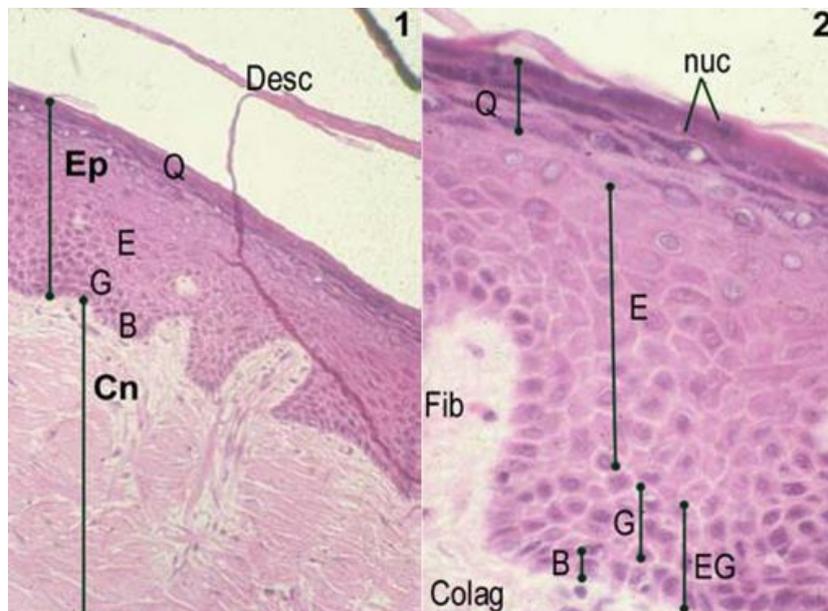


Figura 13. 1) Mucosa bucal constituida por un epitelio (Ep) de recubrimiento y por tejido conectivo (Cn) laxo que lo sostiene y nutre, denominado córium o lámina basal. 2) Muestra desde el interior hacia la superficie de la mucosa, la capa basal (B) de aspecto poliédrico y más oscuro (basófila), que es la zona donde tiene lugar la replicación celular activa. Finalmente se encuentra la capa espinosa (E).

La saliva es otra barrera del organismo para la administración de los fármacos, ya que el flujo de saliva es en parte responsable del periodo de permanencia del principio activo en la cavidad oral. Está compuesto principalmente por agua, sales minerales y algunas

proteínas (amilasa, lisozima, albumina). Se estima que la producción de saliva es de aproximadamente 1-1.5 litros al día (1-2 ml/min) (Sudhakar y cols.2006), aunque esta es variable. El pH de la mucosa bucal es de 6-7.4 (Patel y cols.2011).

En cuanto al moco, es otro componente que puede afectar a la liberación del fármaco en la mucosa oral. Su espesor varía entre 50 a 400  $\mu\text{m}$ . Su función es fundamentalmente la lubricación y protección de las células epiteliales de agresiones de tipo mecánico o químico. El mucus está formado por mucinas (glicoproteínas de alto peso molecular ( $2-14 \times 10^6$  Da), capaces de formar un gel viscoelástico. El contenido de agua es del 95% aproximadamente. Además, el moco es muy rico en ácido siálico y residuos de sulfato, por lo que a pH fisiológico se encuentra cargado negativamente, jugando un papel clave en la mucoadhesión (Rodríguez y cols. 2000).

Independientemente del grado de queratinización de la mucosa oral, esta no posee un estrato corneo propiamente dicho por lo que es mucho más permeable que la piel, de 4 a 4000 veces más permeable (Galey y cols. 1976). La barrera de difusión de fármacos en la mucosa oral se debe principalmente al contenido lipídico de las capas superficiales del epitelio. Estos lípidos son secretados al medio intercelular en forma de desmosomas y gránulos membranosos, asegurando así la cohesión del epitelio (Shojaei, 1998). La composición de estos lípidos es aproximadamente 76% de fosfolípidos, 23% de glucoesfingolípidos y un 0.7% de ceramidas (Sudhakar y cols. 2006). Estos lípidos dificultan el paso de fármacos hidrófilos, pero el alto grado de hidratación el tejido conectivo dificulta el paso de fármacos lipófilos. La permeabilidad de la mucosa oral se encuentra todavía más incrementada en la mucosa enferma (liquen plano, ulceraciones u otras) (Sankar y cols. 2011).

### **1.7.2. Sistemas de administración transmucosa oral**

Hoy en día existen numerosas formulaciones para la aplicación en la cavidad bucal como sprays, comprimidos, colutorios, pastas, films y parches.

Se estima que el tiempo de residencia de un sistema de administración transbucal en la mucosa oral es de aproximadamente 4-6h (Alur y cols.2001).

En el mercado, existen comprimidos destinados a la absorción transmucosa de fentanilo (Actiq®, USA) y nitroglicerina (Nitrogard®, USA) transmucosa (Madhav y cols.2009). Estos comprimidos se disuelven en la saliva, utilizando toda la superficie bucal para la absorción. Los inconvenientes que poseen estos sistemas son su corto tiempo de residencia en la boca, variaciones en la producción de saliva y dificultan la deglución de la forma farmacéutica hasta el tracto gastrointestinal. Con el fin de aumentar el tiempo de residencia se han desarrollado comprimidos mucoadhesivos, en lo que se incorpora miconazol (Loramyc®, Francia) entre otros fármacos (Lalla y Bensadoun, 2011).

La nitroglicerina se haya comercializada también en forma de spray sublingual (Glytrin Spray®, UK) para el alivio rápido de la angina de pecho. Igualmente, también se encuentra comercializados en este formato un spray de insulina (Oral-lyn spray®, USA, India), flurbiprofeno (Benactiv®, Italia), nicotina (Nicotrol®, USA) (Hearnden y cols. 2012).

Los colutorios se han centrado principalmente en el tratamiento con antimicrobianos de acción local. Ejemplos ampliamente conocidos como colutorios a base de clorhexidina, que pueden llegar a tener un efecto antibacteriano de hasta 7 horas tras la administración (Cousido y cols.2010).

El empleo de los geles se restringe principalmente a aquellos que tienen propiedades mucoadhesivas para aumentar el tiempo de residencia en la cavidad bucal, al igual que los comprimidos tienen la desventaja de que el fármaco puede ser deglutido al poseer una zona de difusión en todos los lados de la formulación. En la literatura se puede encontrar numerosas investigaciones de liberación de fármacos desde geles orales como

analgésicos (Alsarra y cols.2007), antihipertensivos (Save y cols.1994), protectores de la mucosa (Innocenti y cols.2002), etc.

Las pastas se han reservado para la liberación intra-canal de antimicrobianos en endodoncias. Adicionalmente puede encontrarse triamcinolona en Orabase® (Oralene®, USA), una pasta mucoadhesiva (Hearnden y cols. 2012). También se ha investigado la incorporación de liposomas con corticoides en pastas orales (Erjavec y cols. 2006).

Existen principalmente tres tipos de parches oro-adhesivos (Madhav y cols. 2009). En primer lugar, aquellos que poseen una matriz capaz de disolverse en la cavidad oral, de tal forma que liberan el fármaco totalmente de forma sostenida y por tanto no es necesario retirar ningún resto del dispositivo. Por otro lado, se encuentran parches que no se disuelven. Poseen una única superficie de difusión, gracias a la presencia en su estructura de una película protectora de la saliva. Como inconvenientes habría que destacar una pequeña área de difusión, limitando la dosis a administrar así como los restos del dispositivo que tras el tratamiento deben ser retirados por el paciente. Por último, nos encontramos con los parches con una cubierta impermeable, los cuales son capaces de disolverse completamente sin dejar residuos.

Los films son laminas poliméricas capaz de disolverse en la lengua en menos de 30 segundos permitiendo su paso a través de la barrera epidérmica y su rápida llegada a la circulación sistémica. Se han investigado para el tratamiento de patologías como la impotencia, migrañas, mareos, dolor y náuseas (Hearnden y cols. 2012).

## **1.8. EL OJO**

La visión afecta significativamente la calidad de vida de las personas, y por este motivo las patologías asociadas al ojo son tanto molestas como difíciles de tratar. Las formulaciones tópicas, como las soluciones o las suspensiones, han sido utilizadas durante siglos. Su aceptación social y su bajo coste de fabricación han favorecido que durante mucho tiempo no se investigara el suficiente, pero se ha visto que tienen

limitaciones a la hora de tratar las patologías a pesar de ser las formas más comunes (Guzmán et al., 1986).

La administración de gotas oculares tópicas son útiles para el tratamiento de enfermedades de los segmento anterior del ojo, pero la mayoría de discapacitados visuales en los países industrializados están relacionadas con problemas asociados al segmento posterior, cuyas necesidades no están bien cubiertas. Por este motivo, se han ido creando y mejorando nuevas formulaciones para el segmento posterior. Para la mayoría de los tratamientos para el segmento posterior, las formas de administración más utilizadas son las inyecciones intravitreales, este método es eficaz, seguro, pero poco cómodo para los pacientes. Por ello, surgen métodos nuevos que resuelven estos problemas, implantes de liberación controlada, nanopartículas, la iontoforesis y otros. El reto para los investigadores es encontrar métodos nuevos, que puedan arreglar los problemas asociados a la vía ocular (Sinha et al., 2009)

Las patologías que más debilitan los ojos, son las cataratas y otros problemas de retina como, degeneración macular o retinitis pigmentosa, glaucoma o uveítis. Estas generan problemas más graves, que pueden llevar a la ceguera total. Otras patologías asociadas al ojo son la sequedad ocular, la conjuntivitis bacteriana, alergias oculares, o inflamaciones, éstas no ocasionarían la pérdida de visión total, pero sí una pérdida significativa de la calidad de vida.

La administración ocular de fármacos se utiliza habitualmente para el tratamiento de los trastornos superficiales y/o internos del ojo. El reto principal de la terapia ocular es alcanzar una concentración óptima del fármaco en el lugar de acción. Sin embargo, la baja biodisponibilidad de los fármacos a partir de formas de dosificación clásicas está vinculada principalmente a la estructura anatómica y fisiológica de la vía ocular.

Los procesos fisiológicos del ojo disminuyen significativamente la biodisponibilidad de los fármacos en la superficie ocular, limitando su absorción y favoreciendo la eliminación del mismo.

### ***Fisiología del ojo***

La superficie corneal y conjuntival están cubiertas por la película lagrimal, cuyo espesor oscila en el rango de 7-8  $\mu\text{m}$ . Esta película está constituida por tres capas: la capa posterior está formada por las células calciformes del epitelio conjuntival y es rica en glicoproteínas; la capa intermedia es acuosa y contiene proteínas tales como la lisozima que presenta actividad antibacteriana; y la capa oleosa externa producida principalmente por las glándulas meibomianas, cuya función es retardar la evaporación de la lágrima. El volumen de la lágrima en un adulto es de 9  $\mu\text{L}$  (Sasaki, et al. 1996); la secreción lagrimal basal en humanos es de 1.2  $\mu\text{L}/\text{min}$ , mientras que el saco lagrimal tiene una capacidad de almacenamiento de 30  $\mu\text{L}$ . Sin embargo, el volumen de una gota de colirio convencional oscila entre 40 y 50  $\mu\text{L}$ , por lo que después de la instilación del fármaco en dicha forma de dosificación, el exceso del volumen es eliminado de la superficie ocular (aproximadamente 20  $\mu\text{L}$ ) y a continuación los nervios de la córnea inducen la formación de lágrimas reflejas, cuyo volumen varía entre 3 a 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Este volumen varía de acuerdo con las propiedades irritantes del fármaco y de la formulación administrada. El aumento en la formación de lágrimas favorece el drenaje del fármaco de la superficie ocular y su dilución. Además, también se activa el reflejo de parpadeo provocando un aclaramiento acelerado del fármaco a través de las lágrimas. El incremento de fluido en el saco es llevado rápidamente al sistema de drenaje lagrimal por acción de los canalículos asociados con los movimientos palpebrales. En 90 segundos, la mayor parte del fármaco instilado es eliminado del área pre-corneal (Sasaki, et al. 1996). Adicionalmente, la unión del fármaco a las proteínas de la lágrima disminuye la cantidad efectiva del mismo en contacto con la córnea y además, la acción amortiguadora del ácido carbónico y los ácidos orgánicos débiles presentes en la lágrima facilitan la ionización del fármaco (Chrai, et al. 1974).

El fármaco instilado en la superficie ocular, que no fue eliminado por los procesos fisiológicos del ojo puede ser absorbido en el área pre-corneal a través del tejido esclerótico y/o conjuntiva.

La conjuntiva es una membrana mucosa, delgada y vascularizada que reviste la superficie interna de los párpados y la parte anterior de la esclera. El área superficial de la conjuntiva (16-18cm<sup>2</sup>) es superior al área de la córnea (1cm<sup>2</sup>), por lo que la absorción de los fármacos a través de la conjuntiva es usualmente mayor respecto a la córnea. La conjuntiva es más permeable a macromoléculas hidrófilas por vía paracelular que la córnea (Sasaki et al. 1996, Watsky et al. 1988).

La esclera es un tejido fibroso, rígido y grueso, formado por colágeno y mucopolisacáridos. La esclera ofrece una menor resistencia a la penetración de los fármacos respecto a la córnea. Sin embargo, los fármacos que son absorbidos a través del tejido conjuntival y/o esclera pueden pasar a la circulación sistémica, lo que constituye una vía importante en la eliminación del fármaco administrado tópicamente, con la posibilidad de inducir a efectos adversos.

En el área corneal, el fármaco administrado tópicamente que no fue absorbido por la conjuntiva y/o esclera o eliminado por la fisiología ocular, puede penetrar la córnea a través de dos mecanismos: paracelular (a través de los espacios intercelulares) y/o transcelular (a través de los espacios intracelulares) (Pal et al. 2002).

La córnea actúa a modo de barrera protectora que impide la entrada de sustancias extrañas y a su vez, modifica el transporte de los iones. El diámetro y radio de curvatura de la superficie anterior de la córnea es 11.7 mm y 7.8 mm, respectivamente; y su espesor está en el rango de 0.5 a 0.7 mm. La córnea es un tejido ópticamente transparente que consta de cinco capas, del exterior al interior son: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana Descemet y endotelio (Figura 14). Sin embargo, en la penetración transcorneal de los fármacos, únicamente tres de estas capas limita significativamente el paso del fármaco a las estructuras internas del ojo: epitelio, estroma y endotelio (Mannermaa et al. 2006).

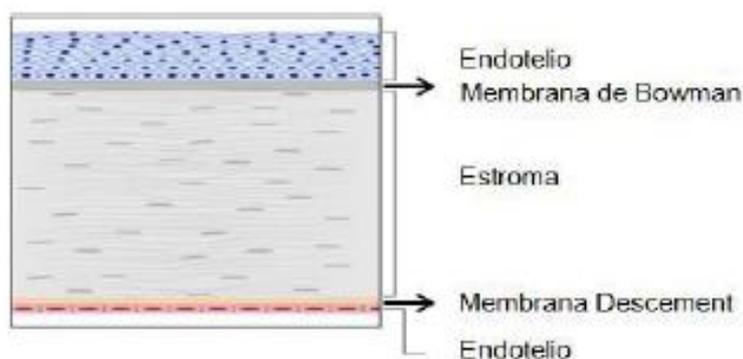


Figura 14. Estructura anatómica de la córnea

El epitelio de tipo escamoso, estratificado no queratinizado, consta de una capa basal de células columnares, dos o tres capas de células y una o dos capas externas de células superficiales de forma poligonal y escamosa. El epitelio posee una abundante cantidad de lípidos en su estructura celular. Las células superficiales del epitelio presentan uniones intercelulares estrechas, lo que constituye una barrera selectiva para moléculas lipófilas pequeñas y excluye la penetración de macromoléculas ( $r > 10 \text{ \AA}$ ) por la vía paracelular. En consecuencia, el epitelio corneal es considerado como la principal barrera para la penetración de los fármacos en los tejidos intraoculares. Algunos investigadores han reportado que los niveles de calcio celular y los filamentos de actina probablemente desempeñan un papel importante en la integridad de las uniones estrechas (Grass et al. 1988).

El estroma corneal es un tejido hidrófilo, compuesto principalmente por agua, lo que favorece la penetración de moléculas hidrófilas. Este tejido está formado por fibras de colágeno, estructuradas en forma láminas paralelas entre sí, formando haces de colágeno de diferente espesor y diámetro (Komai et al. 1991). Los fibroblastos corneales (queratocitos) son el principal componente celular del estroma y representan del 2 al 3% del volumen total del estroma (Järvinen et al. 1995).

El endotelio cornea consta de una única capa de células hexagonales que recubre la superficie posterior de la córnea. Este tejido se encuentra en contacto directo con el

humor acuoso. Las uniones intercelulares estrechas, también están presentes en este tejido, sin embargo, son menos estrechas respecto a uniones intercelulares del epitelio. El endotelio posee en su estructura celular una gran cantidad de fosfolípidos, por lo que las sustancias lipófilas pueden atravesar fácilmente esta membrana.

El endotelio mantiene la hidratación normal en la córnea y regula el paso de sustancias desde el humor acuoso al estroma (Grass et al. 1988, Pal et al. 2002).

La absorción transcorneal es un proceso que ocurre más lentamente que la eliminación del fármaco de la superficie ocular. La constante de eliminación de muchos fármacos es de aproximadamente 0.5 a 0.7/min, mientras que la constante de absorción es cercana a 0.001/min (Pal et al. 2002).

El fármaco absorbido a través de la córnea pasa a los tejidos internos del ojo. En el área posterior de córnea, la porción del fármaco instilado que ha atravesado las barreras oculares es distribuido y/o eliminado a través del humor acuoso. El humor acuoso fluye a una velocidad de 2 ó 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  para llevar nutrientes y oxígeno a los tejidos vasculares del ojo y facilita eliminación de la materia de desecho de los tejidos circundantes. Por otra parte, la unión de los fármacos a algunos componentes de los tejidos tales como, la melanina presente en el iris puede disminuir el aclaramiento ocular. Por otra parte, esta unión también es capaz de reducir la concentración de fármaco en el humor acuoso y, en consecuencia, disminuir la respuesta farmacológica.

El iris y el cuerpo ciliar poseen una capa intensamente pigmentada de células epiteliales. El tejido del iris es altamente poroso, vascular y posee una gran superficie, por lo que se produce rápidamente un equilibrio de distribución del fármaco disuelto en el humor acuoso. La unión de los fármacos a los tejidos pigmentados del iris y el cuerpo ciliar puede afectar su biodisponibilidad. Los gránulos pigmentados liberan lentamente el fármaco. Por lo que, la alta afinidad de unión de los pigmentos a los fármacos disminuye la concentración de fármaco libre en el reservorio de la cámara anterior.

El cristalino situado detrás del iris y delante del vítreo, está rodeado por una cápsula de colágeno. El núcleo está formado por materia celular rígida y densa que impide el paso de los fármacos a través de ella (Sasaki et al. 1996).

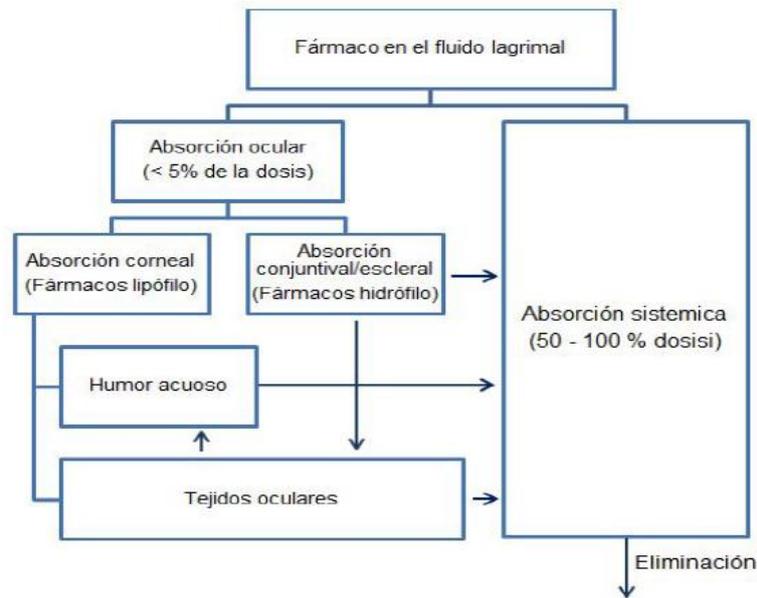


Figura 15. Absorción, distribución y eliminación de los fármacos administrados por vía ocular.

En suma, los fármacos son eliminados principalmente del área pre-corneal por el drenaje de la solución instilada, por efecto del lagrimeo y por la absorción no productiva llevada a cabo a través de la conjuntival y/o transescleral del ojo. Estos factores y la relativa impermeabilidad de la córnea limitan la penetración intraocular del fármaco administrado; en consecuencia, un porcentaje inferior (< 5%) de a la dosis del fármaco administrado es capaz de llegar a los tejidos internos del ojo, mientras que la mayor parte de la dosis es absorbida sistémicamente (Figura 15).

## 1.9. PENETRACION TRANSDERMICA Y TRANSMUCOSA

El efecto de los medicamentos aplicados tópicamente puede ser de dos tipos: *Tópico y/o Sistémico*. Así pues, tras la administración de un activo sobre la piel o mucosa este puede ejercer su efecto solamente en los tejidos locales o capas más superficiales y/o en cualquiera de los tejidos del cuerpo como si su aplicación fuese por vía oral o parenteral. Por tanto, la administración transdérmica o transmucosa de fármacos representa una vía de administración alternativa más práctica, segura y menos invasiva que las vías convencionales de administración basadas en el uso de agujas o formas farmacéuticas sólidas orales.

A pesar de que la de administración transdérmica o transmucosa de principios activos no ha sido todavía explotada, sus ventajas potenciales respecto a otras vías de administración son innumerables, entre ellas:

- Evita el tracto gastrointestinal y la biotransformación del efecto de primer paso hepático
- Liberación en un lugar específico
- Control del porcentaje de absorción
- Puede formularse como un compuesto de liberación retardada
- Proporciona una dosis constante
- Reduce los efectos secundarios sistémicos
- Fácil aplicación. Mejora el cumplimiento por el paciente
- Permite que se hallen concentraciones sustanciales del fármaco en el interior de los tejidos blandos del lugar de aplicación
- Superficie fácilmente accesible (posibilidad de controlar y/o eliminar la forma farmacéutica).

Estas ventajas son especialmente útiles en el caso de fármacos susceptibles de degradarse en el tracto gastrointestinal, fármacos usados en tratamientos crónicos, o fármacos utilizados en terapias de reemplazo.

Además, tanto la piel y la mucosa oral son vías de administración muy popular, debido a su buena accesibilidad y una elevada aceptación por parte del paciente (Hearnden y

cols. 2012). Además, están expuestas de forma rutinaria a diferentes compuestos y estrés mecánico, por lo que se presupone como robustas y menos sensibles a irritación por parte del fármaco, forma farmacéutica, uso de promotores de la absorción, etc, que otras vías.

No obstante, se deberá tener en cuenta que tanto en piel como en mucosa también existe metabolismo (Goebel y cols.2009), y aunque su carga metabólica es mucho menos que la hepática, puede ser un inconveniente para la administración de determinados fármacos por estas vías. Por otro lado, la gran variedad de microorganismos presentes en piel y en mucosas también pueden alterar algunos fármacos (Yamahara y Lee, 1993).

Como ventaja de la vía transmucosa oral frente a la transdérmica se puede decir que es más permeable, más vascularizada, menos sensible a materiales alergénicos e irritantes y posee una mayor hidratación que permite la solubilización del fármaco. Estos factores hacen que la mucosa oral sea una vía de administración interesante para fármacos que requerían un rápido inicio de la acción a nivel sistémico (Sankar y cols.2011).

Una consideración a tener en cuenta, son las zonas límites entre piel y mucosa, como labios, piel peri-ocular, peri-anal y peri-genital. Estos poseen características intermedias a las anteriormente citadas. El estrato corneo en esta zona es más delgado, por tanto más permeable.

Se considera que la mayoría de fármacos atraviesan la piel o mucosa por difusión pasiva, a pesar de que diversos autores observaron el transporte activo de algunos fármacos. Los procesos implicados en el paso del fármaco por vía transdérmica o transmucosa comprenden tres pasos (Figura 16). Primeramente, la liberación del fármaco del vehículo que lo contiene hasta la interfase piel/vehículo. Una vez aquí el fármaco penetra por las capas más externas, hasta las internas, pudiendo llegar a la circulación sistémica (Lu y Gao, 2010).

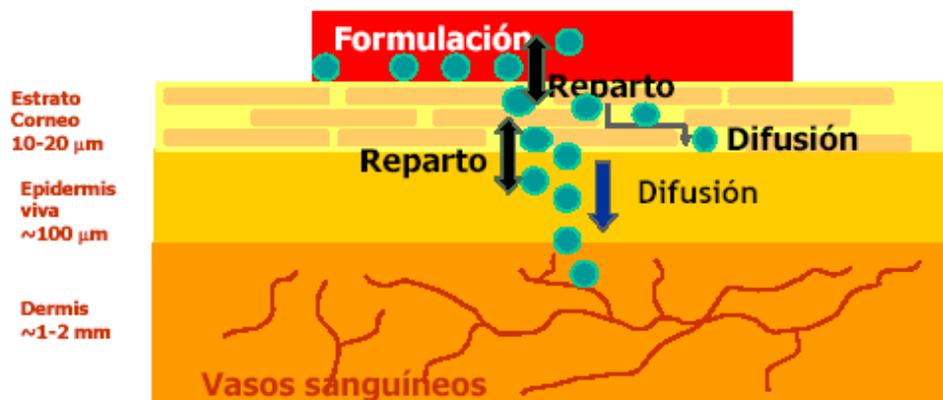


Figura 16. Esquema de los procesos implicados en la penetración dérmica.

El paso del fármaco a través de la piel puede producirse por dos rutas principales (Figura 17):

- Ruta transepidérmica. Esta es la vía más importante en la penetración cutánea. Se produce por difusión intercelular o intracelular. La vía intercelular es de naturaleza fundamentalmente lipídica (Elias y cols. 1981), por lo que el fármaco pasa a través de la matriz lipídica entre los corneocitos del estrato corneo. Los fármacos lipófilos difunden a través de estos lípidos extracelulares y los más polares a través de la parte hidrófila de dichos lípidos. En la vía intracelular el fármaco pasa a través de los corneocitos, salvando repetidos repartos entre el principio activo y las regiones hidrófilas y lipófilas de las bicapas lipídicas. Esto hace que el paso del fármaco a través de esta vía se amenos importante. Los compuestos apolares penetran por difusión a través de los lípidos intracelulares, mientras que lo polares lo hacen a través de la queratina hidratada presente en los queratinocitos.

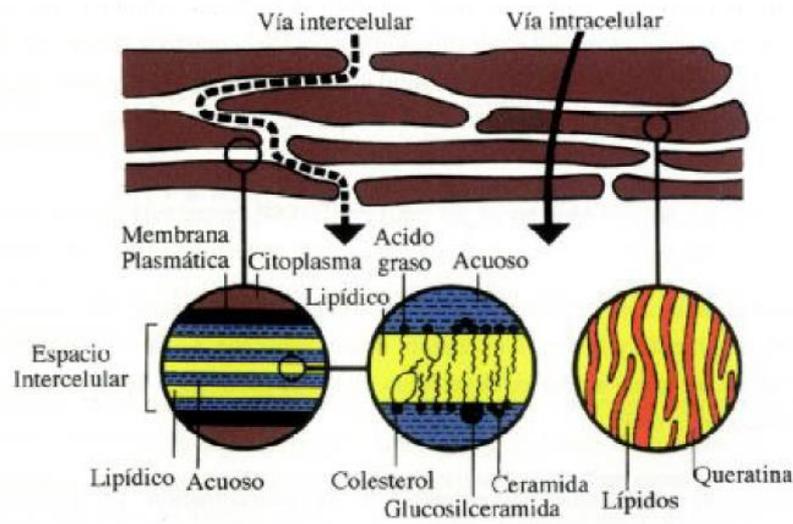


Figura 17. Esquema de la rutas de paso del faramco a traves de la piel.

- Ruta apendicular, cuando el fármaco pasa a través de glándulas sudoríparas, sebáceas o a través de los folículos pilosos. Esta vía de entrada es más rápida que las anteriores, aunque se considera una ruta minoritaria. Aproximadamente el 1% de la superficie corporal está cubierta por orificios porosos (Tanner y Marks, 2008).

La difusión del fármaco a través del epitelio bucal (Salamat-Miller y cols. 2005) se puede realizar de igual forma mediante tres mecanismos:

- Difusión pasiva transcelular o paracelular
- Transporte facilitado
- Endocitosis/exocitosis

### **1.9.1. Factores que influyen en la absorción percutánea**

#### ***Factores biológicos:***

- a. Edad: Debido a la variabilidad interindividual en los parámetros de permeación, los resultados de los estudios son poco concluyentes. Únicamente se puede afirmar que la piel de niños y recién nacidos, así como la de ancianos es más permeable que la del adulto (Bonina y cols.1993).
- b. Zona corporal. Existen grandes variaciones intraindividuales en función de la zona corporal (Wester y Maibach, 1999). El área menos permeable para el paso de sustancias es la planta del pie (grosor estrato corneo 600  $\mu\text{m}$ ), seguido de los tobillos y la palma de la mano (grosor estrato corneo 400  $\mu\text{m}$ ). El antebrazo y la espalda presentan una permeabilidad mayor, seguida de cuero cabelludo, axilas y frente. Las zonas más permeables resultaron ser el ángulo de la mandíbula y la piel del escroto (grosor estrato corneo 5  $\mu\text{m}$ ) (Scheuplein y Blank, 1971).
- c. Estado de la piel: Existen determinadas patologías que afectan al estado de la piel, pudiendo alterar su función barrera y de esta forma aumentar la permeabilidad de la misma a xenobiótico, fármacos, microorganismos. La permeabilidad aumenta en casos de descamación cutánea, agresión química o física, e inflamación.
- d. Grado de hidratación del estrato corneo: si aumenta el contenido de agua la permeabilidad de los fármacos aumenta (Idson, 1975), como se verá en el efecto oclusivo. Cuando el nivel de hidratación es menor al 10% se considera que la queratina esta deshidratada, se produce descamación del estrato corneo y se altera la absorción.
- e. Flujo sanguíneo: Al aumentar el flujo sanguíneo, el tiempo de residencia del fármaco en la dermis disminuye y aumenta por tanto el gradiente de concentración, favoreciendo el paso del fármaco de la superficie cutánea a la dermis. Si el flujo sanguíneo de la zona es bajo o disminuye, la sustancia no

puede difundir a medida que penetra, convirtiéndose en un factor limitante para la absorción del fármaco (Barry, 1983).

- f. Factores ambientales: Relacionado con el flujo sanguíneo, se podría citar el efecto vasoconstrictor que la disminución de la temperatura ambiental tiene sobre la superficie de la piel y la consecuente disminución de la permeabilidad. Como las formas tópicas se suelen aplicar bajo un ligero masaje, esto hace un aumento del flujo sanguíneo local y favorece la absorción del fármaco.

**Factores físico-químicos:**

- a. Criterios relacionados con el fármaco:
- Coeficiente de reparto: el coeficiente de reparto octanol/agua (logP) es uno de los factores más importantes para la penetración del fármaco a través del epitelio y puede ser utilizado para predecir el reparto en la piel. El logP y el reparto en la piel mantienen una relación parabólica (Kim y cols.2000). De tal forma que los compuestos con un bajo logP presentan una baja permeabilidad debido a su bajo reparto con los lípidos de la piel (tienden a quedarse en el vehículo), sin embargo los fármacos con un logP elevado (que facilita la salida del fármaco del vehículo hacia la piel) también poseen una baja permeabilidad por su incapacidad de reparto fuera del estrato corneo (que quedaría retenido en este). Se acepta que la máxima permeación se consigue con un logP entre 1 y 3 (Thomas y Finnin, 2004), La ley de Fick establece una proporcionalidad entre el flujo del fármaco a través de la piel y el coeficiente de reparto entre el vehículo y la piel.
  - Coeficiente de difusión. Expresa la velocidad de difusión de un compuesto en un determinado medio. Si se considera que las moléculas de fármaco son esféricas, el coeficiente de difusión se puede calcular por la ecuación 1 de Stokes-Einstein.

$$D = \frac{K \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad \text{Ecuación 1}$$

El coeficiente de difusión es inversamente proporcional al tamaño de la molécula. Por tanto, los fármacos con un bajo peso molecular son más susceptibles de penetrar a través del epitelio. El grado de dispersión influye de forma considerable la penetración de fármacos poco solubles en los vehículos porque afecta al coeficiente de difusión, por tanto al aumentar el grado de dispersión en el vehículo, aumenta el coeficiente de difusión y en consecuencia la penetración.

- Solubilidad del fármaco: La solubilidad del fármaco afectará a la liberación, ya que, al aumentar la concentración de fármaco disuelto en el vehículo, el gradiente de concentración entre el fármaco y la superficie cutánea será mayor, lo que se traduce en una mayor cantidad de fármaco liberado. La actividad termodinámica depende de la concentración y solubilidad del fármaco, así como de interacciones fármaco -fármaco y fármaco -vehículo. La actividad termodinámica del fármaco en el vehículo será máxima cuando se utilicen soluciones saturadas. Este parámetro indica la tendencia del fármaco a escapar del vehículo (Carelli y cols.1992). Otros autores recomiendan utilizar soluciones supersaturadas (Valenta y cols.2000) o suspensiones (Lippold, 1992) con el fin de que no disminuya la concentración de fármaco disuelto durante el proceso de liberación del mismo. En este caso se tendrá que tener en cuenta la velocidad de disolución del fármaco. Por otro lado, debe existir un equilibrio entre la afinidad del fármaco-vehículo y la afinidad fármaco-piel/mucosa, ya que una afinidad extrema hacia uno de ellos significará que el fármaco permanecerá mayoritariamente en el sitio más afín. Por tanto, los fármacos lipófilos disueltos en medios acuosos se absorberán antes que si se encuentran en un solvente lipófilo a la misma concentración (Jacobi y cols.2006). La mayoría de fármacos son ácido o bases débiles por lo que a pH fisiológico se encuentran parcialmente ionizados, presentando una solubilidad pH dependiente. Los fármacos que se encuentran ionizados difunden con mayor dificultad que los que se encuentran en su forma molecular.

Teniendo en cuenta todos estos factores, se podría afirmar que las características ideales del fármaco que le permiten penetrar a través de la piel son una solubilidad acuosa de

1mg/mL, peso molecular menor a 500 Dalton, punto de fusión menor a 200°C. Como regla general se estima que el fármaco no tenga capacidad para formar más de dos puentes de hidrógeno y así poder considerarlo con buena difusión (du Plessis y cols. 2002).

b. Criterios relacionados con el vehículo

- Concentración de fármaco: Según la ley de Fick para la difusión, la velocidad de transferencia de una sustancia desde zonas de alta concentración a las de baja concentración es proporcional al gradiente de concentración. Además, a mayor fármaco solubilizado en el vehículo sin poseer una selectividad selectiva con este, presentara una mayor actividad termodinámica. Esta aumentará si se incrementa la concentración del fármaco en la formula o manipulando el vehículo para disminuir la solubilidad del fármaco en este (Thomas y Finnin, 2004).
- Oclusión. La oclusión (de sistemas transdérmicos, apósitos oclusivos y bases lipófilas) ha demostrado aumentar la permeabilidad de algunos fármacos (Feldmann y Maibach, 1965). Por tanto, a medida que aumenta la fase acuosa en la formulación, el poder oclusivo de la misma disminuye. Los mecanismos implicados en este proceso, se piensa, que pueden ser debidos a la acumulación de agua dentro de la piel, hinchando los corneocitos y aumentando el agua de la matriz intercelular (Tsai y Maibach, 1999); por otro lado también aumenta la temperatura de la piel y disminuye la pérdida de co-solventes por evaporación (Taylor y cols.2002). No obstante, en algunos casos la oclusión puede provocar irritación y favorecer el crecimiento microbiano (Tanner y Marks, 2008).
- Viscosidad: Cuanto menor sea la viscosidad del vehículo mayor será la liberación del fármaco (Al-Khamis y cols.1986) ya que tendrá un mayor coeficiente de difusión. La elección de la formulación y su comportamiento reológico apropiado determinara el tiempo de residencia y la exposición local del fármaco en el sitio requerido.

- Dosis y frecuencia de aplicación (Lu y Gao, 2010): Con el fin de entender el efecto de los excipientes sobre la penetración transepidérmica, es recomendable la aplicación de dosis finitas en el compartimento donador ( $> 100$  mg de formulación por  $\text{cm}^2$ ). La aplicación de dosis infinitas da lugar a una relativamente constante fuerza de entrada del fármaco as través de la piel, permitiendo alcanzar estados estacionarios plasmáticos. Sin embargo, en la práctica diaria no se aplican dosis tan elevadas, sino aproximadamente  $2\text{-}5$   $\text{mg}/\text{cm}^2$ , dando lugar a una fina capa de la formulación ( $10\text{-}30$   $\mu\text{m}$ ), que es menos de lo necesario para que se sature de fármaco el estrato corneo. Obtenemos así un modelo de dosis finitas. Por otro lado, los efectos que tienen los excipientes sobre la piel pueden afectar a la penetración transdérmica de forma diferente cuando se aplican en forma de dosis única o siguiendo un esquema de múltiples dosis. Para estudiar el efecto de la frecuencia de dosis, es más aconsejable realizar un estudio de múltiples dosis finitas.
  
- c. Promotores de la absorción: Los promotores de absorción son moléculas de diferente naturaleza química que actúan reversiblemente a nivel del estrato córneo, desestructurado y facilitando que el fármaco permee más rápidamente hacia los tejidos viables y pase a circulación sistémica. Existe una teoría general (Lipid-Protein-Partitioning) basada en las posibles alteraciones a nivel molecular que sufre el estrato corneo por acción de los promotores. Esta teoría postula (Barry, 1988; Barry, 1987; Potts y cols.1991) que la acción promotora sobre las diferentes estructuras histológicas epidérmicas se va a producir mediante una o más de las siguientes acciones:
  - i. Interacción con las proteínas celulares, promoviendo la permeación a través de los corneocitos (vía intracelular).
  
  - ii. Interacción con la estructura lipídica que rodea los corneocitos, incrementando la difusión intercelular (vía intercelular). Esta acción puede producirse por la interacción de los promotores con los grupos polares de los lípidos, por la inserción de estos entre las estructuras lipídicas o por cambios en la polaridad en

determinadas zonas, variando el coeficiente de reparto del fármaco entre el vehículo y la piel.

- Ácidos y alcoholes grasos (Figura 18 y 19): El efecto promotor de este grupo de sustancias depende en gran medida de sus estructuras. Parece ser que el efecto promotor de estos se debe a la fluidificación de los lípidos cutáneos y al incremento en el nivel de hidratación superficial que estas sustancias pueden desarrollar (Cevc y cols.1996). Los ácidos grasos saturados generalmente aumentan el coeficiente de reparto del fármaco entre el vehículo y la piel. Su efectividad está relacionada con la longitud de la cadena hidrocarbonada. Las cadenas con 10 (Tanojo y cols.1997) o 12 (Kim y cols.1993) átomos de carbono son los que presentan una liofilia óptima. Los ácidos grasos insaturados alteran la estructura de los lípidos extracelulares y disminuyen la resistencia a la difusión de los compuestos, aumentando su absorción. En general los ácidos grasos insaturados son más eficaces que sus análogos saturados, ya que debido a la flexión del doble enlace se produce un mayor desorden en las bicapas lipídicas (Aungst, 1995). Respecto al grado de insaturación óptimo los estudios no son concluyentes. Mientras que algunos autores señalan que el efecto promotor aumenta al aumentar el número de insaturaciones (Carelli y cols.1992), otros apuntan a que poseen efectos similares (Kandimalla y cols.1999) o incluso menores (Santoyo, 1996), equiparándolos a los saturados. Se ha sugerido que el ácido oleico se dispone de forma heterogénea en las bicapas lipídicas dando lugar a la formación de canales fluidos dentro del estrato corneo (Walker y Hadgraft, 1991). El ácido oleico actúa en la ruta no polar, incrementando tanto la difusión como el reparto del fármaco (Koyama y cols.1994; Yamashita y cols.1995), pero en la ruta polar aumenta solo el reparto, lo que parece indicar que aumenta la hidratación del estrato corneo. Por otro lado, cabe destacar que los ácido grasos pueden formar pares iónicos con fármacos catiónicos aumentando así su coeficiente de reparto y por tanto su absorción (Aungst y cols.1990). También cabe destacar que el ácido oleico tiene que ser utilizado con cuidado debido a que su aplicación causa cambios morfológicos en las células de Langerhans de la epidermis. Estas células juegan un papel importante en la iniciación y coordinación de la respuesta inmune mediada por linfocitos T. Por

tanto, puede causar inmunosupresión en la piel a altas concentraciones (Kogan y Garti, 2006). El efecto promotor de los ácidos grasos parece ser concentración dependiente, al aumentar la concentración del ácido graso aumenta el efecto promotor hasta llegar a un máximo a partir del cual su efecto disminuye (Singh y cols. 1966). Los alcoholes grasos poseen el mismo mecanismo promotor que sus correspondientes ácidos grasos, pero más débil, ya que las interacciones con el estrato corneo son menores (Komata y cols. 1992). De estos el más efectivo es el alcohol láurico que puede ser tan efectivo como el ácido láurico (Yamada y Uda, 1987)

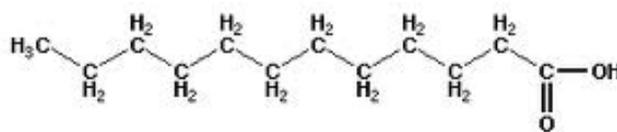


Figura 18. Estructura ácido láurico.

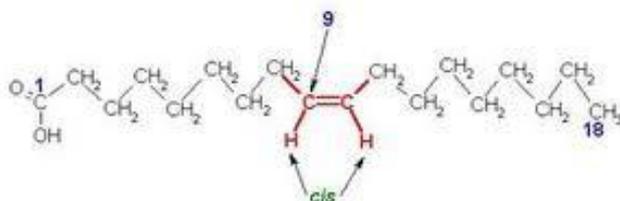


Figura 19. Estructura ácido oleico

- Esteres de alcoholes grasos: Destaca el miristato de isopropilo (Figura 20).

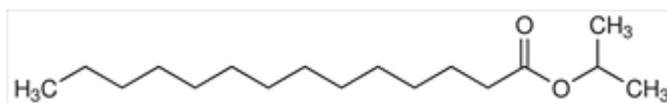


Figura 20. Estructura miristato isopropilo.

Actúa sobre los lípidos extracelulares, fluidificándolos (Leopold y Lippold, 1995a) y disminuyendo la resistencia de los mismo al paso del fármaco (Leopold

y Lippold, 1995b) y/o aumentando el coeficiente de reparto entre el fármaco, la formulación y el estrato corneo (Sato y cols.1988).

- Azona (Figura 21): (1- dodecilazacicloheptan-2-ona). Actúa rompiendo la organización de lípidos y aumentando el contenido hídrico de las proteínas del estrato corneo (Goodman y Barry, 1986). La inserción del gran ciclo de la azona en las regiones lamelares impide el empaquetamiento y la cristalización de los lípidos de la estructura, disminuyendo la resistencia a la difusión. Además, su cadena de doce átomos de carbono coincide con las dimensiones del colesterol, pudiendo alterar las interacciones colesterol-ceramida o colesterol- colesterol (Allan, 1995). La acción promotora de la azona depende de la concentración empleada y de la liofilia del fármaco (Diez-Sales y cols.1996).

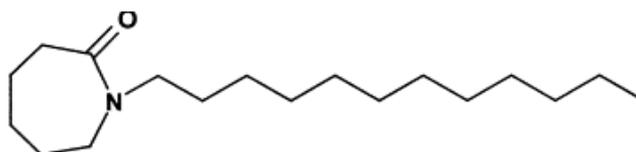


Figura 21. Estructura de la azona

Se usa normalmente a concentraciones bajas (1-5%) y su actividad se ve favorecida por el uso de cosolventes como el propilenglicol. En estos casos el papel del cosolvente es modificar el reparto del promotor en la piel (Beastall y cols.1988). Además, existe una potenciación del efecto promotor cuando se combinan ambos ya que la azona aumenta el paso de los fármacos por vía intercelular y el propilenglicol lo hace por vía intracelular (Takeuchi y cols.1995).

- tensioactivos: Por encima de la concentración micelar crítica los tensioactivos forman micelas, lo que hace disminuir la actividad termodinámica. El efecto promotor observado se debe a la capacidad de estos compuestos al penetrar la piel y desorganizar su estructura. Los tensioactivos parecen alterar tanto

estructuras lipídicas como las proteínas del estrato corneo (Goodman y Barry, 1989). Los tensioactivos catiónicos son los que producen una mayor irritación y daño en la piel, seguido de los tensioactivo aniónico y por último los no iónicos. Estos últimos además tienen un efecto promotor más inmediato ya que penetran en la membrana más fácilmente que los que se encuentra cargados en su superficie (Ashton y cols.1992). El efecto promotor de los tensioactivos depende en gran medida de su afinidad por el estrato corneo y de la solubilidad del fármaco en el vehículo.

- Terpenos (Figura 22): son constituyentes de los aceites esenciales constituidos por unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ), pudiendo incluir diversos heteroátomos en su estructura. Se clasifican en función del número de isoprenos que tienen en su estructura en monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) y biterpenos ( $C_{20}$ ). Las características fisicoquímicas varían de unos a otros, pero por lo general suelen tener una elevada liofilia. Algunos autores (Williams y Barry, 1991b) han encontrado una relación lineal entre el efecto promotor del terpeno y el logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua, por el contrario otros (Takanashi y cols.1999) encontraron una relación parabólica. Los terpenos actúan en parte rompiendo el empaquetamiento lipídico intercelular, aumentando así la difusión del fármaco (Barry, 1991).

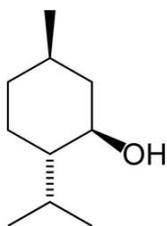


Figura 22. Estructura del mentol

El mentol se distribuye entre los espacios intercelulares del estrato corneo con la consiguiente desorganización reversible de los lípidos (Kunta y cols.1997), el timol aumenta la fluidez lipídica del estrato corneo y perturba la integridad de la epidermis. La carvona y el cineol perturban solo la integridad de la epidermis

(Gao y Singh, 1997). En caso de los fármacos lipófilos, el uso de estos promotores también hace aumentar el reparto del fármaco, debido al efecto solubilizante del mismo (Williams y Barry, 1991a). En caso del eugenol y el limoneno además se puede observar extracción lipídica del estrato corneo, lo que contribuye a su efecto promotor (Zhao y Singh, 1998).

- Sulfóxidos: dimetil sulfóxido (DMSO, Figura 23) es un solvente polar que penetra rápidamente ejerciendo su efecto promotor, que es dependiente de la concentración (Kai y cols.1993). El efecto promotor del DMSO se debe por un lado a las propiedades de solubilización de fármacos, lo que hace aumentar el reparto del fármaco en la piel. Por otro lado, también tiene efecto sobre el estrato corneo lo que disminuye la resistencia a la difusión (Barry, 1991). EL DMSO a concentraciones bajas se reparte inicialmente dentro de los corneocitos, desplaza el agua unida a las proteínas y crea una capa de solvatación mayor, cuando la concentración aumenta (por encima del 60%) produce un desplazamiento del agua que rodea a las cabezas polares de los lípidos intercelulares, lo cual favorece sobre todo la difusión de compuesto polares. Por último, también parece distorsionar el empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas (Anigbogu y cols.1995). Debido a las altas concentraciones requeridas, la irritación cutánea que produce, así como el mal olor de sus compuestos de degradación del DMSO, se ha estudiado derivados del mismo como el tetradecilmetilsulfoxido (TDCMS) y el decilmetilsulfoxido (DCMS).

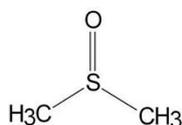


Figura 23. Estructura DMSO

- Urea (Figura 24): Es un compuesto higroscópico que aumenta la hidratación del estrato corneo, ya que induce la queratolisis de la piel después de un contacto prolongado, lo que forma canales hidrofílicos a través de los cuales pueden difundir los fármacos (Kim y cols.1993). También parece rebajar la temperatura

de transición de los componentes lipídicos aumentando la fluidez a temperatura ambiente (Beastall y cols.1988). Su uso como promotor está limitado debido a sus efectos proteléticos.

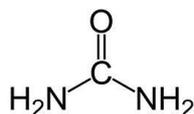


Figura 24. Estructura urea

- Pirrolidonas (Figura 25): La capacidad solubilizante de las pirrolidonas se debe en parte a la formación de pares iónicos lipófilos con fármacos aniónicos. La 2-pirrolidona es un solvente higroscópico similar al DMSO. A bajas concentraciones se reparte en las proteínas, desnaturalizando la alfa queratina y a altas concentraciones interacciona con los lípidos aumentando su fluidez. Además, aumenta el contenido de agua dentro del estrato corneo. La 2-pirrolidona parece aumentar la penetración y difusión de fármacos a través de la ruta polar y disminuye los de la ruta no polar (Southwell y Barry, 1984). Con el fin de mejorar el efecto promotor se han desarrollado derivados de la pirrolidonas como la N-metil-2-pirrolidona entre otros. Esta actúa por extracción parcial de esfingolípidos del estrato corneo (Ogiso y cols.1995) y por hidratación de la piel debido a su capacidad humectante (Bhatia y Singh, 1997). La N-dodecil-2-pirrolidona en cambio se intercala en la matriz de ceramidas por repulsiones electrostáticas (Fuhrman Jr y cols.1997).

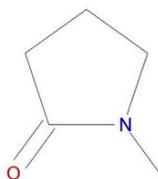


Figura 25. Estructura de n-metil -2 -pirrolidona

- Alcoholes: El etanol ha sido muy utilizado como co-solvente en formulaciones tópicas, ya que tiene la capacidad de aumentar la solubilidad de algunos fármacos. Parece ser que con los compuestos hidrófobos, que penetran disolviéndose en la regiones lipídicas fluidas del estrato corneo, el etanol se disuelve en estas regiones, aumentando así la solubilidad del fármaco en ellas (Berner y cols.1989). En caso de fármacos hidrófilos, el etanol produce una extracción de sustancias lipídicas y peptídicas, consiguiendo aumentar la porosidad del estrato corneo. Al igual que en otros casos el efecto promotor del etanol depende de la concentración en la que se introduce en la formulación. Así pues, a concentraciones bajas el etanol aumenta la solubilidad del fármaco en el estrato corneo (Yum y cols.1994), a concentraciones altas el etanol altera la estructura del estrato corneo aumentando la difusión de sustancias (Jiang y cols.1998). El mecanismo de acción no es totalmente claro, parece que puede producir una deshidratación del estrato corneo (Megrab y cols.1995) y un encogimiento de la queratina, con los consiguientes cambios conformacionales (Berner y cols.1989). Al aumentar el número de átomos de carbono de la cadena del alcohol, aumenta el efecto promotor (unas cuatro veces por cada grupo metilo introducido), siendo el n-propanol más potente que el isopropanol (Kim y cols.1992).
- Propilenglicol es generalmente un buen solubilizante de fármacos lipófilos en vehículos acuosos. Este es uno de los mecanismos promotores de este compuesto. Por otro lado, al igual que el etanol se disuelve en las capas acuosas que se encuentra entre las bicapas lipídicas y alteran su composición. Por tanto, aumentan la afinidad de esta fase por las sustancias lipófilas y favorecen el reparto de estos compuestos entre el vehículo y la piel. Sin embargo, grandes cantidades de propilenglicol en las formulaciones puede reducir el coeficiente de reparto entre el vehículo y la piel pudiendo contrarrestar el beneficio de aumentar el gradiente de concentración por la reducción global de la actividad del fármaco en el vehículo y por tanto disminuir el flujo transdérmico (Turi y cols.1979). También se ha observado que se intercala en las cabezas polares de los lípidos (Bouwstra y cols.1991) y que produce una solvatación de la alfa

queratina de los corneocitos por lo también favorece la penetración de fármacos por vía intracelular (Takeuchi y cols.1993).

### 1.9.2. Ecuaciones que definen las cinéticas de penetración transdérmica

Como se ha comentado anteriormente el paso de fármacos a través de la piel se produce por vía transepidérmica, siendo minoritaria la penetración a través de glándulas sudoríparas o por folículos pilosos. En general el paso de fármacos a través del estrato corneo está regido por un proceso de difusión pasiva, regido por la 2ª ley Fick (Scheuplein y Blank 1971). Las ecuaciones que describen el paso del fármaco a través de la membrana biológica son las mismas en el caso de la piel y la mucosa.

La cantidad de fármaco (Q) que aparece en el medio receptor a un tiempo (t) se calcula mediante la siguiente expresión (ecuación 2):

$$Q = APLC_0 \left[ \frac{Dt}{L^2} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2 t}{L^2}\right) \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde A es el área de difusión, P el coeficiente de reparto entre el vehículo y la piel, L el espesor de la membrana, Co la concentración inicial del principio activo en el vehículo y D el coeficiente de difusión del fármaco en la piel.

Cuando el coeficiente de difusión y la concentración de fármaco permanecen constantes (modelo de dosis infinitas) a lo largo del tiempo nos encontramos en estado estacionario, donde la anterior ecuación se expresa como (ecuación 3)

$$\frac{Q}{A} = PLC_0 \left( \frac{D_t}{L^2} - \frac{1}{6} \right) \quad \text{Ecuación 3}$$

A partir de esta el flujo,  $J$ , se determina desde la pendiente de la recta que representa la cantidad de fármaco que, por unidad de superficie, atraviesa una membrana frente al tiempo, una vez alcanzado el estado estacionario. El flujo se relaciona con el coeficiente de permeabilidad,  $K_p$ , mediante la concentración inicial de fármaco (ecuación 4) (Barry, 2002).

$$J = \frac{C_0 PD}{L} = C_0 K_p \quad \text{Ecuación 4}$$

Mediante la extrapolación de la parte lineal de la curva de estado estacionario al eje de abscisas (tiempo) se puede determinar el tiempo de latencia  $T_{lag}$  (ecuación 5)

$$T_{lag} = \frac{L^2}{6D} \quad \text{Ecuación 5}$$

Cuando obtenemos un modelo de dosis finitas el flujo no es constante en el tiempo. Se obtiene un flujo máximo dado por la ecuación siguiente (ecuación 6)

$$J_{max} = \frac{1.85DPC_0\delta}{L^2} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde  $\delta$  es el espesor de la formulación depositado sobre la superficie de la piel.

Por otro lado, Higuchi en 1960, relaciona el flujo con la actividad termodinámica del fármaco en el vehículo,  $\alpha$ , mediante la expresión (ecuación 7):

$$J = \frac{D\alpha}{L\gamma_s} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde  $\gamma_s$  es el coeficiente de actividad del fármaco en el estrato corneo y permanece constante si el vehículo no interacciona con la piel.

De forma análoga para explicar el paso de fármacos a través de la mucosa se han propuesto las siguientes ecuaciones (Sudhakar y cols. 2006):

El flujo transmucosa para fármacos que pasan a través de la ruta paracelular es el siguiente (ecuación 8)

$$J = \frac{DC\varepsilon}{h} \quad \text{Ecuación 8}$$

Siendo D el coeficiente de difusión en los espacios intercelulares, h la longitud de la ruta paracelular,  $\varepsilon$  la fracción de área de la ruta paracelular y C la concentración de fármaco en el compartimento donador.

Por otro lado, las ecuaciones que predicen el paso de fármaco a través de la ruta transcelular es (ecuación 9):

$$J = \frac{DC(1-\varepsilon)}{h} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde D es el coeficiente de difusión del fármaco en los espacios transcelulares y h la longitud de la ruta transcelular.

La permeación a través de la membrana biológica se rige a través de procesos de difusión del fármaco y reparto del fármaco entre el vehículo y membrana biológica, descritos respectivamente por P2 y P1.

$$P2 = \frac{1}{6 \times T_L} \quad \text{Ecuación 10}$$

$$P1 = \frac{J_{ss}}{C_0 \times P2} \quad \text{Ecuación 11}$$

Por último, con la obtención del parámetro flujo, se puede predecir cuales serían las concentraciones plasmáticas en estado estacionario tras la aplicación de un dispositivo de administración transdérmico o transmucosa.

$$C_{ss} = \frac{J \cdot SAT}{Cl_p} \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde  $C_{ss}$  es la concentración plasmática en estado estacionario; SAT es el área de aplicación del dispositivo y  $Cl_p$  es el aclaramiento plasmático del fármaco.

La técnica más utilizada para evaluar *in vitro* la permeación transdérmica de un fármaco a través de la piel es el método de las células de difusión. Las células de difusión estática más utilizadas hoy en día son las células de difusión vertical de Franz. Estas constan de un compartimento donador (donde se deposita la forma farmacéutica a ensayar) y un compartimento receptor (que simularía el tejido subyacente vascularizado, el fármaco en este compartimento sería el susceptible de distribuirse sistémicamente), separados por una membrana. La membrana más adecuada para la realización de estos estudios es la piel humana, aunque en ausencia de esta se puede utilizar piel de cerdo, que presenta propiedades histológicas, bioquímicas y un perfil de permeabilidad similar a la humana.

Dos son los puntos críticos para la evaluación de la permeación transdérmica y transmucosa mediante estas técnicas. Por un lado, el mantenimiento de las propiedades de barrera de la piel y mucosa. En caso de la piel, como ya se ha comentado anteriormente, es el estrato corneo y en el caso de la mucosa el mantenimiento de la viabilidad epitelial, así como los lípidos intercelulares. El mantenimiento de esta integridad del tejido puede evaluarse *in Vitro* mediante la medición de la pérdida de agua transepitelial (TEWL). El otro punto crítico es el mantenimiento de las condiciones sink a lo largo del experimento (el volumen del medio receptor debe ser por lo menos 3 veces mayor al necesario para formar una solución saturada de fármaco). De

esta manera se asegura que la permeación del fármaco no se ve limitada por la solubilidad del mismo en el medio receptor.

### **1.9.3. Cuantificación del fármaco en la piel**

Determinar la cantidad de fármaco retenido en la piel nos dará una idea acerca de la eficacia de un tratamiento local. Existen diversos métodos que nos permite determinarlo

- a. Extracción por disolvente (Touitou y Abed, 1985): consisten en la maceración de la piel en un determinado disolvente, que es analizado posteriormente. Este es un método rápido y sencillo que se puede utilizar prácticamente con cualquier principio activo. El inconveniente que representa esta técnica es que no da información acerca del fármaco retenido en cada capa de la piel, sino que da una información de la piel completa.
- b. Cuantificación mediante cortes horizontales. Consiste en cortar la piel en láminas paralelas de espesor variable mediante un criomicrotomo. El fármaco retenido en cada lamina es extraído con un disolvente y se cuantifica mediante una técnica analítica (Jadoul y cols.1995).
- c. Tape stripping. Consisten en aplicar tiras adhesivas en el estrato corneo. Se determina la cantidad de fármaco extraído con cada tira (Kammerau y cols.1975).
- d. Autorradiografía. Se realiza con el fármaco marcado radiactivamente. Mediante sistemas informáticos se puede cuantificar el fármaco en cada estrato de la piel, así como en los folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas (Touitou y cols.1994).

- e. Espectroscopia. Como la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (Mak, 1990). Estas técnicas son rápidas pero requieren de instrumentación muy costosa.

## **2.AIMS**



The main objective of this Doctoral Thesis is the development and biopharmaceutical evaluation of formulations containing Ketorolac tromethamine as anti-inflammatory agent for dermal and mucosal application.

To achieve this goal, the research work has been divided into several stages, which are specified below:

- To develop suitable formulations of Ketorolac tromethamine for topical and dermal use.
- To characterize the elaborated formulations in terms of physical-chemistry.
- To study the kinetic profile of the drug from the formulations by *in vitro* release studies.
- To assess the permeation of the drug across different biological membranes by *ex vivo* permeation tests.
- To study the dermal tolerance of the developed formulations.
- To evaluate the anti-inflammatory efficacy *in vivo* of the dermal formulations.
- To evaluate the influence of the formulations on the experimental cutaneous parameters of the skin after a dermal application.



## **3.MATERIALES Y MÉTODOS**



En esta sección se explican brevemente los estudios llevados a cabo para la realización de la tesis, así como el material utilizado para llevar a cabo dicha metodología.

A continuación, se enumera el material (fármaco, reactivos y equipos) utilizado para la realización del trabajo.

### 3.1. MATERIALES

Fármaco:

- Ketorolaco Trometamina (Sigma-Aldrich)

Reactivos:

- Agua Mili Q
- Acetato de etilo (Merck)
- Acetato de uranilo 1%.
- Acetona (Merck)
- Carbopol 940 (Fagron.)
- Di-hidrógeno fosfato sódico (Sigma-Aldrich)
- Hidróxido sódico (Panreac)
- Lauril Sulfato Sódico (Panreac)
- Metanol de calidad HPLC (Merck)
- PBS 7.6 (Sigma)
- PLGA: Ácido poli-láctico-co-glicólico (Resomer® RG 503H, Alcon)
- Pluronic F-127 (Fagron)
- PVA: Poli-Vinil Alcohol 87-90% (Sigma-Aldrich)
- Tinción hematoxilina-eosina
- Trientanolamina (Sigma-Aldrich.)
- 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato TPA (Sigma-Aldrich)

Material biológico:

- Piel porcina (Raza Landrace Large White)
- Piel humana (Barcelona SCIAS Hospital)
- Mucosa bucal y sublingual porcina (Raza Landrace Large White)
- Ratones (Swiss CD-1)
- Huevos de gallina embrionados

Equipos y material co-adyuvante:

- Agitador y núcleos magnéticos
- Analizador óptico Turbiscan T-Lab® Expert (Formulation)
- Balanza analítica: Mettler Toledo AT261 Delta Range
- Baño de ultrasonidos: Selecta Ultrasons 514
- Campana de gases: Toxicap 1200
- Células de difusión vertical de Franz
- Centrífuga (Sigma 301K, España Eppendorff)
- Consola de agitación grande y baño termostatzado (Crown Glass Company, Sommerville, NJ)
- Cromatógrafo Hitachi-Merck HPLC con detector UV-Vis L-4250
- Columna C18 (LiChrocart 250-4/LiChrosorb RP-18, 5 µm)
- Cutómetro® MPA 580
  - Sondas:
    - Temperatura, (Skin thermometer ST 500)
    - TEWL (Tewameter® TM300)
    - Corneòmetre (Corneometer® CM825)
- Dermatomo con acumulador Aesculap mod. GA 630
- Dispositivos de filtración Ultracel YM-100 (Amicon®), de Millipore)
- Equipo de Calorimetría diferencial de barrido Mettler TA 4000 equipado con célula DSC 25. Microbalanza Mettler M3.
- Espectrofotómetro de correlación fotónica, zetasiser, modelo nano zs (Malvern Instruments Ltd. GB. Constituido por unidad óptica del espectrofotómetro

equipado con un láser de He-Ne ( $\lambda$  de 633nm). Rango de tamaño de partícula de 0,6 nm a 6 $\mu$ m.

- Filtros de celulosa Watmann n°11 y filtros de centrifuga Lida (PM=100.000 KDa),
- Material de laboratorio de vidrio.
- Membrana de diálisis (Teknokroma; PM: 12-14000 Dalton)
- Membrana filtración de Nylon 0,45  $\mu$ m (Sigma Aldrich)
- Micropipetas automáticas.
- Microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL J-7100F
- Microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL 1010
- Osmómetro Model 3320 (Advanced Instruments, INC)
- Parafilm®
- Parafina
- pHmetro: micropH 2001. Crison
- Reómetro RheoStress 1. (Thermo Fisher Scientific) con sistema de placas Paralelo
- Rotavapor R-210. Buchi.
- Sistema de agua desmineralizada Sation Aqualab
- Sonda de Ultrasonidos de alta intensidad 13 mm (Sonics Vibracell)
- Z-sizer nano ZS. Malvern Instruments

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Elaboración de formulaciones de Ketorolaco de Trometamina**

Se han desarrollado 3 hidrogeles al 2% de KT. Los polímeros utilizados fueron Carbopol® 940, Pluronic® F-127 y Carboximetilcelulosa (CMC). Los hidrogeles se prepararon por dispersión del polímero en una solución de KT al 2%.

#### ***Preparación de hidrogeles***

##### ***Para uso dérmico***

##### **Preparación gel de Carbopol 2%:**

Se pesaron 2 g de Carbopol 940 y se dispersaron en 100 ml de una solución de KT al 2%. El gel se dejó reposar e hinchar durante 24 horas a temperatura ambiente, periodo tras el cual se ajustó el pH a 5,5 con Trietanolamina.

##### **Preparación gel de Pluronic F-127 18%:**

Se pesaron 18 g de Pluronic F-127 y se dispersaron 100 ml de una solución de KT al 2%. Como en el caso anterior, se utilizó un agitador magnético para favorecer la disolución. Se mantuvo bajo agitación y en condiciones de refrigeración (4°C) durante 24 horas.

##### ***Para la mucosa bucal***

##### **Preparación del mucoadhesivo de Carbopol 2%**

Se hizo el mismo procedimiento realizado para el hidrogel de carbopol de uso dérmico, descrito anteriormente.

### **Preparación del mucoadhesivo de Carboximetilcelulosa 4%**

Se pesó la cantidad necesaria de Carboximetilcelulosa sódica (CMCNa) y Glicerina, 4 gramos y 5 gramos respectivamente y se mezclaron hasta formar una pasta. Paralelamente, se calentaron 100 mL de agua a 50°C donde se disolvieron 2 gramos de Ketorolaco Trometamina, previamente pesados. Seguidamente dicha solución se añadió a la pasta antes formada de CMCNa y glicerina y se homogenizó todo debidamente. Finalmente, se dejó reposar 24 horas a temperatura ambiente.

### ***Preparación de nanopartículas poliméricas***

Las nanopartículas se prepararon por el método de la doble emulsión-desplazamiento de solvente, que consiste en la preparación de una emulsión w/o en una primera fase por adición del fármaco hidrofílico a un polímero orgánico; esta emulsión w/o se añade a una segunda fase acuosa para formar la doble emulsión w/o/w. Al evaporar el disolvente orgánico se obtienen las nanopartículas. Las NPs se optimizaron en base a un diseño factorial central compuesto.

#### **a) Preparación de la fase orgánico:**

Entre 90-110mg de PLGA fueron disueltos en 1ml de acetato de etilo en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos, hasta la completa disolución.

#### **b) Preparación de la fase acuosa:**

Consistió en dos etapas, en la primera 20-80mg de KT se disolvieron en 0.25 ml de agua Mili Q a pH 2,5-7,5. En la segunda etapa, 40mg de PVA fueron disueltos en 2ml de agua al pH de trabajo (PVA al 2%).

A continuación se procedió a sonicar las dos disoluciones durante 5 minutos. Finalmente se disolvió 15mg de PVA en 5ml de agua al pH de trabajo (PVA al 0,3%).

**c) Preparación de las nanopartículas:**

Se adicionó cuidadosamente la disolución 1\* en la fase orgánica con la ayuda de una pipeta Pasteur. Seguidamente, la disolución anterior fue sonciada durante 2 ciclos de 10 segundos (20 segundos en total) a 50 watts en un baño de hielo.

Formación de la emulsión agua/aceite (w/o):

- i.** Tiempo: 0h:00m:10s
- ii.** Temperatura: 25°C
- iii.** Pulsos: 10s on, 10s off
- iv.** Amplitud del 30%

A continuación, se fue adicionando la disolución de PVA al 2% gota a gota con la ayuda de una pipeta Pasteur, a la emulsión obtenida w/o. Se sonicó durante 1,30 min a 50 Watts en un baño de hielo realizando ciclos de 10s a una amplitud del 30%.

Formación de la emulsión agua/aceite/agua (w/o/w):

- v.** Tiempo: 0h:01m:30s
- vi.** Temperatura: 25°C
- vii.** Pulsos: 10s on, 10s off
- viii.** Amplitud: 30%

La solución de PVA al 0,3% fue adicionada gota a gota con la ayuda de una pipeta Pasteur a la emulsión w/o/w. (El PVA al 0,3% actuó como estabilizador)

Una vez completada la preparación de las nanopartículas se procedió a **eliminar el disolvente orgánico** con la ayuda de un rotavapor con las siguientes condiciones:

- Temperatura: 35 °C
- Rotación: media
- Vacío: 72 cm Hg

### **3.2.2. Diseño factorial**

Se llevó a cabo el diseño factorial cambiando las concentraciones de KT, las cantidades de PLGA y variando el pH del agua. Las cantidades de tensioactivo se mantuvieron constantes en todas las formulaciones.

Las variables independientes de este diseño experimental fueron: concentración de fármaco (X1), cantidad de polímero (X2), el pH del agua (X3), sobre el tamaño medio de partícula, Índice de polidispersidad (PdI) y eficiencia de encapsulación (EE) de las NP-KT. El diseño factorial proporcionó los valores de nivel superior (+1) e inferior (-1) para cada variable evaluada (X1-X3). Un total de 16 experimentos fueron realizados con 6 puntos axiales y 1 punto central replicado.

Las respuestas experimentales estudiadas fueron los resultados de La influencia Individual y las interacciones de las 3 variables independientes.

Para realizar el análisis estadístico de datos se utilizó el software del programa centurión Statgraphics y se analizó el análisis de varianza (ANOVA), capaz de determinar la importancia de los factores e interacciones entre ellos.

## **3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES**

### **3.3.1. Caracterización de los hidrogeles dérmicos**

Se determinaron las siguientes características fisicoquímicas de los hidrogeles: aspecto visual, pH, comportamiento reológico y estabilidad óptica mediante Turbiscan.

Se observaron las características macroscópicas, es decir, se observaron el color, la textura y la ausencia de partículas visibles en ambos geles. Por otro lado, el pH fue medido mediante el pHmetro previamente calibrado. Se realizaron tres medidas de cada gel.

## Reología

Otra de las caracterizaciones realizadas, es la reología. Mediante la cual, se mide las propiedades de flujo de los geles. Utilizando el reómetro, se somete el material que se quiere estudiar a diferentes tipos de deformaciones controladas y se miden los esfuerzos. Una de las propiedades reológicas más importantes es la viscosidad.

En la figura 26 se puede observar como se clasifican los fluidos según su comportamiento en función de la fuerza de cizalla utilizada.

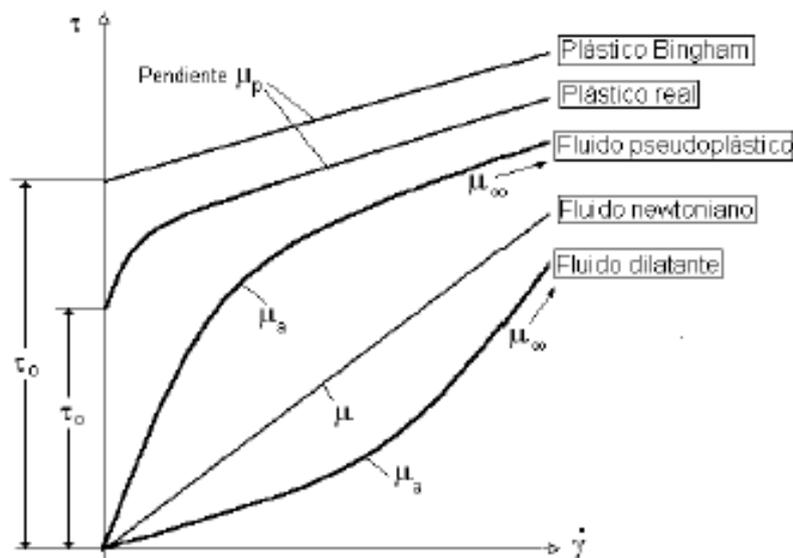


Figura 26. Clasificación de los fluidos.

Para determinar la reología de los geles se puso una pequeña muestra de cada uno en el Reómetro (RheoStress 1, Thermo Fisher Scientific) el cual mediante un sistema de placas paralelas y un sistema informático permite calcular las características reológicas de las formulaciones.

Los datos procedentes de las curvas de flujo de ambos geles se ajustaron a diferentes modelos matemáticos para caracterizar sus propiedades de flujo y describir los datos experimentales.

$$\text{Newton: } \tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad \text{Ecuación 13}$$

Siendo: ( $\tau$ = esfuerzo de cizalla,  $\eta$ = viscosidad dinámica,  $\dot{\gamma}$ = velocidad de deformación)

$$\text{Ostwald de Waele: } \eta = K * \dot{\gamma}^{(N-1)} \quad \text{Ecuación 14}$$

Siendo: ( $\eta$ = viscosidad aparente,  $K$  = es el coeficiente de consistencia,  $\dot{\gamma}$  = Velocidad de deformación,  $N$  = índice de comportamiento de flujo).

$$\text{Herschel-Bulkley: } \eta = \frac{\tau_0}{\dot{\gamma} + K * \dot{\gamma}^{(N-1)}} \quad \text{Ecuación 15}$$

Siendo: ( $\eta$ = viscosidad aparente,  $\tau_0$  = Umbral de de fluencia o esfuerzo de cizalla cuando la velocidad de deformación tiende a cero,  $\dot{\gamma}$  = Velocidad de deformación,  $K$  = es el coeficiente de consistencia y  $N$  = índice de comportamiento de flujo).

$$\text{Cross- Williamson: } \eta = \eta_{\infty} + \frac{(\eta_0 - \eta_{\infty})}{\left(1 + \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_b}\right)^N\right)} \quad \text{Ecuación 16}$$

Siendo: ( $\eta$ = viscosidad aparente,  $\eta_0$  y  $\eta_{\infty}$ = son valores asintóticos de viscosidad a muy baja y a muy alta velocidad de cizalla,  $\dot{\gamma}$  = Velocidad de deformación,  $\dot{\gamma}_b$ = velocidad de deformación en un punto b,  $N$  = índice de comportamiento de flujo).

**Bingham:** 
$$\eta = \frac{\eta_p + \tau_0}{\dot{\gamma}}$$
 Ecuación 17

Siendo: ( $\eta$ = viscosidad aparente,  $\eta_p$ = Viscosidad plástica,  $\tau_0$  = Umbral de fluencia o esfuerzo de cizalla cuando la velocidad de deformación tiende a cero,  $\dot{\gamma}$  = Velocidad de Deformación) (Ibarrola et al., 2007).

### **Swelling**

Los HG tienen la capacidad de captar agua y hincharse incrementando la viscosidad. Con la determinación del swelling se evalúa esta propiedad de los geles.

El *swelling ratio* se evaluó según el método de Yin L 2007, Sarker A, 2014, 2017 NS de Malik, García Astrain C 2016). Brevemente, los HG secos (desechados en estufa a 40°C hasta peso constante) se incubaron en PBS pH 5.5 a 32 °C durante 24 horas para C940-HG y 30 minutos para P407-HG. En tiempos predeterminados, las muestras fueron quitadas y se pesaron (Wt) después de secar el agua superficial. La captación de PBS se realizó por triplicado. Y el *swelling ratio* se calculó con base en:

$$Q = \frac{(W_s - W_d)}{W_d}$$
 Ecuación 18

Donde  $W_s$  es el peso del HG hinchado a los diferentes tiempos y  $W_d$  es el peso del HG seco.

### **Perfil de degradación**

Puesto que los polímeros utilizados en la preparación de los HG son biodegradables y biocompatibles, por lo tanto, tienen un tiempo de residencia limitado en los fluidos

fisiológicos. Estudiando el perfil de degradación se evalúa la constante de degradación del vehículo.

El perfil de degradación se evaluó sumergiendo una cantidad pesada de los HG frescos (Carbopol =  $440 \pm 2$  mg y Pluronic  $321.74 \pm 2$  mg) en PBS pH 5.5 durante 24 horas para C940-HG y 19 minutos para P407-HG. Las muestras se pesaron en intervalos de tiempo después de retirar el exceso de agua en superficie. Se realizaron tres repeticiones ( $n = 3$ ). La pérdida de peso de los HG se calculó según la ecuación:

$$\text{pérdida de peso (\%)} = \frac{(W_i - W_t)}{W_i} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 19}$$

Donde  $W_t$  es el peso de la HG en los diferentes puntos temporales y  $W_i$  es el peso de la HG seco.

### **Porosidad**

La liberación del principio activo viene modulada por el tamaño del poro resultante del HG ya que esto determina la difusión del fármaco a través del polímero y está por tanto, relacionada con la cinética de liberación.

Para estudiar la porosidad se incubó una cantidad pesada de HG secos geles secos en Etanol Absoluto durante 4h; tiempo en el cual se volvió a pesar. La porosidad se determinó aplicando la fórmula se detalla más abajo. La porosidad se calcula por el método de sustitución de disolventes, que consiste en sumergir el HG seco en etanol absoluto durante 4h para C940-HG y a 2 minutos de P407-HG. La porosidad se calcula según la ecuación: (Yin L, 2007):

$$\text{Porosidad} = \frac{(M_2 - M_1)}{\rho \cdot V} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 20}$$

Donde  $M_1$  es la masa de la HG seco al ser sumergida en etanol,  $M_2$  representa la masa de mercurio después de inmersión en etanol,  $\rho$  y  $V$  la densidad de etanol absoluto y el volumen de hidrogel, respectivamente.

### ***Estudio morfológico***

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia. Utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen.

La preparación de las muestras es relativamente fácil ya que la mayoría de los SEM sólo requieren que estas sean conductoras. La muestra generalmente se recubre con una capa de carbono o una capa delgada de un metal, como el oro, para darle carácter conductor. Posteriormente, se barre la superficie con electrones acelerados que viajan a través del cañón. Un detector formado por lentes basadas en electroimanes, mide la cantidad e intensidad de los electrones que devuelve la muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones mediante imagen digital.

La estructura de ambos hidrogeles fue examinada por microscopía electrónica de barrido (SEM). Los hidrogeles secos se cubrieron con una fina capa de carbón (Emitech K950X). Los experimentos se llevaron a cabo por un JEOL J-7100F. Para obtener imágenes de SEM mediante un detector de electrones secundarios (Everhart-Thornley) se aplicó un voltaje de aceleración de 10KV.

### ***Estabilidad óptica a corto plazo***

Para evaluar la estabilidad física de los hidrogeles, se realizó la estabilidad óptica a corto plazo por medios Turbiscan T-Lab® Expert (Formulation, Francia). Esta técnica utiliza varias mediciones de la dispersión de la luz para detectar fenómenos de desestabilización. El sensor óptico compone de una fuente de luz infrarroja pulsada ( $\gamma = 880 \text{ nm}$ ) y dos sensores ópticos sincrónicos: uno de retrodispersión y otro para transmisión. El detector de transmisión recibe la luz cruzando el producto ( $135^\circ$  de la radiación incidente), mientras que el detector de retrodispersión recibe la luz dispersada hacia atrás por el producto. Las medidas se centran en diferencias en la fracción de volumen de la partícula (migración) o tamaño medio, por lo tanto conduce a cambios en señales de transmisión y de retrodispersión (Celia et al., 2009, Lemarchand et al., 2003, González-Mira et al., 2010).

Los HG fueron almacenados bajo condiciones de estrés ( $60^\circ\text{C}$ ) durante una semana. Las mediciones se llevaron a cabo con las muestras recién preparadas y una semana después de la preparación. Las determinaciones se realizaron a  $25^\circ\text{C}$ .

### **3.3.2. Caracterización de las NPs**

Se determinaron las características fisicoquímicas de las NPs tales como el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad, la eficacia de encapsulación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), microscopía electrónica de transmisión (TEM), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la estabilidad mediante el Turbiscan®.

La caracterización de Nanopartículas se llevó a cabo mediante el equipo Z-sizer que se basa en la técnica de Dynamic Light Scattering (DLS). Se trata de un método no invasivo y bien establecido para la determinación del tamaño de partículas y su distribución en el rango submicrométrico.

Para preparar la muestra para el Z-sizer, se hizo una dilución 1/20 de la emulsión obtenida mediante el rotavapor.

Para la caracterización de las NP s se procedió a utilizar el Z-Sizer y se realizó una dilución de la muestra 1/20 (1900µl agua Milli Q + 100µl de muestra) para poder medir, posteriormente, los siguientes parámetros:

- Tamaño de partícula
- Índice de polidispersión (PDI)
- Eficiencia de encapsulación
- pH final de la formulación

Se realizaron diferentes replicados de la misma muestra, se midieron los parámetros de cada replicado por separado y posteriormente se juntaron y se volvieron a medir los parámetros

La dispersión de luz dinámica (DLS), a veces conocido como dispersión de luz casi elástica (QELS), es una técnica no invasiva, bien establecida para medir el tamaño y la distribución del tamaño de las moléculas y las partículas típicamente en la región submicrónica , y con la última tecnología inferior a 1 nm.

Las aplicaciones típicas de dispersión de luz dinámica son la caracterización de partículas, emulsiones o moléculas, que han sido dispersos o disueltos en un líquido. El movimiento browniano de las partículas o moléculas en suspensión hace que la luz láser se disperse en diferentes intensidades. Del análisis de estas fluctuaciones de intensidad se obtiene la velocidad del movimiento browniano y, por tanto, el tamaño de partícula utilizando la relación de Stokes-Einstein (ecuación 21).

$$D = \frac{K_B \times T}{6\pi \times \eta \times r} \quad \text{Ecuación 21}$$

Dónde:

$K_B$  (constant de Boltzmann) =  $1,3806504 \times 10^{-23}$  J/K

T (Temperatura absoluta del fluido)

$\eta$  (viscosidad del fluido)

R (radio circular de la partícula)

### ***Caracterización fisicoquímica***

La determinación de la **morfometría** (diámetro promedio de partícula y polidispersión) se ha realizado por espectroscopia de correlación fotónica, mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (McConnell, 1981) que permite efectuar las determinaciones con un amplio margen de tamaños (0,6 nm-4  $\mu\text{m}$ ), en un tiempo de análisis. Esta técnica espectroscópica se basa en la medida de las variaciones de la intensidad de la luz dispersada, debidas al movimiento browniano de las partículas de la muestra. Estas fluctuaciones no son constantes, de forma que la cantidad de luz dispersada por la solución oscila con el tiempo. La información que se obtiene mediante la luz dispersada, se puede relacionar con el coeficiente de difusión que, a su vez, permite obtener información del tamaño y forma de las partículas. Una de las maneras de analizar con precisión las fluctuaciones de la intensidad es operar con la llamada función de autocorrelación  $F(\gamma)$  (Chu 1970; Brown y cols. 1975).

El tamaño medio (Z-ave) y el índice de polidispersidad (PdI) con un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) con un ángulo de  $90^\circ$  en células de 10 mm de diámetro a  $25^\circ\text{C}$ . Los valores se obtuvieron a partir del promedio de tres mediciones de tres lotes diferentes de cada formulación. Antes de la medición, todas las muestras se diluyeron con agua ultrapurificada (1/20) para representar una intensidad de dispersión adecuada.

PdI es la medida de la distribución del tamaño de partícula que va de 0 a 1, valores bajos ( $<0,200$ ) indica un sistema mono-disperso y valores por encima de 0.200 indican un sistema poli-disperso.

### ***Estudios morfológicos***

Para la determinación de la morfología y la morfometría (diámetro promedio y polidispersión) de las formulaciones de nanopartículas de Ketorolaco desarrolladas se utilizaron dos técnicas diferentes: espectroscopia de correlación fotónica y microscopia electrónica de transmisión.

La morfología de las nanopartículas y el grado de homogeneidad de la muestra se puso de manifiesto, mediante microscopía electrónica de transmisión. Para ello, las suspensiones de nanopartículas, colocadas en una rejilla metálica que actúa como soporte, se sometieron a una tinción negativa con acetato de Uranilo al 1% durante 60 segundos. Transcurrido ese tiempo se eliminó el exceso de colorante, se secó a temperatura ambiente y se observaron al microscopio electrónico de transmisión (Golug y cols. 1990).

El examen morfológico de las NPs se realizó utilizando un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL 1010 instrumento (Akishima, Japón) utilizando 40.000 a 60.000 × ampliación.

#### ***Eficacia de encapsulación (EE%):***

La eficiencia de encapsulación se realizó por el método indirecto, que consiste con un análisis por HPLC del contenido del fármaco filtrado por centrifugación a 14000 rpm durante 15 minutos (centrifugadora Sigma 301K, España Eppendorff) usando un filtro centrífugo Ultracel YM-100 (Amicon Millipore Corporation, Bedford, MA). En este caso se cuantificó el fármaco libre. Por diferencia de la concentración inicial se estimó el fármaco incorporado a las NPs, siguiendo la fórmula siguiente:

$$EE (\%) = \frac{C_{total} - C_{Farmaco\ libre}}{C_{total}} \times 100 \quad \text{Ecuación 22}$$

#### ***Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC)***

El análisis de DSC se llevó a cabo en la formulación de NPs de KT optimizadas, en las NPs blancas (sin fármaco asociado) y en los componentes de las NPs, el polímero (PLGA) y el fármaco (KT).

El análisis se realizó utilizando dispositivo DSC30 (Mettler-Toledo, Barcelona, España). Se pesaron en una microbalanza (2.26-2.90 mg de componentes puros y 9.44-13.39 mg de NPs) directamente en una cápsula de aluminio perforada y se escanearon entre de 30°C a 200°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min, bajo una atmósfera de nitrógeno (50 mL / min). Los datos se evaluaron a partir de las áreas de los picos utilizando el software STARe SW 8.10.

La temperatura del equipo se calibró con una muestra pura de material de referencia (Indio) (Gamisans y cols. 1999b).

### ***Predicción de estabilidad a corto plazo***

El análisis de la estabilidad física de los sistemas coloidales desarrollados se llevó a cabo mediante un analizador óptico (Turbiscan<sup>®</sup>Lab, modelo expert) de Formulacion, basado en el análisis de la dispersión múltiple de la luz por soluciones concentradas de dichos sistemas.

La muestra a analizar está contenida en una célula cilíndrica de vidrio que se coloca en posición vertical. El cabezal de detección está constituido por una fuente de radiación pulsada del IR próximo ( $\lambda=850$  nm) y dos detectores sincronizados de luz transmitida y dispersada. El detector de transmisión recibe la luz que atraviesa la muestra (en un ángulo de 0° respecto a la radiación incidente), mientras que el detector de dispersión la recibe dispersada por la muestra a 135° respecto a la radiación incidente. El cabezal de detección escanea la totalidad de la célula de la muestra (50 mm de longitud), adquiriendo datos de transmisión y dispersión cada 40  $\mu$ m (1625 adquisiciones de transmisión y dispersión en cada barrido). El perfil obtenido, en las curvas de porcentaje de luz transmitida (T) o dispersada (BS) en función de la altura de la célula, permite caracterizar la homogeneidad de la muestra y determinar por tanto, fenómenos de desestabilización. El método se basa en la variación de la fracción de volumen de la gota (migración) o el diámetro (coalescencia) que da como resultado una variación de la luz dispersada o transmitida (Lemarchand y cols, 2003).

Las lecturas se realizaron cada hora durante 24 horas con el fin de verificar si se producían cambios potenciales.

### **3.4. MÉTODO ANALÍTICO**

#### **3.4.1. Condiciones cromatográficas**

La cantidad de KT en las muestras se determinó por un método validado de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). De acuerdo con las directrices ICH Q2 (R1) de validación en términos de linealidad, precisión y exactitud (ICH Q2(R1), 2005). El sistema de HPLC consistió en Equipo de HPLC de Hitachi-Merck con un detector variable L-4250 UVVis ( $\lambda = 314 \text{ nm}$ ), y una columna C18 (LiChrocart 250-4 / LiChrosorb RP-18, 5  $\mu\text{m}$ ) con un caudal de 1 ml/min en condiciones isocráticas. El volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{l}$ . Las condiciones de elución para la detección de KT fueron dihidrogenofosfato sódico (PH 2,9) (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) / metanol (Merck, Darmstadt, Alemania) (450/550, v/v).

#### **3.4.2. Contenido de KT en las formulaciones**

El contenido de KT en los HG se trató de la siguiente manera: un volumen de 10  $\mu\text{l}$  de cada formulación se disolvió en 10 ml de agua: metanol (1: 1) bajo agitación durante 15 minutos en un baño ultrasónico Elma Transsonic Digital S T490 DH (Elma, Singen, Alemania). Las soluciones se filtraron a través de una solución de 0,45  $\mu\text{m}$  Cameo® membrana de nylon de filtro de jeringa (Sigma Aldrich, Barcelona, España) y se analizaron por HPLC.

De forma adicional se evaluó la uniformidad de contenido del KT dentro de los HG para ello, se analizó la parte superior, media e inferior del recipiente que contenían las formulaciones.

Las formulaciones se almacenaron durante 3 meses a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  ° C) para evaluar su estabilidad.

### **3.5. ESTUDIO DE LIBERACIÓN *IN VITRO***

Se realizaron estudios de cesión *in vitro* de las formulaciones se realizó mediante celdas de difusión de Franz (figura 27), utilizando una membrana artificial seleccionada en base a un estudio previo para determinar aquella que ofrece menor resistencia a la difusión del fármaco. El medio receptor fue una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4, mantenido en agitación constante (600 rpm) y cumpliendo condiciones sink. Finalmente, se estudió la cinética de liberación aplicando modelos cinéticos de ajustado a los datos experimentales y se determinaron las ecuaciones cinéticas que se describen posteriormente.

Las celdas de Franz representan uno de los principales métodos utilizados para evaluar la penetración transepitelial y la liberación de fármacos. Constituyen un sistema compuesto por dos cámaras, separadas por una membrana de origen animal, humana o sintética que permite evaluar la difusión de moléculas biológicamente activas de una cámara a otra (figura 28). En el compartimento superior se adiciona una solución o dispersión que contiene el compuesto activo y en el inferior se toman las muestras correspondientes, que posteriormente son cuantificadas mediante técnicas analíticas.

Hay diferentes parámetros que influyen en la difusión del compuesto como:

- Temperatura
- Velocidad de agitación
- Tipo y naturaleza de la membrana
- Medio del compartimento receptor

El ensayo de liberación se realizó usando células de difusión de tipo Franz de vidrio ámbar (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NY, EE.UU.) con un área de difusión activa de 2.54cm<sup>2</sup>.



Figura 27. Agitador y Celdas de difusión de Franz verticales

El medio receptor utilizado fue PBS a pH 7,4. Se configuró el baño termostato de modo que la temperatura en medio receptor fuera de  $32 \pm 1$  °C. Se llenó el compartimento receptor con el medio anteriormente preparado y se colocaron los núcleos magnéticos en cada célula para asegurar una correcta homogeneización.

Se colocó la membrana de diálisis (que estuvo durante 24 horas en un recipiente con metanol: agua (50:50) para hidratarla y desengrasarla) entre dos arandelas o holders, de manera que quedó totalmente lisa y tersa.

Las arandelas, se colocaron en la parte superior de la célula de Franz y se selló con Parafilm® dejando la parte central libre, donde se colocará la formulación. Finalmente, para asegurar que no se movieran los holders, se aseguraron con pinzas.

A continuación, se terminó de llenar el compartimento receptor a través de la tubuladura lateral, hasta el volumen máximo, de manera que la solución receptora esté siempre en contacto con la cara inferior de la membrana. Finalmente, se eliminaron las burbujas del compartimento receptor mediante jeringas y agujas intratecales.

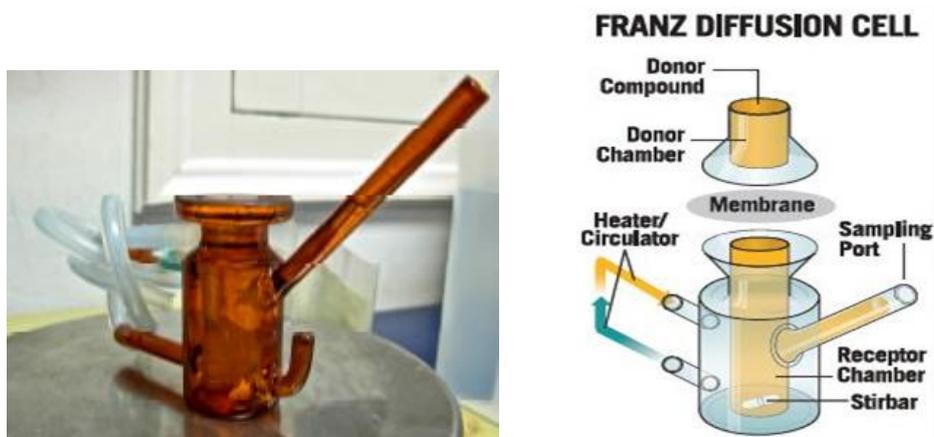


Figura 28. Imagen de la celda de Franz (izquierda) y esquema de los componentes de una celda de Franz (derecha).

El ensayo comenzó cuando se añadió la formulación en el compartimento dador, encima de la membrana de diálisis. A este paso se le denomina siembra.

Deben tenerse en cuenta las condiciones SINK en cuanto a la cantidad de fármaco que se siembra, es decir, la concentración de KT en el medio receptor, en caso de que se liberara el 100%, debe ser inferior al 20% de la concentración a saturación del fármaco en dicho medio.

Condiciones SINK  $\rightarrow C < 0,2 C_s$ , siendo  $C$  = Concentración de KT en el medio receptor i  $C_s$  = Concentración de saturación del KT

Se sembraron las formulaciones; los geles (Carbopol, Pluronic y Carboximetilcelulosa) los tres al 2% de KT y las NPs de KT al 0.5%. En cada caso, se hicieron cuatro replicados. Una vez sembrados; tanto el compartimento dador como la tubuladura lateral se sellaron con Parafilm® para evitar la evaporación del medio receptor y de la formulación.

Se tomaron muestras a tiempos predefinidos. La toma de muestra consistió en retirar un volumen de 300µl del compartimento receptor por la tubuladura lateral y fueron analizados mediante HPLC. Además, para que el volumen del medio receptor se

mantuviera constante, cada vez que se tomaba una muestra, se reponía el mismo volumen con medio receptor, es decir, PBS sin fármaco.

### ***Ajustados cinéticos***

La concentración de KT se determinó por HPLC interpolando los valores de áreas en la curva de calibración. Los valores se reportan como la media  $\pm$  SD.

Las cantidades acumuladas de KT se calcularon utilizando la fórmula:

$$\text{cantidad liberada acumulada} = At + Vs \times \sum(Ci + C^{t-1}) \quad \text{Ecuación 23}$$

Donde At representa la cantidad de KT en cada tiempo de muestreo, Vs es el volumen de la muestra tomada, Ci es la concentración inicial correspondiente a la primera muestra y Ct-1 representa la concentración anterior.

La cantidad de KT liberada se ajustó a las siguientes ecuaciones modelo (Abrego et al., 2016)

<i>Orden cero</i>	$\%Rt/\%R\infty = Ko \times t$	Ecuación 24
-------------------	--------------------------------	-------------

<i>Primer orden</i>	$\%Rt/\%R\infty = (1 - e^{-k \times t})$	Ecuación 25
---------------------	--	-------------

<i>Higuchi</i>	$\%Rt/\%R\infty = Kh \times t^{1/2}$	Ecuación 26
----------------	--------------------------------------	-------------

<i>Korsmeyer-Peppas</i>	$\%Rt/\%R\infty = K \times t^n$	Ecuación 27
-------------------------	---------------------------------	-------------

<i>Weibull</i>	$\%Rt/\%R\infty = 1 - e^{-(t/ta)^\beta}$	Ecuación 28
----------------	--	-------------

Donde Rt es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo (t), R $\infty$  es la cantidad máxima de fármaco liberada, k es la constante de velocidad de liberación expresada en unidades

de concentración / tiempo, y  $n$  es el exponente de liberación de difusión que se puede usar para Caracterizar los diferentes mecanismos de liberación. Se ha establecido que  $n \leq 0,43$  (mecanismo de difusión de Fick),  $0,43 < n < 0,85$  (transporte anómalo) y  $n \geq 0,85$  (transporte de Super Case II, es decir, cero, liberación de órdenes) (Abrego et al., 2014)

El tratamiento de datos se realizó mediante los programas informáticos *GraphPad Prism* versión 5.00, *Excel* y *Winnonlin* 5.3.

### **3.6. ESTUDIO DE PERMEACIÓN *EX VIVO***

#### **3.6.1. En piel**

La piel de cerdo (raza Landrace Large White) se obtuvo de los servicios de la instalación de animales de Bellvitge y fue aprobada por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona. Se utilizó tejido de piel de espesor total para experimentos. Inicialmente se limpió la piel con agua del grifo y luego se retiraron los pelos y el tejido graso subcutáneo con un bisturí.

La piel humana se obtuvo de la región abdominal de mujeres sanas (cirugía plástica, Barcelona-SCIAS Hospital, Barcelona, España). El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Barcelona-SCIAS y los voluntarios proporcionaron los formularios de consentimiento informado por escrito. Después de ser congelados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , los tejidos fueron dermatomizados (GA630, Aesculap, Tuttlingen, Alemania) en  $500\text{ }\mu\text{m}$  de espesor piezas. La integridad de la piel humana se verificó midiendo la pérdida de agua transidérmica (TEWL) utilizando un medidor TEWL TM210 (Courage & Khazaka, Koln, Alemania). Se excluyeron las piezas de piel humana que presentaban valores TEWL por encima de  $10\text{ g/m}^2\cdot\text{h}$ .

***Estimación de los parámetros de permeación: (cinética de absorción):***

El experimento se llevó a cabo tal como se diseñó para el ensayo de liberación, excepto que se usó piel de oreja porcina de espesor 1mm. El SC de cerdo es similar en espesor a la membrana humana, con propiedades de permeabilidad similares. La piel se limpió y almacenó a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior. La congelación no altera la estructura del SC el cual es la barrera principal a la difusión del fármaco. El día del estudio, la piel se descongeló a temperatura ambiente y se cortó en parches circulares. La piel se colocó de manera que el SC se encontraba frente al compartimento donante y el lado dérmico estaba en contacto directo con el medio receptor (Cordero et al., 1997; Vázquez-González et al., 2014). Se pesaron con precisión 300 mg de hidrogel de KT y se colocaron en el compartimento donante en contacto con la piel. Se retiraron periódicamente muestras de la fase receptora (alícuotas de 300  $\mu\text{l}$ ) a varios intervalos de tiempo, es decir, 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 20 h, 22 h, 24 h, a través del puerto de muestreo y se analizó el contenido de fármaco por HPLC. Se realizaron cuatro replicados (Escribano et al., 2003).

Se estimaron los siguientes parámetros: cantidad de KT permeada a las 24h ( $A_{p24h}$ ), cantidad de KT retenida en la piel ( $A_R$ ), tiempo de latencia ( $T_L$ ), el flujo (J), y los parámetros relacionados con la difusión y con el reparto ( $P_1$  y  $P_2$ , respectivamente), coeficiente de permeabilidad ( $K_p$ ) y concentración en estado estacionario ( $C_{ss}$ ).

El  $T_L$  se obtuvo extrapolando sobre el eje de abscisas la parte pseudo-estacionaria del gráfico de la cantidad acumulada que atraviesa la membrana con el tiempo (Sánchez-López et al., 2016).

La cantidad de fármaco retenido en la piel ( $A_R$ ) fue extraída por metanol: agua (1:1 v/v) (Abrego et al., 2016; Vázquez-González et al., 2015). Brevemente, se retiró la formulación que quedaba sobre la piel y se limpió la piel con una solución de Lauril Sulfato Sódico al 0,05% y se enjuagó con agua destilada. Posteriormente, se extirpó el área de difusión de la piel y se pesó y el contenido de KT se extrajo mediante un baño de agua ultrasónico durante 20 minutos y se analizó por HPLC. La  $A_R$  se expresa como  $\mu\text{g} / \text{g de piel} / \text{cm}^2$ .

La  $C_{ss}$  se estimó utilizando la siguiente ecuación:

$$C_{ss} = (J_{ss} \cdot SAT) / (Cl_p) \quad \text{Ecuación 29}$$

Dónde  $J$  ( $\mu\text{g} / \text{h} \cdot \text{cm}^2$ ) es el flujo,  $SAT$  ( $\text{cm}^2$ ) es la superficie teórica de aplicación,  $Cl_p$  ( $\text{ml}/\text{min}$ ) es la depuración plasmática humana de KT.

El coeficiente de permeabilidad ( $K_p$ ) de KT a través de la membrana se estimó de acuerdo con la fórmula:

$$K_p = J_{ss} / C_0 \quad \text{Ecuación 30}$$

Donde  $J_{ss}$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) es el flujo en estado estacionario y  $C_0$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) es la concentración de KT en el compartimento donador.

### ***Distribución del KT en las diferentes capas de la piel***

En el caso de la piel humana, el estudio de la cantidad de fármaco retenido se hizo en cada una de las capas de la piel con el objetivo de estimar la distribución de KT en cada una de las capas de la piel. Para ello, al finalizar la permeación se procedió a separar las capas previamente a la extracción.

Se colocaron discos de piel humana con un diámetro interno de 2,5 cm sobre celdas de difusión estática termostalizadas ( $32 \pm 1^\circ\text{C}$ ) (3 mL, 1,86  $\text{cm}^2$  de área expuesta, Lara-Spiral, Courtenon, Francia) para determinar la distribución compartimental de KT durante un tiempo de exposición de 24 h. Se usó PBS a pH 7,6 (Sigma, St Louis, EE.UU.) en agua (calidad MilliQ) como fluido receptor. Se garantizó la solubilidad de KT en el medio receptor y las condiciones de no saturación (sink) a lo largo del ensayo añadiendo albúmina de suero bovino al 1% (p/v), St Louis, MO, EE.UU.). Se añadió sulfato de gentamicina al 0,04% (p / v) (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) para evitar la contaminación microbiana. Se aplicaron 10  $\mu\text{l}$  a la piel, que corresponde a un diseño de estudio en condiciones de dosis finitas. También se usaron células de control, se

aplicaron 10 µl de HG en blanco (sin KT) a la superficie de la piel para evaluar interferencias potenciales de la HG o capa de piel en el análisis de KT.

Después de 24 h de período de exposición, los discos de piel se desensamblaron de las células de Franz y el exceso de formulaciones de HG se retiró de la piel con el fin de recuperar el exceso de KT. A continuación, se recuperó el fluido receptor y se realizaron procedimientos de separación sobre las capas córneas superficiales del SC con cinta adhesiva (D-squame, Cuderm Co., Dallas, EE.UU.). Se realizaron doce tiras con el fin de eliminar la mayor parte de la cantidad de sustancia contenida en el SC. La epidermis se separó de la dermis después del tratamiento térmico (80°C durante 5-10 segundos). Las diferentes muestras a analizar se extrajeron y/o se diluyeron en agua: metanol (1: 1, v / v). Se añadieron 10 ml del disolvente de extracción a la muestra proveniente de la superficie cutánea (S), se utilizaron 2 ml de disolvente de extracción para el SC y epidermis (E) y 1 ml para la extracción de KT de la dermis (D). Las mezclas resultantes se sonicaron durante 20 min y los sobrenadantes se analizaron por HPLC, obteniéndose la cantidad de KT en % de la dosis aplicada.

### **3.6.2. En mucosa**

En primer lugar se estudió la permeación intrínseca del KT, para ello se realizó un ensayo de permeación con una solución saturada de KT. De modo que se pudiera estudiar la capacidad de permeación del fármaco *per se* con máxima actividad termodinámica del fármaco sin influencia de la formulación. La solución saturada consistió en disolver un exceso de fármaco en agua, se dejó 24 horas en agitación y tras este periodo de tiempo se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 15 minutos, se filtró el sobrenadante con un filtro de jeringa de 0.45 µm de tamaño de poro. Se realizaron las diluciones pertinentes para que el área de los picos del analito mediante HPLC quedaran dentro del rango de la recta de calibrado. Las condiciones cromatográficas utilizadas para la cuantificación de KT son las descritas en el punto 3.4.1.

Las membranas biológicas fueron la parte interna de la mejilla y la zona sublingual. Se evaluaron las cantidades acumuladas de fármaco permeado a las 6 horas, y parámetros biofarmacéuticos tales como la  $K_p$ ,  $T_L$ ,  $J_{ss}$ , y se calculó la predicción de niveles plasmáticos que se obtendrían por cada una de las vías si se administrara a humanos.

Para el ensayo de permeación se usaron las celdas de Franz, donde las formulaciones se permearon sobre mucosa oral y sublingual durante 6 horas.

Se usó como medio receptor la solución de Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution). Para prepararla se utilizaron los reactivos descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Reactivos necesarios para preparar solución de Hanks

	<b>GRAMOS (G)</b>	
<b>COMPONENTES</b>	NaCl	7,425
	HEPES (sal sódica)	2,603
	HEPES (ácido libre)	2,383
	KCl	0,400
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,047
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,060
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,175
	Glucosa 1M	9,010
	Agua destilada	c.s.p. 1L

El acondicionamiento de las celdas se realizó del siguiente modo: se encendió el baño termostato, se configuró la temperatura de trabajo a 37 °C. Las celdas fueron rellenas con el medio receptor y se añadió el núcleo de agitación magnética para asegurar la homogeneidad del medio receptor con el principio activo permeado.

Las mucosas a permearse se extrajeron de cerdas hembras y se dermatomizaron a un grosor de 500 micrómetros (Dermatome GA630, Aesculap, Alemania). Se obtuvieron discos de mucosa oral y sublingual que fueron conservadas en solución de Hanks hasta su uso (menos de 24h desde la extracción para garantizar su viabilidad).

Se montaron 3 réplicas para cada una de las mucosas y formulaciones, es decir 3 replicados de mucosa bucal y otros 3 replicados de mucosa sublingual para gel Carbopol de KT al 2%. De la misma manera, 3 réplicas de mucosa bucal y otras 3 de mucosa sublingual para gel Carboximetilcelulosa sódica de KT al 2%.

El ensayo de permeación empezó al añadir la formulación en el compartimento dador, este paso se conoce como siembra. Se tuvo en cuenta las condiciones SINK en cuanto a la cantidad de fármaco que se sembró.

El medio receptor se utilizó como blanco para el análisis de HPLC para evaluar la ausencia de interferencias con el analito.

Se sembraron aproximadamente 0.5 g de cada gel de KT al 2% en las respectivas celdas. Se sellaron el compartimento dador y las tubuladuras laterales con parafilm para prevenir cualquier evaporación. Se recogieron muestras con la ayuda de una aguja intratecal, 300  $\mu$ L, por la tubuladura lateral a los tiempos: 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas y 5 horas. Las muestras cogidas se pusieron en viales para HPLC. Cada vez que se extraía una muestra se rellenaba el compartimento receptor con el mismo volumen con el que se hizo cada extracción de muestras, 300  $\mu$ L. La reposición se hacía con solución de Hank.

Al final del ensayo, se retiró la formulación restante que no fue permeada lavando las mucosas y reservándolas para una posterior extracción. El medio receptor se recogió para determinar el volumen de cada celda y las muestras se conservaron en el congelador hasta su análisis por HPLC.

De la misma forma que en la permeación con piel se determinaron los parámetros de permeación  $J$ ,  $K_p$ ,  $T_{lag}$ ,  $C_{ss}$ ,  $P_1$  y  $P_2$ .

### **3.6.3. En ojo**

#### ***Permeación ex vivo***

La permeación *ex vivo* se realizó en Celdas de difusión de Franz con una metodología análoga a las permeaciones en piel y mucosa. En este caso, se usó la córnea y la esclera procedentes de cerdo como membranas biológicas. Ambas se aislaron del globo ocular mediante escalpelo y se montaron en las celdas de Franz usando una solución de PBS Ph 7.4 en el caso de la córnea, la cual se mantuvo a 32°C a lo largo de todo el ensayo. Para la permeación transescleral, se montó la esclera de la parte posterior del ojo en las celdas de Franz, el medio receptor fue Hepes 0.1M y la temperatura de las membranas se mantuvo a 37°C.

Se aplicaron las formulaciones Acular® y NPs, en el compartimiento dador, encima de las córneas y escleras. Se tomaron muestras del medio receptor a diferentes tiempos a lo largo del estudio (6h).

Al final del ensayo se procesaron las córneas y escleras según el apartado 3.6.4. para la extracción del KT dentro de las membranas oculares.

#### ***Permeación in vivo***

Se desarrolló un estudio *in vivo* para estudiar la penetración y difusión del KT hacia el interior del globo ocular, en concreto, hacia el humor acuoso y el humor vítreo. Para ello, se administraron los productos (Acular y NPs) en el ojo izquierdo de cerdos (3 cerdos para cada formulación); en el ojo derecho se aplicó solución fisiológica (NaCl) al 0.9% que sirvió como control negativo.

Este estudio representa una aplicación real del producto, donde a diferencia del estudio *in vitro*, se evalúa el efecto del lagrimeo y del parpadeo en la absorción de KT en el ojo del animal, a partir de las formulaciones, observándose también la intervención conjunta de la capa córnea y esclerótica, antes estudiadas por separado.

Tras un periodo de tiempo de 8 horas, se sacrificaron a los animales y se determinó la cantidad de KT presente en el humor vítreo y en el humor acuoso mediante HPLC.

#### **3.6.4. Cantidad retenida en las membranas biológicas**

Al final del ensayo de permeación, se valoró la cantidad de fármaco que quedaba retenido en la membrana biológica mediante extracción del fármaco por sonicación en baño de ultrasonidos.

Para poder saber qué cantidad de principio activo quedó retenido en la mucosa y no había permeado por completo hasta el medio receptor se procedió a hacer una extracción.



Figura 29. Disco de piel dermatomizada al finalizar el ensayo de permeación. El círculo rojo destaca el área de permeación.

Primero se preparó una solución para extraer el Ketorolaco, para ello nuestro principio activo debe de ser completamente soluble en ella. La solución para la extracción fue agua miliQ y metanol (50:50).

Las membranas permeadas se recortaron por el área de permeación y se pesaron (figura 29). Se pusieron en un baño de ultrasonidos durante 20 minutos con la solución para la extracción. Se recogió el sobrenadante para ser analizado por HPLC.

### **3.7. TEST DE IRRITACIÓN OCULAR IN VITRO – HET-CAM**

Con el fin de poner de manifiesto la posible irritación a nivel ocular de los sistemas coloidales desarrollados, se llevaron a cabo ensayos de tolerancia ocular por técnicas de análisis *in vitro*. Para el estudio de la tolerancia ocular *in vitro* se ha utilizado un método alternativo a la experimentación animal: el HET-CAM

El HET-CAM es un método alternativo a la experimentación animal descrito por Luepke (1985) para la evaluación del potencial de irritación ocular basado en la observación, por una persona entrenada, de los efectos irritantes (hemorragia, vasoconstricción y coagulación) que pueden aparecer durante los cinco primeros minutos que siguen a la aplicación de un producto sobre la membrana corioalantoidea (CAM) de un huevo de gallina con un embrión de 10 días, basado en el protocolo INVITTOX N° 15 (1990) y en el J.Officiel de la République Française (1996). Esta membrana está muy vascularizada y tiene una estructura similar a la de otros tejidos muy vascularizados como la conjuntiva, por lo que constituye un modelo ideal para el ensayo de productos potencialmente irritantes a nivel ocular.

#### ***Procedimiento experimental***

Se utilizan huevos fecundados de gallina incubados durante 10 días, procedentes de la Granja Bellavista (Lliçà d'Amunt, Barcelona). Estos huevos se mantienen al abrigo de la luz y a una temperatura de  $12 \pm 1^\circ\text{C}$  durante un mínimo de 24 horas antes de colocarlos en la incubadora con temperatura y humedad controladas (temperatura óptima:  $37,8^\circ\text{C}$ , humedad comprendida entre 50 y 60%), durante 10 días.

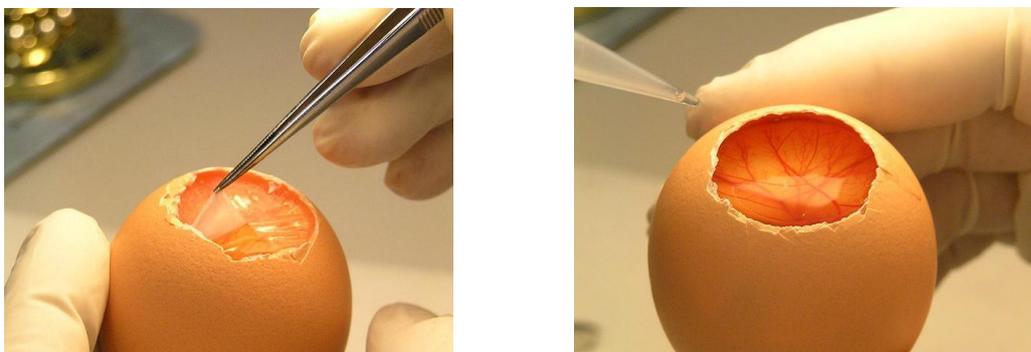


Figura 30. Proceso experimental para dejar al descubierto la membrana CAM (izq.) y adición de las formulaciones a estudiar (dcha.)

El huevo se coloca verticalmente sobre un soporte (con la cámara de aire hacia arriba) bajo una iluminación de intensidad suficiente para que se conserve el calor a fin de que no se seque la membrana corioalantoidea (CAM.). Se recorta la cáscara, en forma circular, a nivel de la cámara de aire teniendo cuidado de no lesionar la CAM. Con unas pinzas de bordes romos se retira la cáscara y la primera membrana blanquecina, previa humectación de la misma con una solución isotónica de cloruro sódico a 37°C, hasta dejar al descubierto la membrana corioalantoidea (figura 30).

Seguidamente se depositan cuidadosamente 0,3 mL del producto a ensayar sobre la CAM mediante una pipeta, poniendo en marcha inmediatamente el cronómetro. Los eventuales fenómenos de irritación (hemorragia, vasoconstricción y coagulación) serán observados durante 5 minutos, anotándose el tiempo exacto de aparición de cada uno de ellos, así como la intensidad de cada reacción: sin reacción (0), leve (+), moderada (++), severa (+++). Las observaciones deben realizarse a simple vista. Los fenómenos observados no son valorados en función de su intensidad, sino del momento de su aparición: es una respuesta “todo o nada”, que debe anotarse lo más exactamente posible (figura 31).

El efecto irritante del producto a ensayar se evalúa en 6 huevos y antes de iniciar el estudio se efectúan dos controles positivos: 2 huevos tratados con 0,3 mL de NaOH 0,1 M y 2 huevos tratados con SDS (dodecil sulfato sódico) 1% 0,3 M.

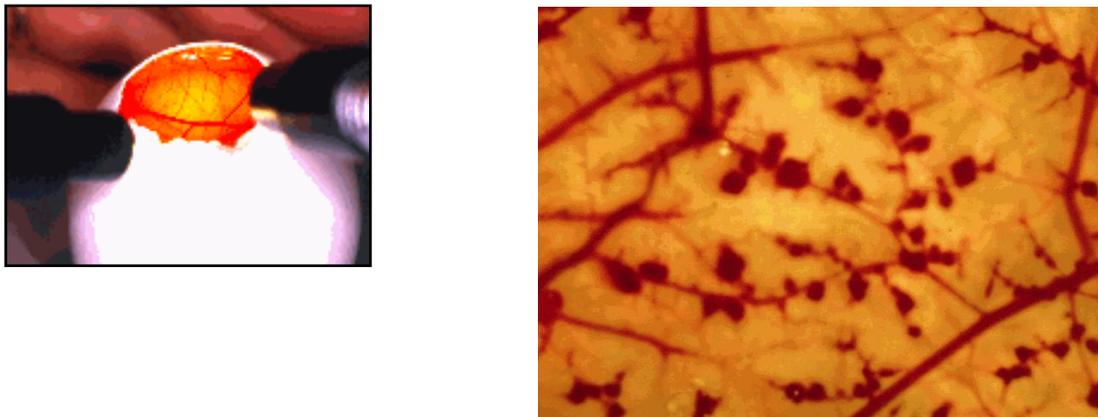


Figura 31. a) Membrana corioalantoidea (CAM) del huevo de gallina tras 10 días de incubación y b) principales lesiones producidas por agentes irritantes.

La hemorragia puede observarse como la aparición de sangre extravasada en forma de “coliflor”, mantel, velo difuso o puntiforme. La vasoconstricción se observa en los capilares, que se vuelven más finos y de color más claro. La coagulación puede observarse como opacidad y/o trombosis; la opacidad se manifiesta como la aparición de un velo opalescente en parte o toda la membrana; la trombosis aparece como una discontinuidad del flujo sanguíneo en los vasos que les da un aspecto segmentado.

Para calcular el potencial de irritación se utilizó la siguiente expresión:

$$HIO = \frac{(301 - h) \times 5}{300} + \frac{(301 - v) \times 7}{300} + \frac{(301 - c) \times 9}{300}$$

Ecución 31

siendo h el tiempo en segundos en que aparece la hemorragia, v el tiempo en segundos en que aparece la primera vasoconstricción y c el tiempo en segundos en que aparecen signos de coagulación.

Se calculó la media aritmética y la desviación estándar de los tiempos de aparición de las lesiones en los 6 huevos utilizados para cada sustancia testada. Las puntuaciones del potencial de irritación pueden agruparse en cuatro categorías (tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de los productos según el índice de irritación ocular (IIO) del método HET-CAM

IIO	CLASIFICACIÓN
<b>0 - 0,9</b>	Prácticamente no irritante
<b>1 - 4,9</b>	Débilmente irritante
<b>5 - 8,9</b>	Moderadamente irritante
<b>9 - 21</b>	Irritante

### 3.8. EFICACIA ANTI-INFLAMATORIA DÉRMICA *IN VIVO*

#### 3.8.1. Eficacia anti-inflamatoria dérmica

##### *Inducción de la inflamación*

Se evaluó la eficacia antiinflamatoria de HGs desarrollados según el protocolo descrito por (Dominguez-Villegas et al. 2014). Brevemente, 2,5 mg de 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA) se disolvió en etanol. 5 µL de esta solución fue utilizada para inducir inflamación de edema de oreja de ratón en ratones. Los animales fueron divididos en diferentes grupos (n = 3). 100 mg de KT-P407-HG (Grupo 1) o KT-C940-HG (Grupo 2) se aplica a ambos lados de la oreja derecha al mismo tiempo con TPA, además 5 µL de etanol fue aplicado a ambos lados de la oreja izquierda. Una

solución equivalente de KT en acetona fue probada de manera similar como referencia (grupo 3) a ambos lados de la oreja derecha y 5 µL de acetona a ambos lados de la oreja izquierda. 100 mg de los HG blancos (grupos 4 y 5) fueron aplicados a ambos lados de la oreja derecha al mismo tiempo con TPA y sin TPA en ambos lados de la oreja izquierda. Cuatro horas después de la aplicación de las formulaciones, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y secciones circulares con 7 mm de diámetro fueron cortadas de orejas izquierdas y derecha y ponderadas para determinar la actividad antiinflamatoria, expresada como el porcentaje de inhibición del proceso inflamatorio según la ecuación:

$$\text{inhibición (\%)} = \frac{\text{diferencia de peso oreja control} - \text{diferencia de peso oreja tratada}}{\text{diferencia de peso oreja control}} * 100$$

#### Ecuación 32

Este ensayo consiste en inducir un edema auricular agudo con TPA en oreja de ratón. La eficacia anti-inflamatoria de las formulaciones se ha evaluado mediante la medición del espesor de la oreja inflamada (derecha) y su comparación con la oreja no inflamada (izquierda) y por la diferencia de peso entre una sección calibrada de las orejas. El porcentaje de inhibición del edema se refiere al grupo control (no tratado) al cual se le administra solamente el agente irritante (100% de inflamación). Se comparó el resultado con una solución del fármaco como referencia.

#### ***Estudio histológico***

El estudio de histología complementa el estudio de eficacia anti-inflamatoria *in vivo*. Por tanto, una vez inflamadas las orejas con TPA, unas se utilizaron para determinar la capacidad de los HG de reducir la inflamación mediante pesada de las orejas por diferencia con los grupos control (apartado anterior). El resto de orejas se fijaron en una solución al 4% de formaldehído y se recubrieron con parafina para poder obtener los cortes histológicos; los cuales fueron des-parafinados y teñidos con Hematoxilina-eosina.

### **3.9. ESTUDIOS DE LOS PARÁMETROS CUTÁNEOS EXPERIMENTALES TRAS LA APLICACIÓN DE LAS FORMULACIONES.**

Se ha estudiado la variación de las propiedades biomecánicas de la piel de las formulaciones desarrolladas. A partir de 10 voluntarios sanos de edades comprendidas entre 18 y 61 años; en condiciones y parámetros estandarizados (de temperatura entre 18 y 22°C; humedad relativa entre 40 y 60%; evitando corrientes de aire y tiempo de reposo de 30 minutos antes de la prueba). Se aplicó 0.1 g de HG en el antebrazo de los voluntarios (una superficie aprox de 6 cm<sup>2</sup>) y se efectuaron medidas epidérmicas (n=10) mediante diferentes sondas (termómetro, TEWL y corneómetro). Se tomaron medidas basales antes de la aplicación del producto, después de la aplicación de las formulaciones y al cabo de una hora. Se estudió la influencia de las formulaciones en la piel después de su aplicación tópica. Para ello, se determinaron los cambios epidérmicos producidos en cuanto a hidratación del estrato córneo, pérdida transepidérmica de agua y temperatura cutánea.

#### **3.9.1. Protocolo estudio de los parámetros cutáneos experimentales**

A continuación, se describe el protocolo utilizado con voluntarios sanos para calcular la hidratación del SC, TEWL y la temperatura con un gel de pluronic y un gel de Carbopol. Para realizar el siguiente estudio se ha informado y hecho firmar un documento de consentimiento informado para cumplir con la normativa según la Comisión de Bioética de la Universidad de Barcelona.

En este estudio, se han utilizado las sondas siguientes:

1) Sonda de temperatura: a través de infrarrojos se determina la temperatura cutánea superficial como indicativo de la microcirculación de la piel. La superficie de medida es de 2,4 mm Ø con una precisión de  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

2) Sonda Tewameter: es el dispositivo más aceptado a nivel científico para determinar la pérdida de agua transepidérmica de la piel.

3) Sonda corneómetro: determina la hidratación del estrato córneo.

El método de medición se basa en un cilindro hueco que mide la evaporación del agua en forma de gradiente de densidad a través de un sensor de temperatura y humedad relativa. Si la barrera epitelial sufre un mínimo daño, la pérdida de agua incrementa y ésta es medida por la sonda. La evaporación se mide con g/h/m<sup>2</sup> siguiendo la fórmula (Clarys et al., 2012):

$$\frac{dm}{dt} = -D \times A \times \frac{dp}{dx} \quad \text{Ecuación 33}$$

Donde,

A = superficie (m<sup>2</sup>)

m = agua transportada (g)

t = tiempo (h)

D (constante de difusión) = 0,0877 g/m(h(mmHg))

P = presión de vapor de la atmosfera (mmHg)

x = distancia des de la superficie de la piel hasta al punto de medida (m)

La cámara de medición de la sonda Tewameter (cámara abierta) es de 1 cm Ø y la precisión de la evaporación de agua es de ± 0,5 g / h / m<sup>2</sup> por humedad relativa ≥ 30%; ± 1,0 g / hm<sup>2</sup> por humedad relativa ≤ 30%. La sonda funciona correctamente con unas condiciones de temperatura entre 10-40°C y 30-70% de humedad relativa.

La sonda corneómetro es el método más utilizado para determinar con precisión y de manera reproducible el nivel de hidratación del estrato córneo de la piel. El método utilizado para la sonda se basa en medir la capacitancia del medio dieléctrico. Este, detecta cambios en la constante dieléctrica que se traduce en variaciones a nivel de hidratación superficial de la piel. La sonda es capaz de detectar mínimos cambios en el nivel de hidratación de la piel. La precisión del aparato es de ± 3%.

### 3.9.2. Estandarización de las condiciones y parámetros

Se creó un protocolo de estudio *in vivo* definiendo las condiciones, parámetros y variables que se deben tener en cuenta para evaluar los parámetros cutáneos de la piel en estudios *in vivo*.

Existen variables individuales que pueden influir en las medidas fisiológicas de la piel. A continuación (tabla 4), se muestran las variables que afectan los parámetros de hidratación del estrato córneo y en la medida de pérdida de agua transepitelial (TEWL).

Tabla 4. Factores que influyen en la hidratación del estrato córneo y en la pérdida transepitérmica de agua. (+ = influye; - = no influye; ± = dato con controversia). (Webster et al., 2011)

	Hidratación del estrato córneo	TEWL
<b>Edad</b>	+	+
<b>Sexo</b>	-	-
<b>Etnia</b>	±	±
<b>Zona anatómica</b>	+	+
<b>Temperatura de la piel</b>	+	+
<b>Sudor</b>	+	+
<b>Temperatura ambiental</b>	+	+
<b>Humedad</b>	+	+
<b>Estación del año</b>	+	+
<b>Ritmo circadiano</b>	+	±

Estudios previos (Song et al., 2015, Kobayashi et al., 2008) demuestran que la hidratación de la piel varía de manera fisiológica entre el periodo de verano y de

invierno en las zonas del frente, mejillas y antebrazo. La hidratación disminuye durante los meses de invierno en comparación con los meses de verano. Otro valor que presenta variabilidad estacional es el pH en el que los valores normales se encuentran entre 4,0 a 6,0. El pH de la piel aumenta durante el periodo de verano y disminuye durante el periodo de invierno.



## **4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



A continuación se detallan los resultados obtenidos derivados del trabajo de investigación objeto de esta tesis doctoral. Los resultados de los HG de Carbopol y Pluronic para aplicación cutánea han dado lugar a una publicación científica en la revista Pharmaceutical Research (Mallandrich et al. 2017)

#### **4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES**

##### **4.1.1. Para aplicación dérmica**

El pluronic P407, que consta de unidades PEO al 70% (p / p), fue elegido porque es un excipiente de baja toxicidad aprobado por la US Food and Drug Administration (FDA) para diferentes tipos de preparaciones y su atractivo uso como sistema de administración a través de la piel dado que es un polímero termosensible y gelifica en función de la temperatura (Escobar-Chávez et al., 2006). El Carbopol 940 se seleccionó basándose en sus excelentes características organolépticas y alta viscosidad a baja concentración, así como su capacidad para retener agua que conduce a la formación de una red polimérica reticulada la cual disminuye la pérdida de agua de la superficie de la piel impidiendo, por tanto, la evaporación del agua (Lee et al., 2014).

##### ***Caracterización fisicoquímica***

Se obtuvieron HG transparentes. El KT-C940-HG era altamente viscoso con una fluidez limitada al invertir el tubo. El KT-P407-HG era líquido a temperatura ambiente y gelificó a temperatura cutánea (32°C). No se observaron cambios en las formulaciones después de 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  ° C).

Ambas formulaciones mostraron valores de pH neutro o casi neutro:  $7,2 \pm 0,2$  y  $6,7 \pm 0,2$  para KT-P407-HG y KT-C940-HG, respectivamente. No se observaron cambios estadísticamente significativos a lo largo del tiempo ( $p > 0,05$ ). Se encontró que el contenido de fármaco era de  $99 \pm 0,5\%$ . Los resultados de la prueba de uniformidad del

contenido de fármaco para ambos HGs indicaron que el fármaco estaba dispersado de manera adecuada y uniforme.

Se observó una disminución del pH a 32°C. La Tabla 5 y la Figura 32 muestran los valores de pH obtenidos para las formulaciones de hidrogel a ambas temperaturas.

Tabla 5. Valores de pH de ambas formulaciones a temperatura ambiente y temperatura cutánea.

Formulación	Temperatura	
	25 °C	32 °C
KT-P407-HG	7.2 ± 0.2	6.7 ± 0.1
KT-C940-HG	6.7 ± 0.2	6.2 ± 0.1

Aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre 25 y 32 °C en ambas formulaciones ( $p < 0,05$ ), no hay implicaciones en términos de tolerancia y estabilidad desde los puntos de vista fisiológicos y tecnológicos.

Entre las características físicas de las formulaciones dérmicas, el pH es un factor importante para evitar la irritación de la piel o hacer que la piel sea susceptible a la infección bacteriana (Brugués et al., 2015). La acidez natural de la piel varía de 4 a 6, dependiendo del área de la piel y la edad del individuo, debido al sistema de amortiguación de la piel que es capaz de absorber pequeñas cantidades de ácido o de material alcalino aplicado para reducir la irritación (Sierra et al., 2013). Nuestros hallazgos de pH hacen que ambas formulaciones sean adecuadas para la aplicación tópica.

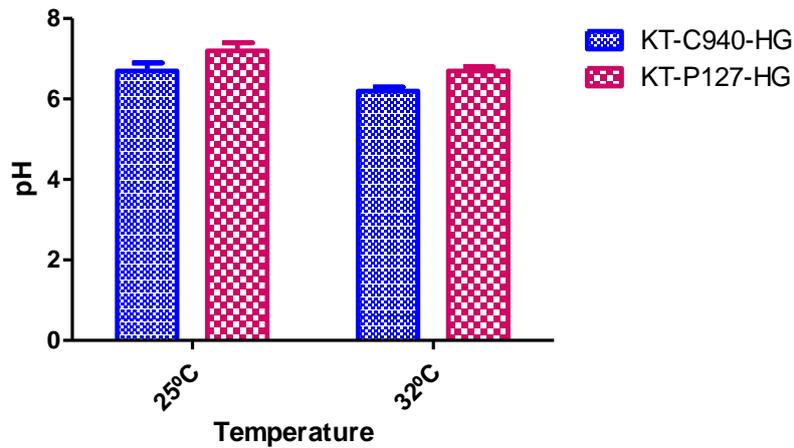


Figura 32. pH de los hidropgeles dérmicos formulaciones en función de la temperatura (ambiente y cutánea)

El proceso de hinchamiento de los geles KT-C940-HG y KT-P407-HG sigue una cinética de primer orden según la ecuación de Fick. La constante cinética  $K = 0.5188 \text{ h}^{-1}$  para KT-C940-HG y  $K = 0.29 \text{ min}^{-1}$  para KT -P407-HG). La tasa de captación de PBS es inversamente proporcional al PBS que ha captado el HG. Inicialmente, hay una absorción rápida de PBS debido a la deshidratación del HG, entonces la velocidad de captación de PBS alcanza una meseta que corresponde al hinchamiento máximo ( $Q_{\text{max}} = 25,26$  y  $1,15$ , respectivamente para C940-HG y P407-HG).

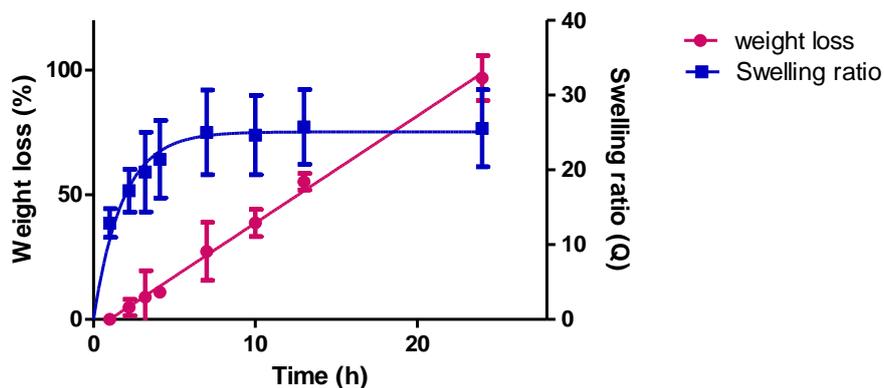


Figura 33. Relación de swelling (en azul) y la pérdida de peso (%) (en rojo) para KT-C940-HG.

Los datos se expresan como la media  $\pm$  SD.

El perfil de degradación se obtuvo por pérdida de peso del HG durante la incubación en PBS. El KT-C940-HG se degradó completamente en 24h (figura 33). La cinética de degradación mejor ajustada a un orden cero ( $r^2 = 0,9987$ ); El proceso de degradación no depende de la concentración del polímero remanente; por lo tanto, presenta una tasa de degradación constante ( $K = 4,36 \text{ \%}/h$ ).

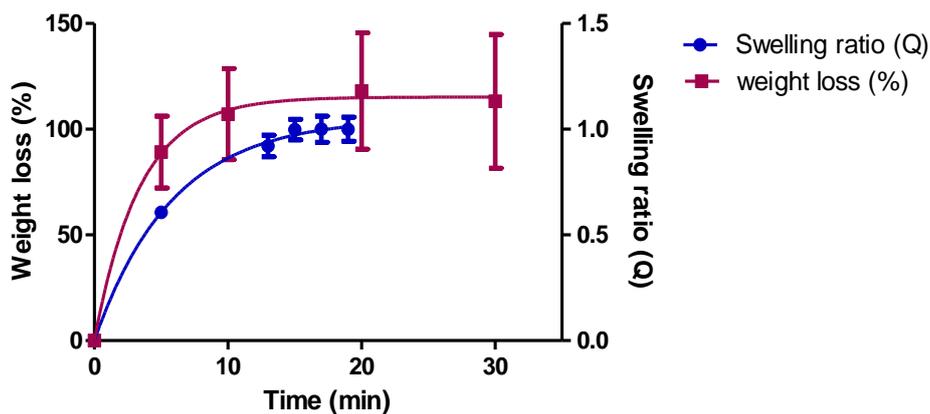


Figura 34. Relación de swelling (en azul) y pérdida de peso (%) (en rojo) para KT-P407-HG.

Los datos se expresan como la media  $\pm$  SD.

Sin embargo, el proceso de degradación de KT-P407-HG sigue una cinética de primer orden ( $r^2 = 0,9985$ ) tal como puede observarse en la figura 34. El HG de poloxamer se degradó en 17 minutos.

La Tabla 6 muestra la porosidad de ambas formulaciones. La porosidad de KT-C940-HG fue mayor que la de KT-P407-HG.

Tabla 6. Porosidad de HGs expresada como la media  $\pm$  DE de dos repeticiones.

<b>Formulación</b>	<b>Porosidad (%)</b>
KT-C940-HG	98,70 $\pm$ 3,76
KT-P407-HG	74,93 $\pm$ 7,96

Estos resultados concuerdan con las imágenes de SEM donde se puede apreciar una estructura más porosa en la estructura del Carbopol respecto la del Pluronic (figura 35).

Las características morfológicas podrían influir en la permeabilidad, en el perfil de liberación y degradación del fármaco. Los estudios morfológicos revelaron una superficie más compacta en KT-P407- HG (figura 35). Sin embargo, esta estructura podría ser debida al proceso de secado durante el pretratamiento SEM de las muestras, puesto que el secado induce el colapso de la estructura porosa dentro del material. En el caso de un HG micelar (tal como Pluronic) podría ocurrir una potencial adhesión de estas pequeñas estructuras.

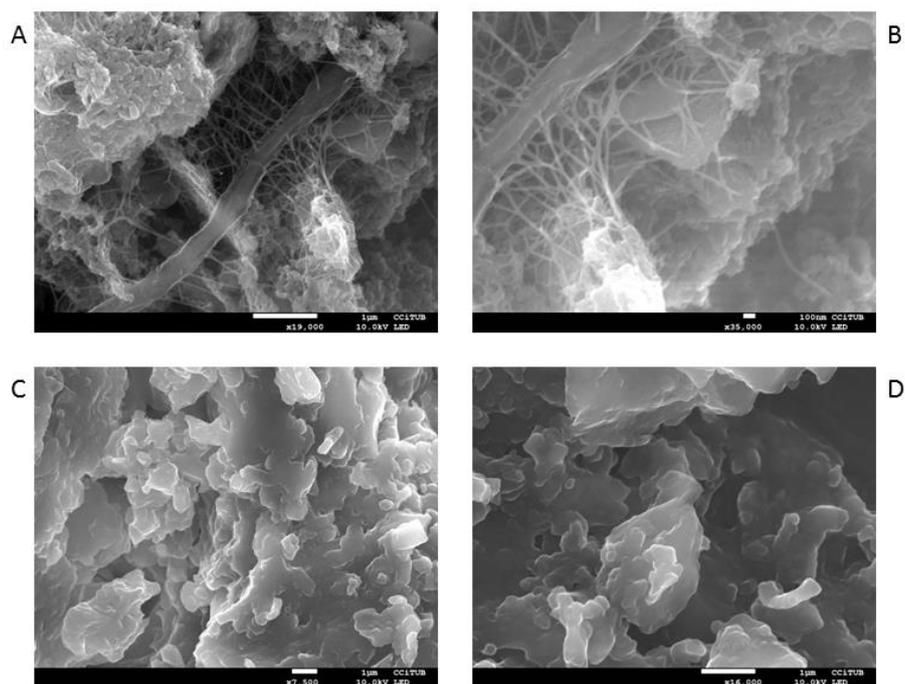


Figura 35. Imágenes SEM de discos secos de (A) KT-C940-HG (x19000); (B) KT-C940-HG (x35000); (C) KT-P407-HG (x7500) y (D) KT-P407-HG (x16000).

### *Comportamiento reológico*

El modelo de Herschel-Bulkley fue el modelo que mejor ajustó estadísticamente el comportamiento reológico en tramos ascendentes y descendentes ( $r = 0,9999$ ) en KT-C940-HG en línea con otros estudios (Lee et al., 2014). El KT-C940-HG también mostró una tixotropía aparente, ya que la curva de flujo mostró un bucle de histéresis con el estiramiento hacia abajo por debajo del estiramiento hacia arriba (figura 36) con un valor de viscosidad a  $100 \text{ s}^{-1}$  de  $4.972 \pm 0.041 \text{ Pa.s}$ .

A la inversa, el KT-P407-HG mostró un flujo newtoniano y la ecuación de Newton (Ecuación 13) ajustó perfectamente los datos experimentales ( $r = 1$ ) confirmando que la viscosidad no se ve afectada por cambios en la velocidad de cizallamiento (Figura 36). Los valores de viscosidad fueron de  $0,164 \pm 0,001 \text{ Pa.s}$  a  $100 \text{ s}^{-1}$ . El comportamiento reológico de ambas formulaciones también se evaluó a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ .

La Tabla 7 presenta valores de viscosidad a 100 s<sup>-1</sup> de formulaciones de hidrogeles a ambas temperaturas, 25 y 32°C.

Hubo diferencias estadísticamente significativas en la viscosidad de ambas formulaciones (p <0,05). La viscosidad del KT-C940-HG disminuyó a 32°C en comparación con los 25°C. Por el contrario, hubo un aumento de 6 veces de la viscosidad en KT-P407-HG a 32°C en comparación con 25°C.

Tabla 7. Valores de viscosidad de las formulaciones hidrogel de KT a dos temperaturas, la ambiente y la cutánea.

<b>Viscosidad (Pa.s)</b>			
<b>Formulación</b>	<b>25°C</b>	<b>32°C</b>	<b>p-valor</b>
KT-C940-HG	6.079 ± 0.037	5.057 ± 0.066	p<0.05
KT-P407-HG	0.132 ± 0.007	0.876 ± 0.008	p<0.05
<b>p-valor</b>	p<0.05	p<0.05	

Diferencias entre formulaciones debidas a la estructura y concentración del polímero utilizado. Y la diferencia entre temperaturas son lógicas porque el carbopol es un polímero no sensible a la temperatura, y como regla general, al aumentar la temperatura aumenta la fluidez. Al contrario del pluronic que es termosensible, al aumentar la temperatura disminuye la solubilidad de las cadenas de PPO y se forman micelas aumentando la viscosidad drásticamente (figura 36).

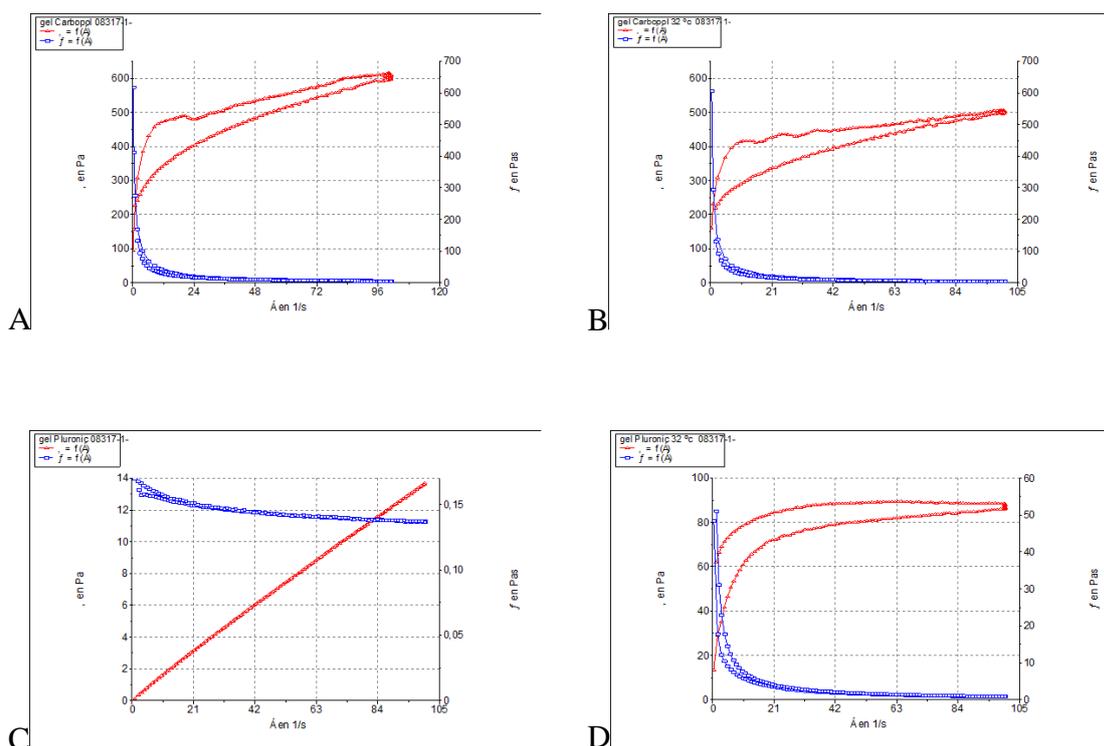


Figura 36. Reogramas de las dos formulaciones ensayadas (A) KT-C940-HG a 25°C, (B) KT-C940-HG a 32°C, (C) KT-P407-HG a 25°C y (D) KT-P407-HG A 32°C.

La reología es una técnica útil para caracterizar la resistencia estructural de los sistemas semisólidos y predecir su comportamiento para usos tópicos (Tang et al., 2005). Concretamente, la viscosidad de los vehículos puede jugar un papel importante en el control de la liberación y permeación de la piel de los fármacos (Dong et al., 2015). Las determinaciones reológicas indican cuánto se deforma la muestra o como ésta fluye al aplicar una fuerza. Para el KT-C940-HG, la ecuación de Herschel-Bulkley (ecuación 15) proporciona un modelo general para materiales plásticos, éstos se caracterizan por tener que superar un esfuerzo mínimo (umbral) para empezar a fluir. Una vez superado este límite la viscosidad disminuye con el esfuerzo de cizalla (figura 36A). Este comportamiento se observa a menudo en sistemas poliméricos; el hidrogel forma una red tridimensional en condiciones estáticas, pero fluye al aplicar una fuerza, por ejemplo al extender el producto en la superficie de la piel, superando el umbral. Una vez

superado este punto las cadenas de polímero se orientan en la dirección del flujo y por lo tanto, la disminuye viscosidad. Este comportamiento es muy interesante en las formulaciones semisólidas porque hay una alta viscosidad bajo condiciones estáticas que aumenta la estabilidad física de la formulación. Sin embargo, la formulación fluidifica bajo esfuerzo; propiedad deseable para aplicación tópica. Además, el gel de carbopol presenta tixotropía, fenómeno de fluidificación en función de la fuerza de cizalla dependiente del tiempo cuando el sistema está sometido a estrés. Este hecho facilita la extensibilidad del HG en una capa fina y homogénea cuando se aplica sobre la piel.

El KT-P407-HG ajustó a la ecuación de Newton (figura 36C). Esto concuerda con el comportamiento del polímero que a bajas temperaturas (por debajo de la temperatura de transición sol-gel) en la que PEO y PPO están hidratados y solubilizados en agua, lo que da lugar a una baja viscosidad. Esto facilita la administración de la formulación. De hecho, el comportamiento newtoniano del KT-P407-HG a bajas temperaturas lo hace adecuado para su aplicación como spray o roll-on. A la temperatura cutánea (32°C) la formulación muestra un carácter pseudo-plástico (figura 36D) descrito por la ecuación de Cross ( $r^2 = 0.9988$ ) (ecuación 16) tanto en el tramo ascendente como descendente. La viscosidad aumenta drásticamente de  $0.132 \pm 0.007$  Pa·s medido a 25°C a  $0.876 \pm 0.008$  Pa·s medido a 32°C, ambos determinados a  $100 \text{ s}^{-1}$ . También presenta tixotropía, aunque menos acusada que en el Carbopol.

La temperatura de gelificación del KT-P407-HG también se evaluó de acuerdo con Brugués et al. 2015. Brevemente, la formulación se colocó en un baño de agua bajo agitación con una barra magnética. La temperatura del hidrogel se incrementó constantemente de 21 a 36°C. La temperatura de gelificación se estableció como aquella en la cual la barra magnética se detuvo. El experimento se llevó a cabo por triplicado. El HG de KT gelificó a 31°C.

### *Estabilidad óptica a corto plazo*

TurbiScanLab® es un analizador óptico que se utilizó para determinar la estabilidad física a corto plazo de los geles. Se utiliza para detectar fenómenos de desestabilización reversibles e irreversibles, al contrario que en la observación visual, que puede ser poco práctica, lenta, subjetiva y no tan sensible.

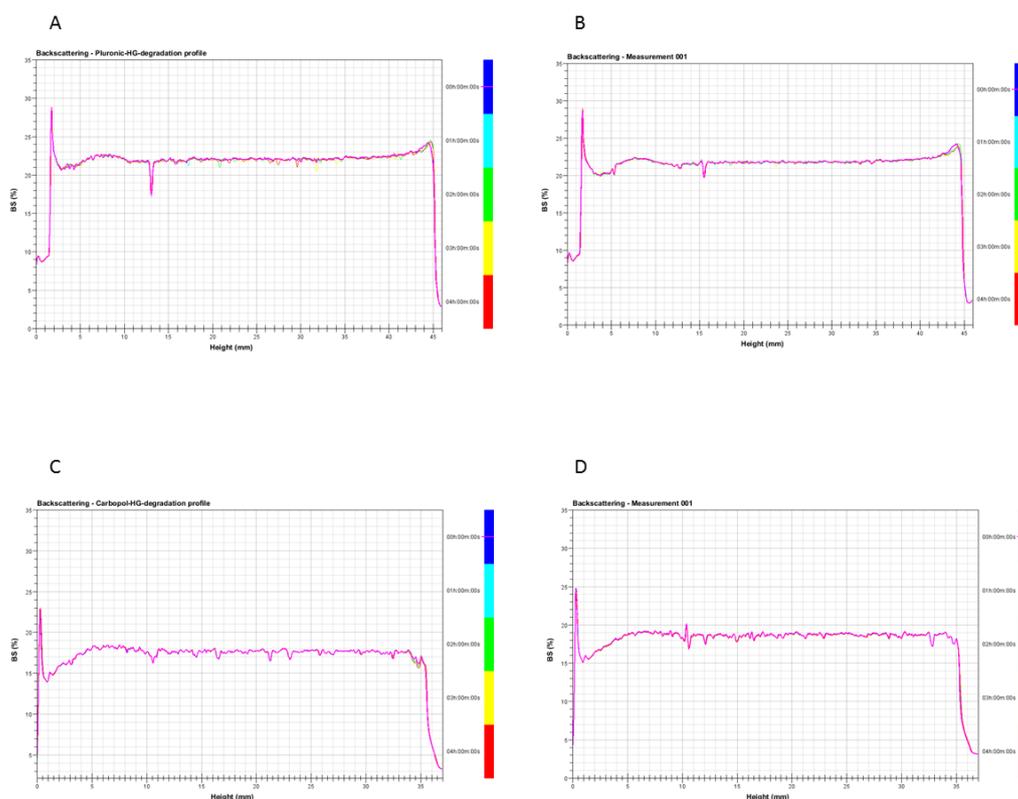


Figura 37. La estabilidad óptica a corto plazo evaluada por medio de los perfiles de retrodispersión de las formulaciones de hidrogel, (A) KT-P407-HG día 1, (B) KT-P407-HG día 7, (C) KT-C940-HG día 1 y (D) KT - C940 - HG día 7.

La Figura 37 no muestra cambios significativos ( $< 10\%$ ) en los perfiles de retrodispersión de ambas formulaciones que se habían almacenado bajo condiciones de estrés ( $60^{\circ}\text{C}$ ) durante 7 días. Por lo tanto, ninguna inestabilidad física como la precipitación o exudado ocurrió en ninguna formulación.

#### 4.1.2. Mucoadhesivos

##### *Caracterización fisicoquímica*

Los geles de Carbopol se utilizaron para la administración de KT tanto en piel como en mucosa, por lo tanto, expondremos únicamente los resultados del gel de CMCNa ya que los resultados de caracterización físico-química del Carbopol se han expuesto anteriormente.

El mucoadhesivo de Carboximetilcelulosa presentó una consistencia densa pero no tan pronunciada como la del gel Carbopol. En el momento de preparación tiene un color amarillento. Pasadas las 24h de reposo. Tampoco se observaron cambios de color ni de consistencia durante los 3 meses almacenado a 25°C (figura 38).

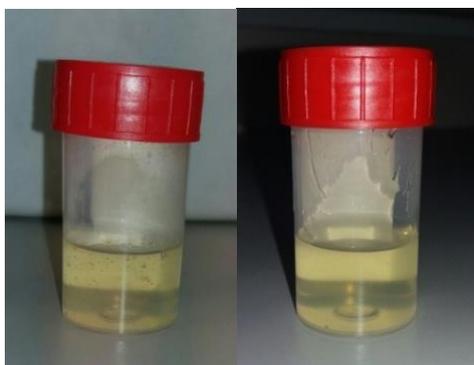


Figura 38. Gel mucoadhesivo de CMCNa 4% y KT 2% preparado in situ (izquierda) y después de 24h de reposo (derecha)

Se analizó el pH de los mucoadhesivos por triplicado y se calcularon las medias. Ambos mucoadhesivos tienen valores de pH parecidos al pH fisiológico. La medida del pH se hizo por triplicado y, aunque los valores oscilen un poco entre ellos, los coeficientes de variación son bajos (tabla 8).

Tabla 8. Valores de pH de cada formulación de KT. DE= desviación estándar y CV= coeficiente de variación.

	<b>pH</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Gel CMCNa</b>	6,19	6,37	0,16	0,027
	6,44			
	6,50			

### *Comportamiento reológico*

Los valores de viscosidad obtenidos para CMC fue de  $1,69 \pm 0,018$  Pa·s. Como puede observarse en la gráfica (figura 39), las formulaciones presentan una tixotropía aparente puesto que en las curvas de flujo se representan bucles de histéresis. Estos hallazgos están de acuerdo con investigaciones de Ana Flo et al. [20] en las cuales se estudiaron las características reológicas de geles de Melatonina, entre ellos el gel de Carbopol y el gel de CMCNa.

Se ha comentado anteriormente que las características pseudo-plásticas y tixotrópicas del gel CMC confieren ventajas para su administración tópica como fluidificación en el momento de la aplicación y una posterior recuperación de la estructura inicial.

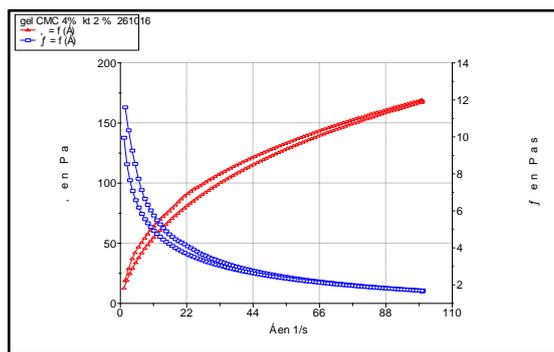


Figura 39. Fluidez (rojo) y viscosidad (azul) del mucoadhesivo de CMCNa

El análisis de la curva del flujo, ha dado un mejor ajuste en la ecuación de Cross (ecuación 16), proporcionando un valor de  $r=1$  en el gel CMCNa.

Los materiales que se ajustan a la ecuación de Cross siguen un modelo de flujo No-Newtoniano pseudoplástico. En concreto se trata de fluidos no-newtonianos independientes del tiempo (Gárete et al., 2014).

#### 4.2. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLÍMEROS DE POLI-LÁCTICO CO-GLICÓLICO)

La asociación de un agente antiinflamatorio no esteroideo, KT, a polímeros preformados, como los poliésteres, en forma de nanopartículas depende tanto de las características del polímero como de la estructura (matricial, vesicular) elegida. Uno de los aspectos a considerar al seleccionar, tanto el polímero formador de los sistemas coloidales como la técnica de elaboración, es el perfil de liberación que se pretende conseguir. La liberación de los fármacos incorporados en nanopartículas de polímeros sintéticos, puede ser lenta cuando el proceso está controlado por la degradación hidrolítica del polímero, o rápida, limitada a unas horas, cuando el mecanismo que rige la cesión del fármaco es el reparto de principio activo entre la fase interna del sistema coloidal y el medio de liberación. Dado que el tiempo de permanencia de las formas

instilables en el fondo del saco conjuntival es limitado, se planteó la necesidad de que el principio activo se libere en su totalidad en el sistema coloidal antes de que sea eliminado del área precorneal por los mecanismos de drenaje oculares. Desde este punto de vista se seleccionó el polímero PLGA 50:50 (de liberación más rápida que el resto de copolímeros) con el fin de facilitar así la liberación rápida del fármaco a la superficie corneal (Pitt y cols, 1981).

#### **4.2.1. Optimización de las nanopartículas de KT-PLGA**

Con el fin de optimizar los sistemas nanoparticulares de copolímeros de poliláctico-glicólico 50:50 desarrollados, se realizó una aproximación de **diseño factorial central compuesto**.

Los ensayos previos realizados, evidenciaron, que las tres variables que ejercen mayor influencia en las características fisicoquímicas de los sistemas desarrollados y esencialmente en su morfometría y en la eficiencia de asociación del principio activo al polímero, son la concentración del principio activo (ketorolaco), la concentración del polímero (PLGA) y el pH del medio.

En base a estos tres factores se planteó el diseño factorial central compuesto, para la formulación de poliláctico glicólico 50:50, utilizando como valor central los valores de cada una de estas tres variables que muestran una eficiencia de asociación del fármaco más elevada, manteniendo el tamaño del sistema nanoparticular dentro de los límites aceptables para su administración ocular.

En la tabla 9 se muestran las tres variables independientes estudiadas para la formulación de PLGA 50:50 y sus niveles.

Tabla 9. Variables independientes y sus niveles investigados en el diseño factorial.

VARIABLES	NIVELES				
	-1.68	-1	0	+1	+1.68
$X_1$ C KT (mg/mL)	0	2.5	6.25	10	12.5
$X_2$ Q PLGA (mg)	83	90	100	110	116
$X_3$ pH	2.5	3.5	5	6.5	7.5

El diseño planteado implica el análisis de tres variables con cinco niveles y requiere, por tanto 16 experimentos. En la tabla 10 se reflejan de forma detallada los valores de las variables de cada uno de los dieciséis ensayos realizados.

Todos los ensayos se realizaron de forma aleatoria, por duplicado, con una concentración de tensioactivo (PVA) previamente fijada (20 mg/mL), deducida a partir de los estudios preliminares de preformulación.

Una vez realizados los experimentos, se analizaron todas las variables dependientes más relevantes: la eficacia de asociación (expresada en porcentaje de fármaco asociado a nanoesferas) y las características morformétricas (tamaño promedio y polidispersión promedio). En la tabla 11 se exponen los valores promedio obtenidos para dichas variables dependientes en los 16 ensayos realizados.

Tabla 10: Ensayos realizados con sus niveles y valores de las variables independientes.

ENSAYO	VARIABLES INDEPENDIENTES			VALORES DE LAS VARIABLES INDEPENDIENTES		
	X1	X2	X3	X <sub>1</sub> C KT (mg/mL)	X <sub>2</sub> Q PLGA (mg)	X <sub>3</sub> pH
1	-1	-1	-1	2.5	90	3.5
2	1	-1	-1	10	90	3.5
3	-1	1	-1	2.5	10	3.5
4	1	1	-1	10	110	3.5
5	-1	-1	1	2.5	90	6.5
6	1	-1	1	10	90	6.5
7	-1	1	1	2.5	110	6.5
8	1	1	1	10	110	6.5
9	1,68	0	0	12.5	100	5
10	-1,68	0	0	0	100	5
11	0	1,68	0	6.25	116	5
12	0	-1,68	0	6.25	83	5
13	0	0	1,68	6.25	100	7.5
14	0	0	-1,68	6.25	100	2.5
15	0	0	0	6.25	100	5
16	0	0	0	6.25	100	5

A partir de los resultados experimentales del diseño factorial se ajustaron las tres variables dependientes: tamaño promedio (Zav), polidispersión promedio (pDI) y eficiencia de encapsulación del fármaco (EE).

Tabla 11. Valores de las variables dependientes de los ensayos de optimización realizados.

ENSAYO	VARIABLES INDEPENDIENTES			VALORES DE LAS VARIABLES DEPENDIENTES		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Zav (nm)	PdI	EE KT (%)
1	-1	-1	-1	128.0	0.046	7.79
2	1	-1	-1	107.4	0.049	36.21
3	-1	1	-1	131.8	0.047	14.6
4	1	1	-1	115.5	0.048	45.66
5	-1	-1	1	122.8	0.059	0
6	1	-1	1	104.5	0.055	42.11
7	-1	1	1	164.2	0.079	85.47
8	1	1	1	138.2	0.066	88.63
9	1.68	0	0	104.4	0.064	55.18
10	-1.68	0	0	110.3	0.040	0
11	0	1.68	0	119.5	0.055	26.84
12	0	-1.68	0	104.8	0.045	22.84
13	0	0	1.68	113.3	0.053	80.41
14	0	0	-1.68	116.7	0.045	43.64
15	0	0	0	185.5	0.040	99.72
16	0	0	0	179.4	0.046	98.12

Las superficies de respuesta obtenidas para el tamaño promedio (nm) de las nanopartículas, con respecto a dos de las variables independientes analizadas se muestran en las figuras 40 y 41.

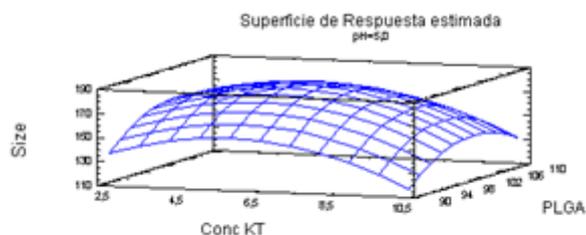


Figura 40. Superficie de respuesta del tamaño de partícula frente a concentración de KT y PLGA para un pH fijado a 5.0.

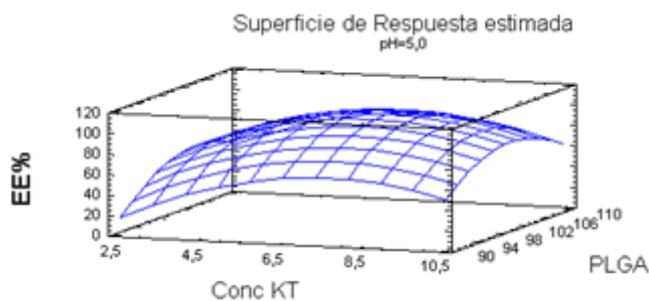


Figura 41. Superficie de respuesta de la eficiencia de encapsulación frente a concentración de KT y PLGA para un pH fijado a 5.0.

Del análisis de la superficie de respuesta de la figura 40 se desprende que el tamaño de partícula presenta valores mínimos para cantidad de PLGA entre 83 y 90 mg. Con respecto a la concentración de KT el tamaño promedio de partícula aumenta al incrementarse la concentración de KT. No obstante, todas las formulaciones presentan un tamaño adecuado para la administración ocular independientemente de los valores de las variables estudiadas con una baja polidispersión.

Del análisis de la superficie de respuesta de los diagramas (figura 41) se desprende que la eficiencia de encapsulación del fármaco en nanopartículas aumenta con la concentración de KT hasta un máximo que se encuentra alrededor de 6.25 mg/ml. Con respecto a la cantidad de PLGA se observó una máxima encapsulación en valores cercanos a 100 mg, que corresponde al valor central del diseño factorial.

Las eficiencias de encapsulación más elevadas se consiguieron con valores de pH alrededor de 5 (tabla 11).

A partir de los resultados obtenidos en la optimización por diseño factorial central compuesto, se seleccionó una formulación (F15), considerando principalmente la eficiencia de encapsulación del KT en el sistema polimérico puesto que sus características morfológicas y morfométricas (tamaño promedio de partícula y

polidispersión) son similares entre ellas y adecuadas para la administración ocular. La composición de la formulación seleccionada se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Formulación seleccionada

	<b>Optimizada</b>
<b>Ketorolaco (mg/mL)</b>	5
<b>PLGA 50:50 (mg)</b>	100
<b>pH fase acuosa</b>	5.5

La formulación optimizada se corresponde a la formulación F15 procedente del diseño factorial a excepción de la concentración de KT seleccionada que se fijó en 5 mg/mL. Este cambio fue debido a que la formulación comercialidad (Acular® colirio) tiene una concentración de activo de 5 mg/mL. Ya que existe muy poca variación en el tamaño de partícula entre los distintos niveles de dosis. Se sabe que la concentración de 5 mg/mL es eficaz y segura debido a la existencia de Acular, se ha decidido tomar esta concentración. La formulación optimizada presentó las siguientes características: tamaño de partícula 112 nm, PDI 0.043 y EE% del 99.01%

Respecto a las características morfométricas de las formulaciones seleccionadas el tamaño promedio de partícula es idóneo para administración ocular sin producir irritación, obteniéndose suspensiones homogéneas de polidispersión inferior a 0,1, característico de los sistemas monodispersos, como pone de relieve la imagen de microscopía de electrónica de transmisión (figura 42).

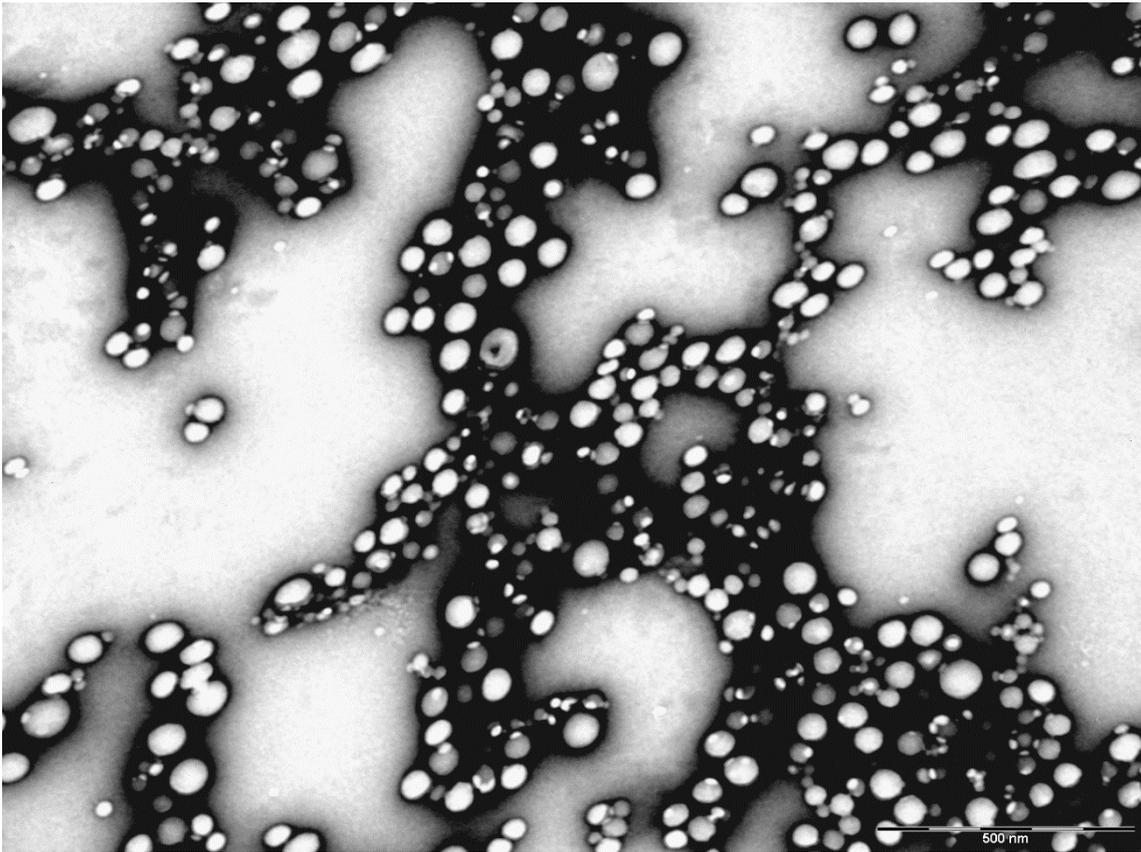


Figura 42: Imagen realizada con microscopio electrónico de transmisión.

El análisis de microscopía electrónica de transmisión confirma el aspecto regular y homogéneo de las mismas, debido a que las nanopartículas están constituidas por una matriz polimérica rígida. El tamaño de las nanopartículas es ligeramente inferior a 100 nm, esta discrepancia en el tamaño de partícula respecto al resultado obtenido por DLS se debe a que ésta última técnica mide el tamaño hidrodinámico. Las partículas en suspensión tienen una capa de solvatación de agua alrededor de ellas por lo que el tamaño obtenido es ligeramente superior al tamaño de la partícula aislada que es lo que se observa en el TEM.

#### 4.2.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los termogramas obtenidos por DSC para el KT, PLGA y nanopartículas de KT optimizadas se muestran en las figuras 43-46. La curva correspondiente al PLGA presenta un pico endotérmico único y bien definido que corresponde a la fusión. La curva de DSC obtenida para el KT muestra, dos procesos endotérmicos, el primero correspondiente al punto de fusión (159.90°C) y el segundo pico corresponde al fenómeno de descomposición (168.13°C). Las temperaturas máximas del pico, las temperaturas de onset y las entalpías correspondientes a los componentes puros se muestran en la tabla 13. En dicha tabla también están reflejados los resultados obtenidos a partir de la determinación de la composición eutéctica (50:50) de NPs de KT optimizadas.

Tabla 13. Valores de entalpía, temperatura de onset y temperatura de fusión de KT, y NPs de KT

Muestra	$\Delta H$ (J/g)	T. Máx. pico (°C)	Temperatura onset (°C)
<b>KT</b>	-55.22	159.90	<b>156.47</b>
<b>PLGA</b>	-8.52	54.78	<b>50.76</b>
<b>NPS-blancas</b>	-1834.04	102.17	<b>94.94</b>
<b>NPS-KT</b>	<b>-1903.82</b>	<b>103.18</b>	<b>97.36</b>

La figura 43 muestran el polímero PLGA puro, el principio activo (KT) puro las NPs blancas y las NPs de KT, respectivamente. En el termograma obtenido a partir de las nanopartículas de KT no se observa el evento térmico correspondiente a la fusión de los cristales de KT (159.9°C), por lo tanto se desprende que el fármaco está encapsulado en su totalidad, este hecho confirma el resultado obtenido de eficacia de encapsulación del 99.01%.

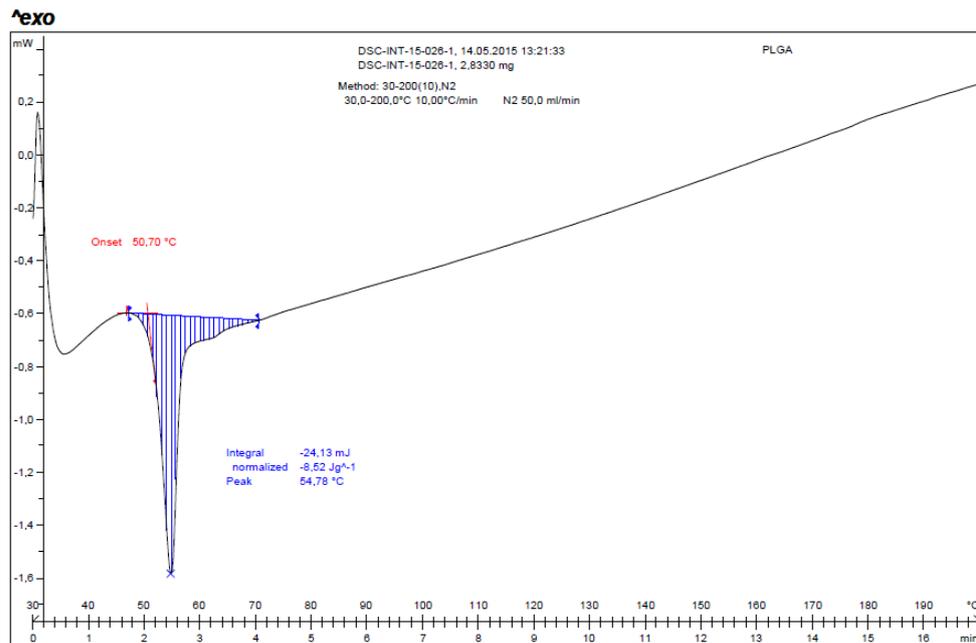


Figura 43. Termograma del PLGA puro obtenido por DSC.

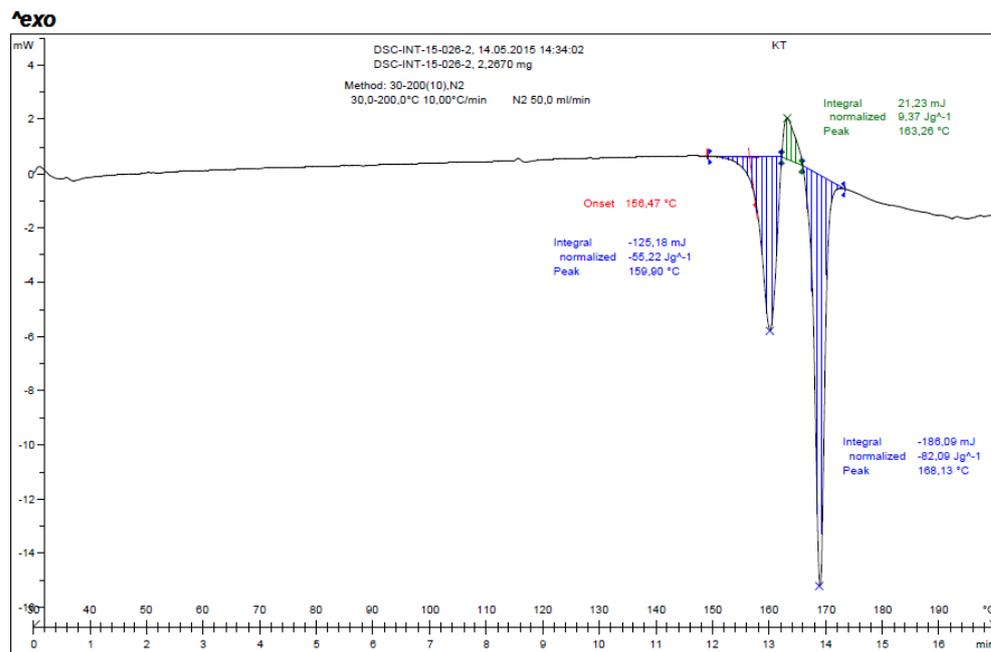


Figura 44.:Termograma del KT puro obtenido por DSC. LA curva muestra dos procesos endotérmicos.

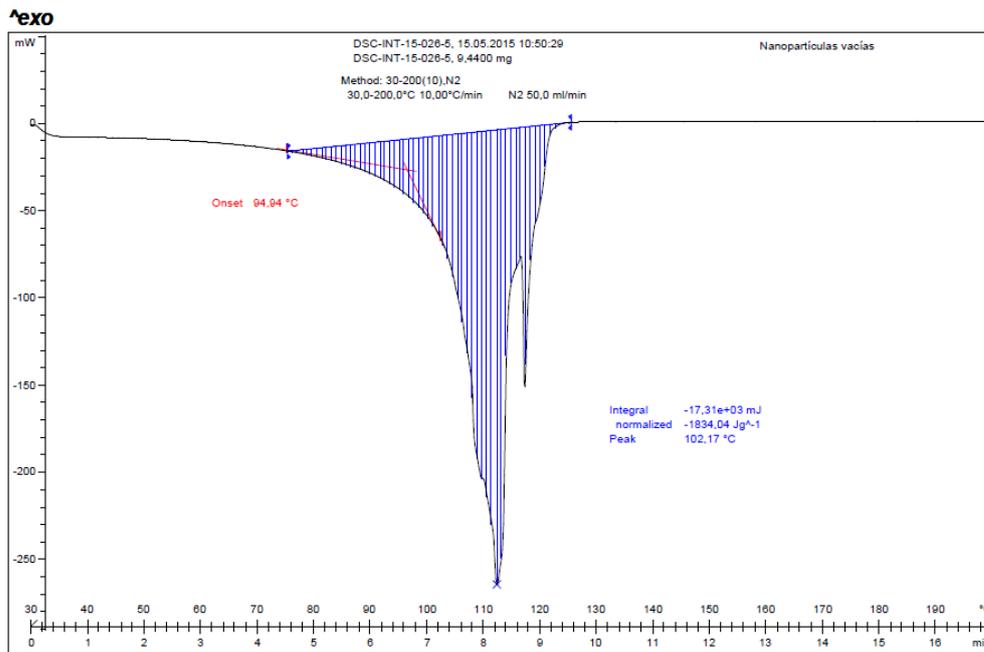


Figura 45. Termograma de las nanopartículas blancas, sin asociación del fármaco (ketorolaco) obtenido por DSC.

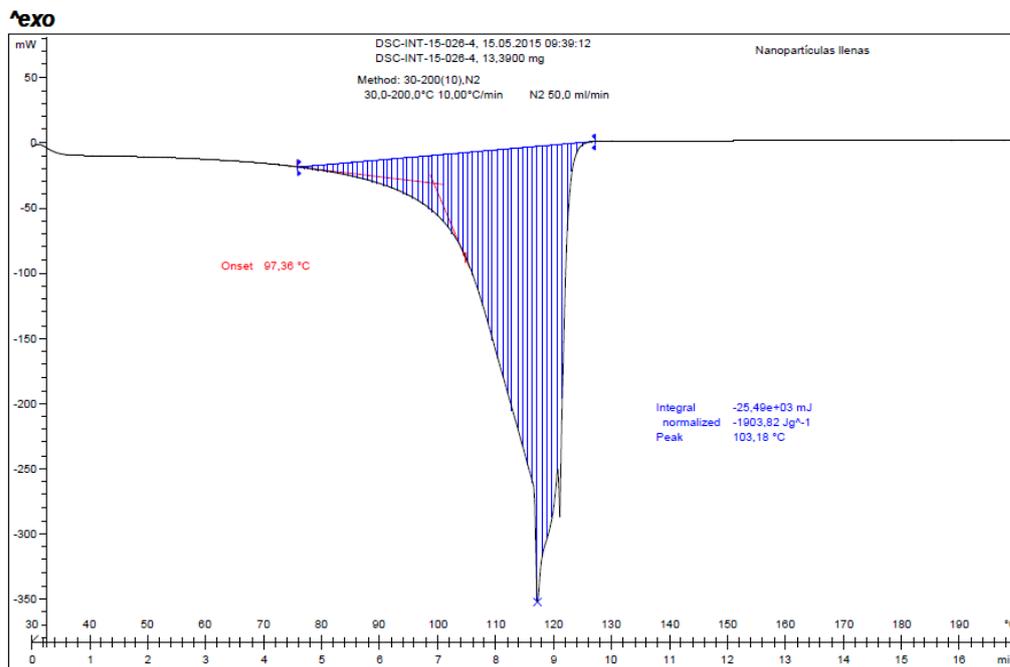


Figura 46. Termograma de las nanopartículas de ketorolaco 0.5%, obtenido por DSC.

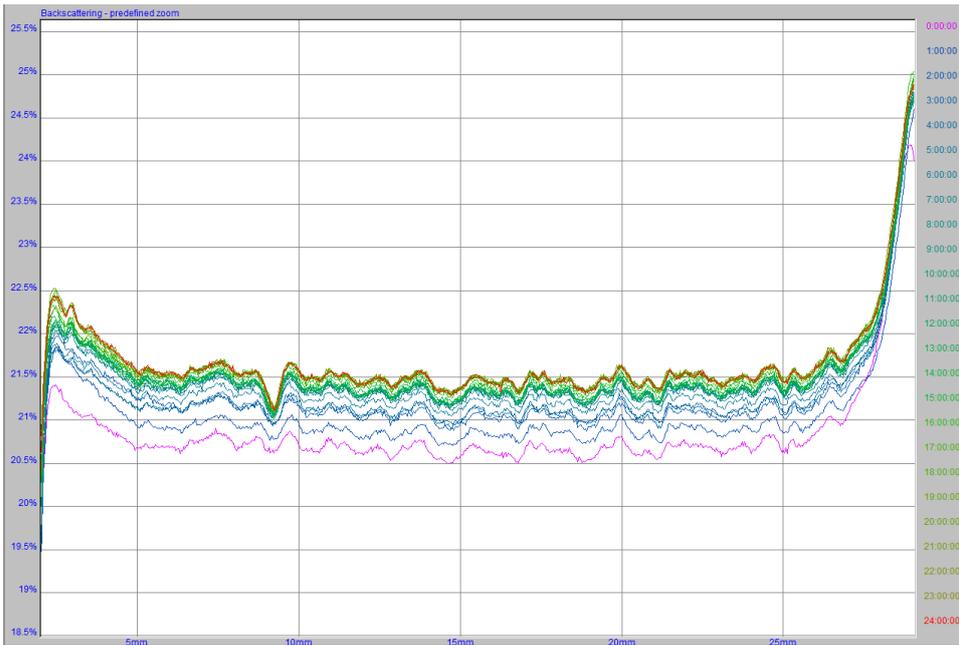
### 4.2.3. Estabilidad óptica a corto plazo

La estabilidad de los sistemas coloidales es un factor importante en su caracterización y su posible introducción en terapéutica ya que permite controlar su validez y las condiciones requeridas de almacenamiento. Aunque estos sistemas son intrínsecamente inestables pueden considerarse cinéticamente estables si su velocidad de desestabilización es suficientemente baja comparada con su expectativa de vida media. Dado que la desestabilización física de estos sistemas afecta a su homogeneidad, es importante detectarla en el menor tiempo posible con el fin de mejorar la producción industrial.

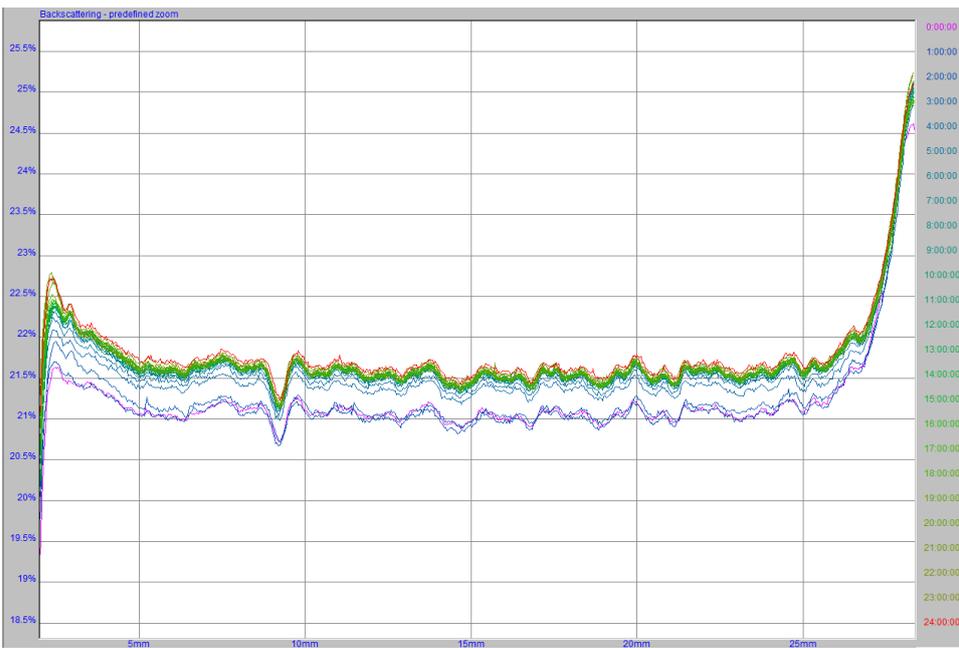
La caracterización de la posible inestabilidad de las dispersiones antes de que puedan detectarse a simple vista, se determinó, con el analizador óptico TurbiscanLab (Formulacion, France), analizando la luz transmitida y dispersada por la muestra (20 mL en célula de vidrio, en posición vertical) cada 40 micrómetros, durante 24 horas

Con el fin de visualizar este proceso y determinar la capacidad del nuevo analizador óptico TurbiscanLab para predecir la inestabilidad de distintas muestras de dispersiones en un corto espacio de tiempo, se han observado las NPs de KT cada hora durante las primeras 24 horas, justo tras su preparación y tras un periodo de almacenamiento de una semana a temperatura ambiente. La mayor ventaja de este instrumento es que permite detectar cualquier fenómeno de desestabilización mucho antes que el ojo del operador, especialmente en casos de sistemas opacos y concentrados.

La figura 47 muestra el perfil “back scattering” de las muestras. Como puede verse, se produjo un ligero incremento de la retrodispersión de la luz (1%) en la primera hora. Este incremento no se considera significativo. La señal de back scattering no presentó diferencias con las lecturas realizadas tras un periodo de almacenamiento de una semana.



A.



B.

Figura 47: Perfil de radiación dispersada por NP de KT (Panel superior, NPs recién preparadas. Panel inferior NPs almacenadas durante una semana a temperatura ambiente)

### 4.3. CONTENIDO DE KT EN LAS FORMULACIONES

El contenido de fármaco de la formulación se evaluó dentro de  $\pm 10\%$  de la concentración nominal en todos los casos (Tabla 14).

Tabla 14. Contenido de KT en las formulaciones.

Formulación	Contenido teórico de KT(%) (p/v)	Contenido de KT (%) (p/v)
KT-HG Pluronic®	2.00	2.10 $\pm$ 0.002
KT-HG Carbopol®	2.00	1.84 $\pm$ 0.030
NPs-KT	0.5	0.47 $\pm$ 0.001

### 4.4. ESTUDIO DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

#### 4.4.1. Estudio de liberación *in vitro* para hidrogeles

Se determinaron las cantidades de fármaco liberado a diversos intervalos de tiempo a través de membrana de diálisis durante 9 horas bajo condiciones sink. Con el fin de examinar el mecanismo de liberación de KT a partir de hidrogeles, los resultados del ensayo de liberación se ajustaron a los modelos cinéticos de orden cero, de primer orden, de Higuchi y Korsmeyer-Peppas. Se seleccionó el modelo matemático que mejor describía la cinética de liberación del KT en función del parámetro discriminatorio de modelos, el Criterio de Información de Akaike (AIC), determinando que la función de cinética de orden uno (Ecuación 25) era la que mejor ajustaba a los datos experimentales, en todas las formulaciones.

Como se representa en la figura 48, el KT se libera de los geles prácticamente en su totalidad en las primeras 2 h del experimento ( $95.73 \pm 4.37\%$  a partir de C940-HG y  $92.83 \pm 3.32\%$  de P407-HG). En cuanto a la velocidad de liberación, la viscosidad suele ser un factor de alta influencia, en este caso otros factores también parecen influir en la cinética de liberación, como la porosidad de las formulaciones; tal y como se recoge en la tabla 6, la porosidad del carbopol es superior a la del pluronic (98.7 vs.

74.9%) lo cual facilitaría la difusión del principio activo a través de la matriz lo que se refleja en una constante de liberación de primer orden (K) de  $3,46 \pm 0,84 \text{ h}^{-1}$  y  $1,37 \pm 0,22 \text{ h}^{-1}$  para KT-C940 -HG y KT-P407-HG, respectivamente. Por otro lado, la naturaleza del carbopol es más hidrófila que la del pluronic (debido a la alternancia de las regiones hidrófilas PEO e hidrófoba PPO) y por tanto la alta hidrofilia del KT hace que la difusión a través del pluronic sea más dificultosa que en el caso del carbopol.

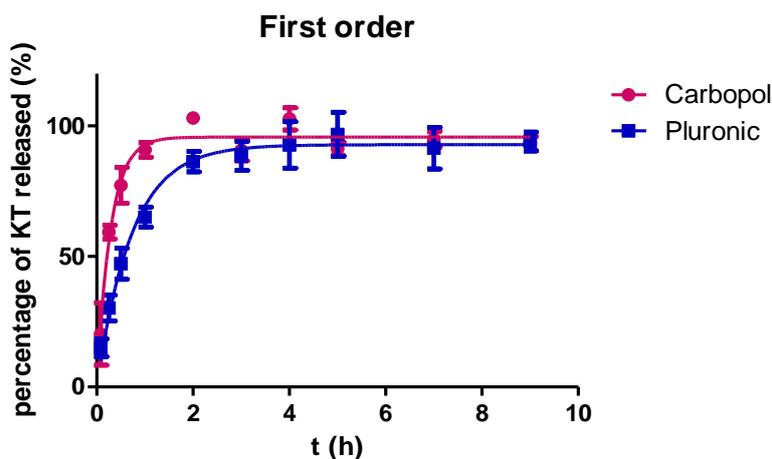


Figura 48. Perfil cinético de primer orden de KT liberado de hidrogel 2% KT.

Como se ha dicho anteriormente, P407-HG exhibió un comportamiento de transición sol-gel reversible y se convierte en un gel por encima de la temperatura de gelificación crítica (Brugués et al., 2015). Esta temperatura de gelificación crítica fue de  $31 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y, por lo tanto, gelificó bajo condiciones de experimento de liberación ( $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). La liberación de KT de HGs fue principalmente vía difusión. En el modelo cinético de primer orden la constante de liberación es directamente proporcional a la concentración de fármaco en la matriz. Los valores K obtenidos fueron indicativos de que las formulaciones podrían proporcionar una gran cantidad de fármaco rápidamente en la superficie de SC y mejorar la absorción del fármaco a través de la piel (El-Setouhy y El-Ashmony, 2010).

#### 4.4.2. Estudio de liberación *in vitro* para las nanopartículas

De forma análoga a lo descrito en el apartado anterior, se realizó el estudio de liberación *in vitro* de las nanopartículas en las celdas de difusión de Franz. El estudio se realizó bajo condiciones sink y se utilizó una membrana de diálisis para separar el compartimento donador del compartimento receptor. En este experimento además de las NPs, también se estudió la cinética de liberación de la formulación comercial, Acular colirio.

La figura 49 muestra los perfiles de liberación para ambas formulaciones (n=4). En ambos casos se observa que la liberación de KT de ambas formulaciones es muy rápida.

Tras la obtención de los pares Cantidad acumulada de KT versus tiempo, para ambas formulaciones, se procedió a su ajustado cinético a diversas ecuaciones matemáticas (orden cero, orden uno, Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Weibull). La selección del modelo matemático que ajusta a los datos experimentales se llevó a cabo mediante la parámetro AIC (el de menor valor). También se tuvieron en cuenta la dispersión de los residuales y la precisión en la estimación de los parámetros (expresado como coeficiente de variación, CV%).

Para ambas formulaciones, el modelo cinético seleccionado fue la ecuación de Weibull (ecuación 28), que presentaba el menor valor de AIC, comparado con los otros modelos (AIC de NPs = 148,1 y AIC de Acular=183,68), y un buen ajustado de las ecuaciones, es decir una baja dispersión de los residuales estimados.

La ecuación de Weibull es una ecuación empírica, con tres parámetros característicos,  $Q_{max}$  o cantidad máxima liberada;  $t_d$  o tiempo en que tarda en liberarse el 63,2% de fármaco desde la formulación; y  $\beta$  o índice de sigmoidicidad. La tabla 15 muestra los valores de dichos parámetros y la precisión en su estimación (CV%).

Tabla 15. Parámetros de ecuación de Weibull y precisión de estimación para NPs y Acular

<b>Formulación</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>CV</b>
<b>NPs</b>	Qmax	68,53 %	1,92 %
	$\beta$	0,87	15,93 %
	td	0,85 h	9,48 %
<b>Acular</b>	Qmax	76,32 %	2,80 %
	$\beta$	0,82	35,83 %
	td	0,51 h	23,02 %

En base a la figura 49 (el perfil de liberación) y al valor obtenido de Qmax para ambas formulaciones se puede observar que es elevada y se alcanza rápidamente, siendo ligeramente superior y estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para el Acular. Este resultado es esperable, ya que el KT se encuentra completamente liberado y solubilizado en la solución oftálmica.

Cabe la pena destacar los valores de td, tomando el valor medio de 0,85 h para las NPs y de 0,51 h para la solución ocular, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Como se puede ver, las NPs tardan más tiempo en liberar el 63,2% de fármaco, por lo que se puede concluir que las NPs retrasan la liberación de KT frente a al colirio comercial. Aun así, la liberación de fármaco de las NPs se puede considerar rápida, hecho que resulta útil en el caso de formulaciones oftálmicas, ya que el tiempo de residencia dentro del saco conjuntival es limitado debido a factores ya mencionados, como el flujo lacrimal y el parpadeo.

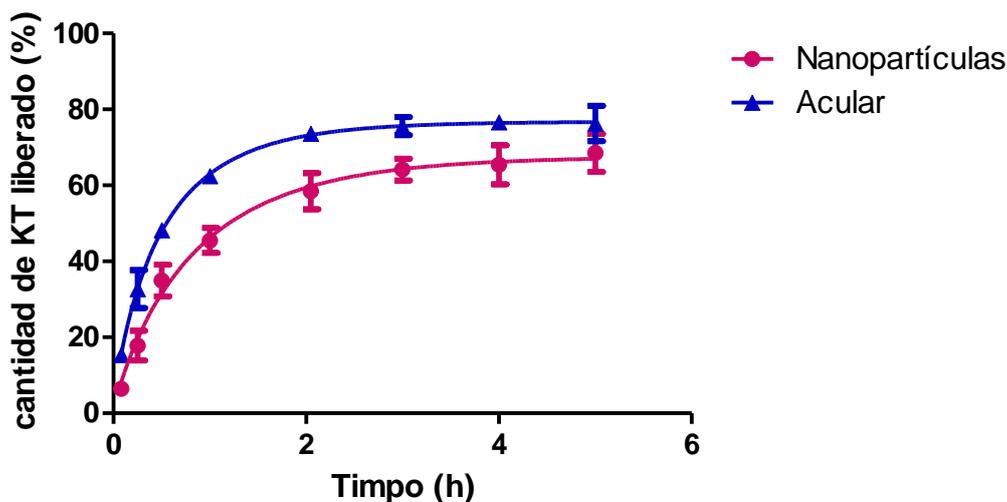


Figura 49. Perfil cinético de NPs y Acular solución oftálmica.

Tal y como se ha comentado anteriormente la ecuación de Weibull es una ecuación empírica, no mecanística, por lo que no se puede deducir de ella el mecanismo de liberación del fármaco desde la matriz. Papadopoulou V et al (2006) (V. Papadopoulou, K. Kosmidis, M. Vlachou, P. Macheras, On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms, *Int. J. Pharm.* 17 (2006) 44–50.) propuso que el parámetro  $\beta$  puede ser un indicador del mecanismo de liberación, de tal forma que valores de  $\beta$  menor o igual a 0,75 dan lugar a una difusión fickiana, valores de  $\beta$  comprendidos entre 0,75 y 1 dan lugar a una combinación de mecanismo de liberación (difusión fickiana y caso de transporte II) y valores de  $\beta$  mayores que 1 son indicativos de un mecanismo de liberación complejo. Los valores de  $\beta$  obtenidos en el caso de las NPs son 0,87 y para Acular 0,82 por lo que se puede decir que en ambos casos el proceso de liberación se produce por una combinación de mecanismos de liberación. La liberación a partir de las NPs puede ser debido a la acción combinada de la difusión del fármaco a partir de la matriz polimérica, sumado al efecto de la erosión que se produce sobre la zona superficial de las NPs al encontrarse en solución. En el caso del mecanismo de liberación combinado del colirio, puede ser debido al efecto de uno de los excipientes de la especialidad Acular: octoxynol 40, un tensioactivo que puede dar lugar

a micelas y que posee en su estructura un anillo aromático que interaccionaría mediante enlaces  $\pi$ -resonante con el anillo aromático del KT.

#### 4.5. ESTUDIO DE PERMEACIÓN EX VIVO

##### 4.5.1. En piel

##### *Parámetros de permeación*

El estudio de permeación cutánea *ex vivo* de KT de C940-HG y P407-HG se realizó con el fin de determinar el perfil de permeación del fármaco de estos vehículos, así como los parámetros de permeación de la piel. Se utilizó piel de cerdo para este experimento porque es una membrana representativa para la absorción percutánea debido a su similitud estructural con la piel humana y densidad de folículos pilosos (Alonso et al., 2015).

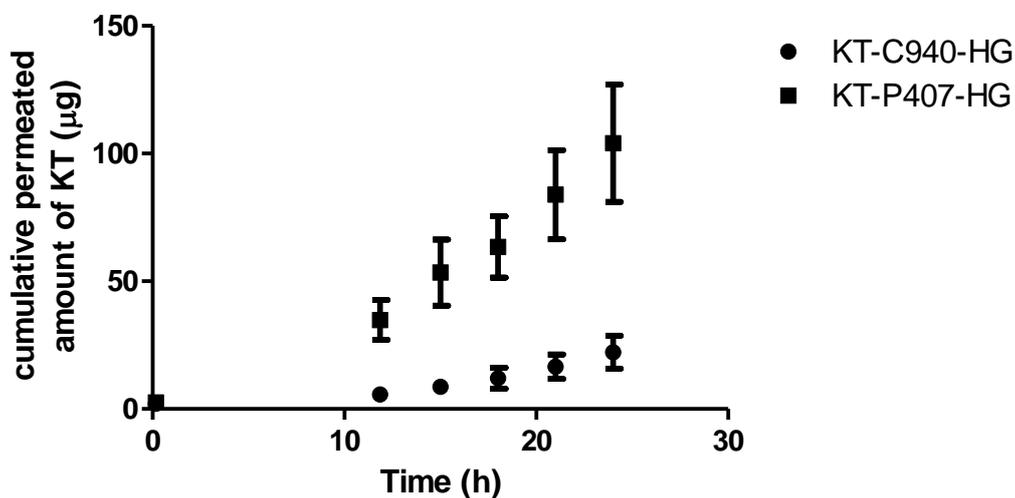


Figura 50. Cantidad acumulada de KT permeado a través de la piel porcina a partir de formulaciones durante 24 horas. Los datos en cada punto de tiempo representan la media  $\pm$  DE de 4 replicados.

La Figura 50 muestra las cantidades acumuladas de KT a partir del C940-HG y P407-HG. La Tabla 16 muestra los parámetros de permeación de KT calculados a partir de las cantidades permeadas a través de la piel después de 24 horas de exposición, y la cantidad de KT retenida en la piel a las 24h. Los valores medianos de la cantidad acumulada de KT permeado después de 24 h fueron de 20,25  $\mu\text{g}$  y 105,06  $\mu\text{g}$  para KT-C940-HG y KT-P407-HG, respectivamente.

El  $T_L$  es el tiempo de KT para permear a través de la membrana de la piel y difundir en el medio receptor cuando se alcanza el estado de equilibrio estacionario.  $T_L$  para KT-C940-HG fue de 8,5 h y 4,9 h para KT-P407-HG.

Tabla 16. Parámetros de permeación transdérmica de KT después de 24h. Los resultados se expresan como Mediana (Mínimo-Máximo).

<b>Parámetro</b>	<b>KT-C940-HG</b>	<b>KT-P407-HG</b>
$A_{P24h}$ ( $\mu\text{g}$ )	20.25 (17.68 - 26.81)	105.06 (87.83 - 120.29)
$A_R$ ( $\mu\text{g/g}$ piel/ $\text{cm}^2$ )	192.01 (188.88 – 347.94)	1475.84 (773.38 – 2107.53)
$T_L$ (h)	8.5 (7.5 – 8.9)	4.9 (4.8 – 5.4)
$J$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )/h)	2.01 (1.67 – 2.27)	8.16 (7.04 – 9.08)
$K_P$ ( $\times 10^{-3}$ ) (cm/h)	0.93 (0.83 – 1.14)	4.23 (3.52 – 4.54)
$C_{ss}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0,058 (0.049 – 0.066)	0,241 (0.205 – 0.265)

El experimento ha sido llevado a cabo bajo el paradigma de dosis infinitas (la concentración de fármaco en el compartimento donador es superior a  $100 \text{ mg/cm}^2$ , por lo que la concentración en el compartimento donador se asume constante) (OECD núm. 28, 2004). Estas condiciones permiten calcular el flujo en el estado de equilibrio estacionario y a partir de éste se puede obtener  $K_p$  y el resto de parámetros de permeación que se recogen en la tabla 16.

Las cantidades de KT retenidas en la piel también se muestran en la Tabla 16. Basándose en estos datos, podría estimarse  $C_{ss}$ , que es una predicción de los niveles plasmáticos que se alcanzarían *in vivo* después de la aplicación tópica de HG desarrollados. Considerando un aclaramiento plasmático en seres humanos de  $34,3 \text{ ml/min}$  (Cordero et al., 1997) y un área de aplicación de  $1 \text{ cm}^2$ , el  $C_{ss}$  sería de  $0,058 \text{ } \mu\text{g/ml}$  para KT-C940-HG y  $0,241 \text{ } \mu\text{g/ml}$  para el KT-P407-HG. Los valores de  $C_{ss}$  teóricos estaban por debajo de la concentración plasmática terapéutica ( $0,3\text{-}5 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ) (Cordero et al., 1997) lo que minimizaría el riesgo potencial de efectos secundarios sistémicos.

La prueba no paramétrica de U-Mann-Whitney mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) para  $T_L$ , J,  $K_p$  y  $C_{ss}$  entre KT-C940-HG y KT-P407-HG.

### ***Absorción percutánea y distribución del KT en las capas de la piel***

Esta fase experimental se realizó en piel humana y bajo el paradigma de dosis finitas en el cual la concentración de fármaco en el compartimento donador va disminuyendo a lo largo del tiempo (ya que la cantidad sembrada es inferior  $10 \text{ mg/cm}^2$ ) simulando la aplicación real del producto sobre la piel (OECD núm. 28, 2004).

Una vez finalizado el ensayo de permeación, se retiró el exceso de formulación de la superficie de la piel y se tomaron muestras del medio receptor. Ambas muestras se analizaron para determinar la cantidad de KT. Para estudiar la distribución del KT en las diferentes capas de la piel, se procedió a la separación de la piel en las capas estrato

córneo, epidermis y dermis; con las cuales, se realizó la extracción del KT mediante sonicación de cada una de las capas.

La Tabla 17 muestra los resultados obtenidos de KT recuperado de la superficie de la piel, SC, epidermis y dermis después de un tiempo de exposición de 24 h. Se observó que el KT-C940-HG sólo fue absorbido un 1%, mientras que el KT-P407-HG se absorbió menos del 0,4%. La gran mayoría de KT permaneció en la superficie de la piel en ambas formulaciones, aproximadamente el 92% de la dosis aplicada en el compartimiento donador. El mayor porcentaje de KT en el caso C940-HG se encontró en primer lugar en la superficie seguido de la epidermis. En el caso del P407-HG, el porcentaje más alto de KT se encontró en la superficie seguido del SC siendo inferior al 1%. El C940-HG presentó cantidades residuales de KT en el medio receptor, a diferencia del P407-HG en el cual no se detectó fármaco.

Tabla 17. Distribución de KT dentro de la piel de las tres formulaciones después de un tiempo de exposición de 24h. Los resultados se expresan como valores medios  $\pm$  desviaciones estándar para 3 células.

<b>Porcentaje de KT (%)</b>	<b>Hidrogel de Carbopol®</b>	<b>Hidrogel de Pluronic®</b>
S	92,89 $\pm$ 5,04	92,61 $\pm$ 4,52
SC	0,29 $\pm$ 0,19	0,27 $\pm$ 0,19
E	1,29 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,07
D	< loq	< loq
FR	0,04 $\pm$ 0,03	< lod
Recuperación	94,51 $\pm$ 5,24	93,01 $\pm$ 4,37
Absorción percutánea	1,34 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,07

<loq = por debajo del límite de cuantificación; <lod = por debajo del límite de detección. S= superficie de la piel, SC = estrato córneo, E = epidermis, D = dermis, FR = fluido receptor.

Se sabe que el SC es la barrera primaria contra la penetración del fármaco, por lo tanto, se asume que la cantidad de KT absorbida percutáneamente es la de la epidermis, la dermis y la cantidad en el medio receptor. De acuerdo con estos estudios, se hace evidente que el SC es la barrera predominante para la penetración de KT a través de la piel. Esto es coherente con el carácter hidrófilo del KT ( $\log P$  0.26) lo cual dificulta la penetración de la molécula a través de esta capa de la piel.

Por lo tanto, se espera que el fármaco permanezca limitado al vehículo en lugar de difundir a través de la piel. Cabe destacar que para los sistemas de administración tópica se desea una acumulación en la piel con penetración mínima para el tratamiento de inflamaciones locales (Dumortier et al., 2006).

#### **4.5.2. En mucosa bucal**

##### ***Intrínseca***

En primer lugar, se estudió la permeación intrínseca del KT, para ello se realizó un ensayo de permeación con una solución saturada de KT que resultó ser  $355.68 \pm 8.58$  mg/ml. De modo que se pudiera estudiar la propia capacidad de permeación del fármaco sin limitación de la concentración. Las membranas biológicas fueron la parte interna de la mejilla y la zona sublingual. Se evaluaron las cantidades acumuladas de fármaco permeado a las 6 horas, y parámetros biofarmacéuticos tales como la constante de permeación, el tiempo de latencia, el flujo y se calculó la predicción de niveles plasmáticos que se obtendrían por cada una de las vías si se administrara a humanos.

La figura 51 muestra las cantidades acumuladas permeadas de KT frente al tiempo. Como puede apreciarse en la gráfica, el estado de equilibrio estacionario se alcanza a tiempos muy tempranos, alrededor de 1h (ver  $T_L$ , tabla 18).

Los resultados obtenidos (tabla 18) muestran que tanto las cantidades acumuladas de KT como el flujo y la constante de permeación son 4 veces superiores en permeación sublingual que a través de la mejilla. Y el tiempo de latencia es inverso, es decir, el

tiempo de latencia es 4 veces menor en el caso de la permeación sublingual. Este resultado es esperado puesto que la mucosa sublingual presenta un espesor menor que la mucosa bucal (Bhati y Madan, 2012).

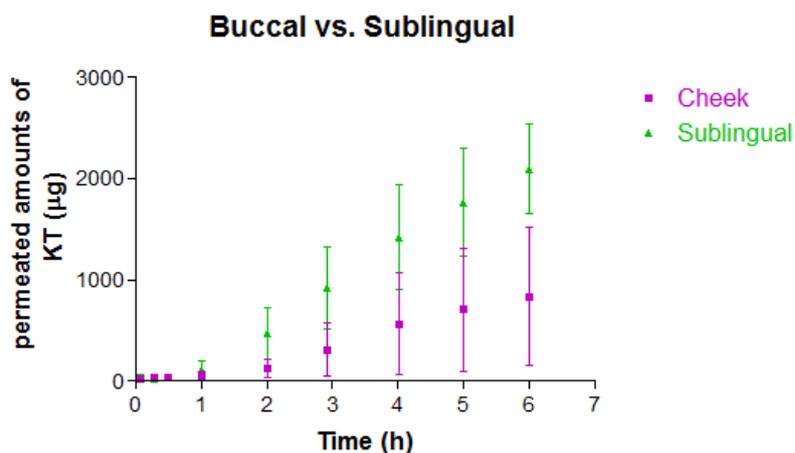


Figura 51. Cantidad acumulada permeada de KT en mucosa bucal y mucosa sublingual.

En este caso, tanto para la mucosa bucal como la sublingual, P2 que es el parámetro relacionado con el proceso de difusión es mayor que P1 que es el parámetro relacionado con el reparto. Este resultado es coherente con el concepto de permeación intrínseca ya que según la Ley de Fick la difusión se da en función del gradiente de concentración que en este caso es máximo; siendo la fuerza directriz de la permeación la difusión frente al reparto y por eso P2 es mayor que P1. Los valores de P2 en ambas membranas son similares corroborando que el proceso de difusión es el principal independientemente del tipo de membrana.

Teniendo en cuenta el aclaramiento plasmático en humanos (34,3 mL/min) (Cordero J.A, 1997) la superficie teórica de aplicación en mejilla y sublingual (50.2 y 26.5 cm<sup>2</sup>, respectivamente) (Patel V.F. 2011), se predijeron las concentraciones plasmáticas que alcanzaría el KT en una administración bucal y sublingual en humanos.

Tabla 18. Parámetros biofarmacéuticos del KT en mucosas bucal y sublingual en el estudio de permeación intrínseca del KT. Expresado como la mediana de los valores (mínimo-máximo);  
<sup>a</sup>= p<0,05.

PARÁMETRO	BUCAL	SUBLINGUAL
J ( $\mu\text{g/h}$ ) <sup>a</sup>	83.58 (12.15-315.80)	362.30 (271.90-508.10)
T <sub>L</sub> (h)	1.21 ((-0.99)-2.86)	0.32 ((-2.57)-2.76)
K <sub>p</sub> ( $\text{cm}^*\text{h}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$3.67*10^{-4}$ ( $0.53*10^{-4}$ - $13.87*10^{-4}$ )	$15.92*10^{-4}$ ( $11.94*10^{-4}$ - $22.32*10^{-4}$ )
P1 (cm)	$0.39*10^{-3}$ (( $-8.32*10^{-3}$ ) - $6.29*10^{-3}$ )	$4.28*10^{-3}$ (( $-18.43*10^{-3}$ ) - $26.37*10^{-3}$ )
P2 ( $\text{h}^{-1}$ )	$5.84*10^{-2}$ (( $-16.67*10^{-2}$ ) - $13.81*10^{-2}$ )	$6.04*10^{-2}$ (( $-6.48*10^{-2}$ ) - $52.10*10^{-2}$ )

Las concentraciones plasmáticas (tabla 19) que se alcanzarían en el estado de equilibrio estacionario (*C<sub>ss</sub>*) tras la administración en la mejilla en humanos quedarían dentro del rango de concentraciones terapéuticas (0.3 – 5.0  $\mu\text{g/ml}$ ). Sin embargo, tras una administración sublingual de una solución saturada de Ketorolaco las concentraciones plasmáticas que se alcanzarían excederían las concentraciones terapéuticas.

Tabla 19. Concentraciones plasmáticas predichas de KT tras una administración transmucosa de la solución de KT.

	<i>C<sub>ss</sub></i>
<b>Bucal</b>	3.19 ± 1.0 µg/ml
<b>Sublingual</b>	7.29 ± 1.6 µg/ml

Todo ello indica que el KT tiene una buena capacidad de permeación por sí mismo. No obstante, la administración de una solución en la cavidad bucal no es práctico puesto que el tiempo de residencia es muy corto de tal forma que lo que se busca es aumentar el tiempo de contacto del fármaco con la mucosa a través de polímeros mucoadhesivos. De esta manera se podrían modular las concentraciones plasmáticas en el estado de equilibrio estacionario para que quedaran dentro del rango terapéutico. En el caso de la mucosa bucal mantenerlas dentro del rango terapéutico y en el caso de la mucosa sublingual disminuir el flujo para evitar una posible toxicidad sistémica y que *C<sub>ss</sub>* esté dentro del intervalo descrito anteriormente.

Se seleccionaron los geles de carbopol y carboximetilcelulosa por presentar propiedades mucoadesivas. Los resultados de la permeación en mucosas bucal y sublingual de dichos geles mucoadhesivos se presentan a continuación.

### ***Formulaciones mucoadhesivas***

#### Carboximetilcelulosa sódica

Como se muestra en la gráfica de la figura 52, y era de esperar, las cantidades acumuladas en el compartimento receptor de las células de Franz son mayores en el caso de la permeación a través de mucosa sublingual que a través de la mucosa bucal.

La cantidad de Ketorolaco Trometamina permeada a las 5 horas en mucosa oral es de 465,66  $\mu\text{g}$  y en mucosa sublingual de 794,86  $\mu\text{g}$  (figura 52). Por tanto, la mucosa sublingual ofrece menor resistencia a la permeación resultando en una mayor permeabilidad del Ketorolaco Trometamina (Galey et al., 1976).

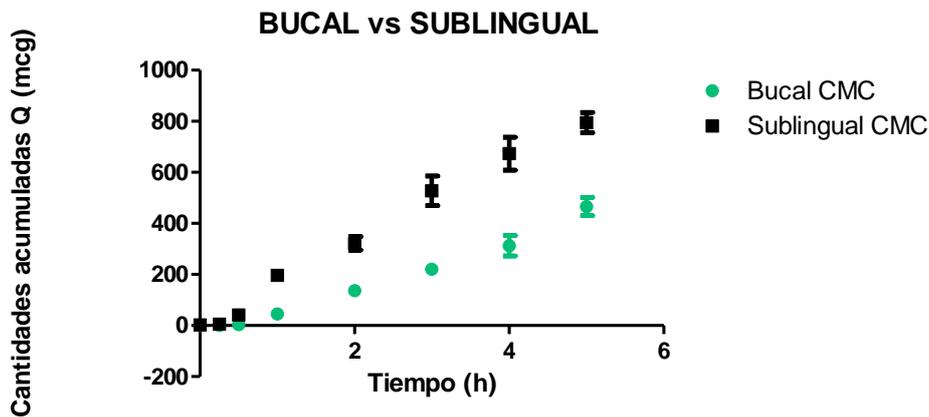


Figura 52. Cantidades acumuladas de Ketorolaco Trometamina del hidrogel de CMCNa permeadas en mucosa bucal y sublingual de cerdo a diferentes tiempos.

Los resultados de los parámetros de permeación del KT en geles de CMCNa a través de la mucosa se recogen en la tabla 20. El flujo obtenido en el caso de la mucosa bucal es del mismo orden de magnitud que en el caso de la permeación intrínseca.

La vía sublingual presenta un flujo ( $J$ ) y una constante de permeación ( $KP$ ) mayor a la de la mucosa bucal. En cuanto al tiempo de latencia ( $TL$ ), en mucosa bucal se necesitan aproximadamente 28 minutos (0,477h) para empezar a observar cantidad de Ketorolaco Trometamina en el compartimento receptor, en cambio en la vía sublingual el tiempo de latencia es 0h, por lo que se detecta KT en el compartimento receptor de forma inmediata.

Tabla 20: Parámetros Biofarmacéuticos del gel con CMCNa como mucoadhesivo

	Bucal		Sublingual			
	Minimo	Mediana	Maximo	Mediana	Minimo	Maximo
<b>J (µg/h)</b>	88,355	82,410	94,300	136,050	127,300	144,800
<b>TL (h)</b>	0,477	0,441	0,514	0	0	0
<b>Kp (cm*h-1)</b>	0,0069	0,0064	0,0073	0,0106	0,0099	0,0113

La mucosa bucal retiene en su estructura casi 4 veces más KT que la mucosa sublingual, 4008,41 µg/cm<sup>2</sup>/g de mucosa bucal respecto a los 1152,31 µg/cm<sup>2</sup>/g de mucosa sublingual (tabla 21). Esto probablemente sea debido a la diferencia de espesor de las mucosas. El espesor varía de unos pocos 100 µm para la mucosa sublingual a 500 µm para la mucosa oral (Rathbone, et al. 2015).

Tabla 21: Valores de cantidad de KT extraído de mucosa bucal y sublingual de cerdo para el HG-CMC.

	Bucal			Sublingual		
	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max
<b>Extracciones</b>						
(µg/cm <sup>2</sup> /g)	4008,41	2983,92	4584,51	1152,31	910,89	1396,16

La Cee terapéutica está entre 0.3 y 5 µg/ml (Cordera et al., 1977). Partiendo de que la superficie de la mucosa bucal es de unos 50 cm<sup>2</sup> y la de la mucosa sublingual de 26,5 cm<sup>2</sup> (Galey et al., 1976), a pesar de tener una mayor flujo (J) la mucosa sublingual, se observa que las concentraciones predichas en el estado de equilibrio estacionario son mayores en la mucosa bucal debido a que la superficie de aplicación del gel es

prácticamente el doble en la mucosa bucal que en la sublingual (tabla 22). Pero ambas se encontrarían dentro del rango terapéutico; por lo que el mucoadhesivo de Carboximetilcelulosa sódica 4% y Ketorolaco Trometamina 2% sería una formulación apta para ser administrada por vía bucal y sublingual y tener efectos terapéuticos sistémicos.

Tabla 22. Concentraciones de KT en estado de equilibrio estacionario que se alcanzarían a aplicar el gel de CMCNa

	<b>Bucal</b>			<b>Sublingual</b>		
	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max
<b>Cee (µg/ml)</b>	3,37	3,14	3,59	2,74	2,91	2,56

La figura 53 muestra la permeación del KT desw de la formulación gel de Carbopol a través de las mucosas bucal y sublingual. De nuevo, se observa como las cantidades acumuladas de Ketorolaco Trometamina en el compartimento receptor de las células de Franz son mucho más mayores a través de la mucosa sublingual que a través de la mucosa bucal.

A las 5 horas de la permeación a través de mucosa bucal se consigue una cantidad acumulada de 40,365 µg de KT, y mediante la mucosa sublingual una cantidad mucho mayor de 1069,064 µg.

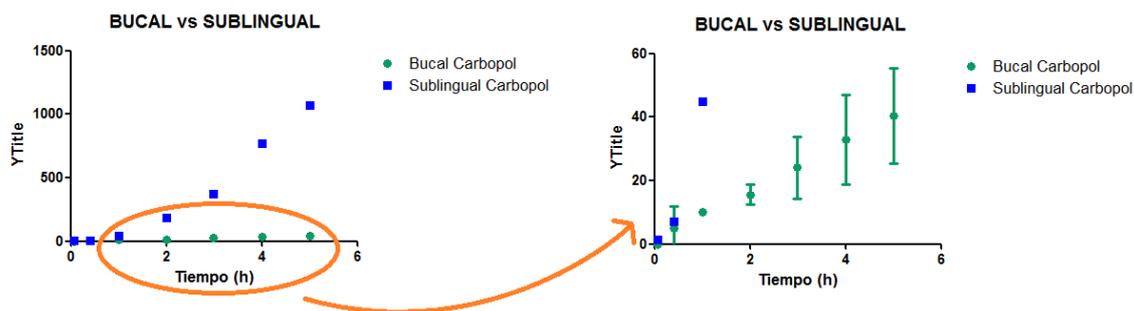


Figura 53. Cantidades acumuladas de KT permeadas en mucosa bucal y sublingual de cerdo a diferentes tiempos para el mucoadhesivo de Carbopol.

La tabla 23 recoge los valores de los parámetros biofarmacéuticos calculados para el gel de Carbopol. El cual presenta una constante de permeación ( $K_p$ ) casi 30 veces mayor en mucosa sublingual respecto la bucal. La misma proporción se observa con el parámetro del flujo ( $J$ ), donde en mucosa bucal es de  $9,459 \mu\text{g/h}$  y en mucosa sublingual es de  $273,500 \mu\text{g/h}$ . Respecto al tiempo de latencia  $T_L$ , en mucosa bucal se necesitan unos 27 minutos ( $0.457 \text{ h}$ ) para empezar a detectar KT en el fluido receptor, en cambio en mucosa sublingual el  $T_L$  se considera cero horas.

Tabla 23: Parámetros Biofarmacéuticos del gel con Carbopol como mucoadhesivo

	Bucal			Sublingual		
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Max	Min
<b>J (<math>\mu\text{g/h}</math>)</b>	9,459	6,367	12,550	273,500	274,950	258,482
<b><math>T_L</math> (h)</b>	0,457	0,350	0,564	NA	NA	NA
<b><math>K_p</math> (<math>\text{cm}^*\text{h}^{-1}</math>)</b>	0,00073	0,00049	0,00098	0,02137	0,02148	0,02019

NA= no aplica, se han obtenido valores de tiempo negativos, debido a un artefacto matemático porque la pendiente poco inclinada lo que se traduce en una extrapolación en el eje de abscisas ( $T_L$ ) negativo. Se ha considerado cero para calcular el resto de parámetros dependientes de  $T_L$ .

Tabla 24. Valores de la cantidad de KT extraído de mucosa bucal y sublingual de cerdo para el gel Carbopol en las mucosas bucal y sublingual.

	Bucal			Sublingual		
	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max
<b>Extracciones</b> ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{g}$ )	7548,18	5904,17	9192,19	25095,77	20782,10	29409,44

La mucosa sublingual retiene 3 veces más Ketorolaco que la mucosa bucal (tabla 24). En el caso del gel Carbopol otros factores independientes al grosor de la mucosa parecen influir en la cantidad de fármaco retenido. Si se comparan ambos geles, la cantidad retenida en la mucosa oral desde el gel Carbopol es prácticamente el doble que desde el gel CMCNa y más de 20 veces superior la cantidad de fármaco retenido en la mucosa sublingual desde el gel carbopol que desde el gel CMC.

La concentración de Ketorolaco Trometamina en estado de equilibrio estacionario es mayor en mucosa sublingual que en mucosa bucal en el gel Carbopol (tabla 25). Esto es porque el flujo (J) en mucosa sublingual es 30 veces más grande, por eso, aún y disponiendo de una superficie menor respecto a la bucal, ( $C_{ss} = J \cdot S / (Cl_p \cdot A)$ ) al haber tanta diferencia entre los flujos, la vía sublingual acaba teniendo una concentración en equilibrio estacionario mayor. Partiendo de que la concentración en equilibrio estacionario terapéutica debe de encontrarse entre el rango 0,3 – 5,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , el mucoadhesivo de Carbopol podría ser apto para ser administrado a través de mucosa bucal, en cambio la vía sublingual aportaría concentraciones por encima del rango terapéutico. Por lo tanto, se desaconseja administrar esta formulación por la vía sublingual puesto que se obtendrían concentraciones plasmáticas supra-terapéuticas que podrían dar lugar a efectos adversos, restringiendo el uso de la formulación para la vía bucal.

Tabla 25. Concentraciones de Ketorolaco en estado de equilibrio estacionario que se alcanzarían a partir del mucoadhesivo de Carbopol.

	Bucal			Sublingual		
	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max
<b>C<sub>ee</sub></b> (µg/ml)	0,36	0,24	0,48	5,50	5,20	5,53

Se observa como la mucosa sublingual ofrece valores de parámetros Biofarmacéuticos mayores que los que nos ofrece la mucosa bucal, un mayor flujo (J) y por ende una mayor constante de permeación (Kp) y un rápido inicio de la acción terapéutica (T<sub>L</sub>).

#### 4.5.3. Estudio de penetración transcorneal y transescleral

Tal y como se comentó en el apartado 3.6.3., de material y métodos, se realizó un estudio de penetración a través de membrana corneal y escleral de las NPs y el colirio comercial Acular. La figura 54 muestra las cantidades permeadas acumuladas de KT de ambas formulaciones a través de la córnea y la figura 55 a través de la esclera. En ambos casos se observa el tramo lineal de cantidad de KT acumuladas correspondiente al tiempo que corresponde al flujo de penetración, y su valor, al igual que el de resto de parámetros de permeación se encuentra en la tabla 26 para el tejido corneal y en la tabla 27 para el tejido esclerótico.

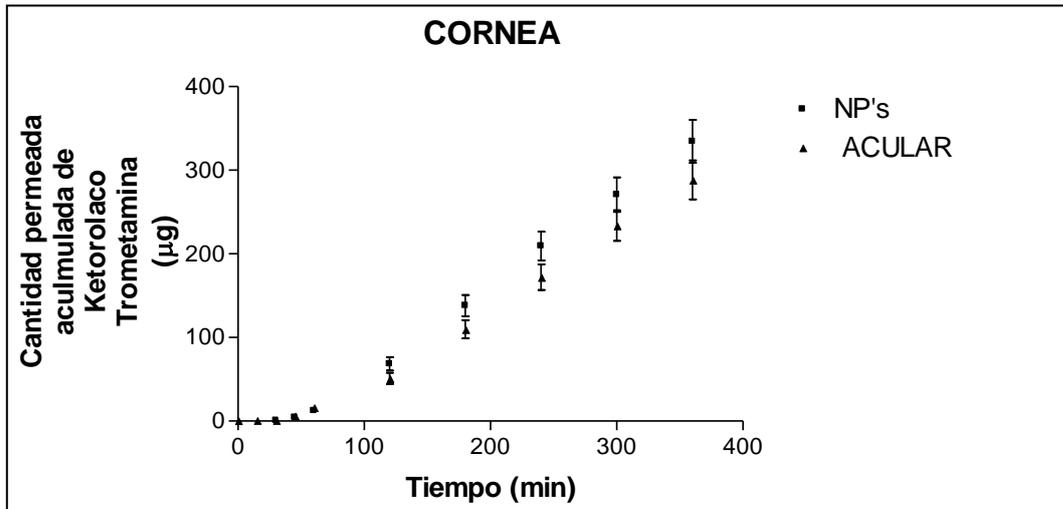


Figura 54. Perfil de penetración transcorneal de KT formulado en NPs o en solución oftálmica (Acular)

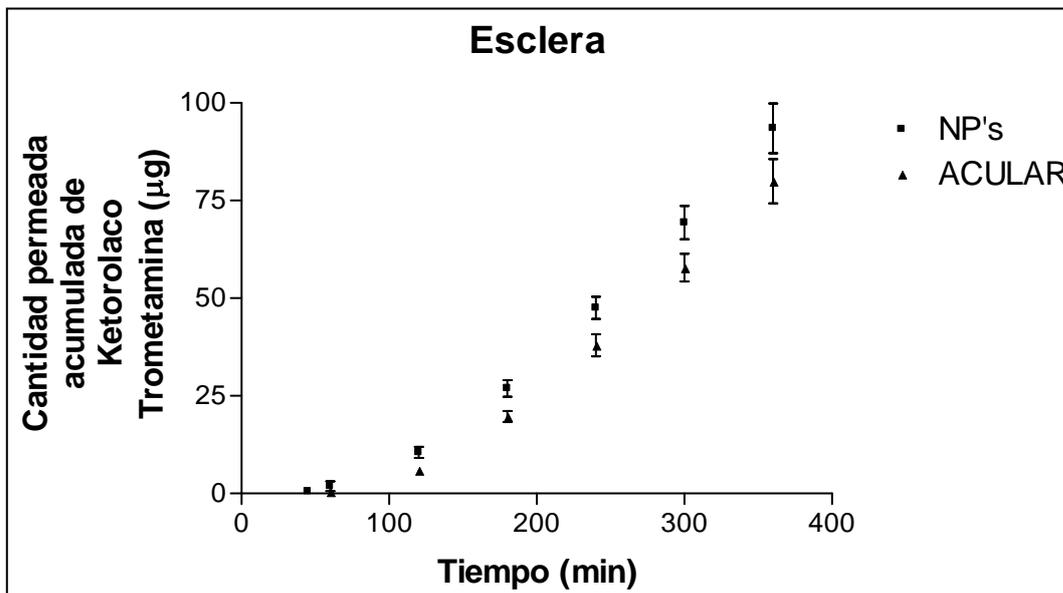


Figura 55. Perfil de penetración transescleral de KT formulado en NPs o en solución oftálmica (Acular)

Tabla 26. Valores de los parámetros biofarmacéuticos en la permeación transcorneal.

Permeación Corneal	Nanoparticulas					Acular					Test de Mann Whitney
	Parámetros	media	sd	mediana	min	Max	media	sd	mediana	min	
J (mcg)	1,11	0,12	1,14	0,96	1,23	1,00	0,11	1,03	0,86	1,11	0,1320
T1 (min)	55,8	8,0	59,6	45,6	62,3	68,7	8,4	67,1	60,2	78,8	0,0260 *
P1 (cm)	0,11550	0,01794	0,11243	0,09715	0,13692	0,12831	0,01992	0,12488	0,10796	0,15209	0,3939
P2 (1/min)	0,00304	0,00048	0,00280	0,00267	0,00366	0,00246	0,00029	0,00249	0,00211	0,00277	0,0260 *
Kp (cm/min)	0,00035	0,00004	0,00036	0,00030	0,00038	0,00031	0,00004	0,00032	0,00027	0,00035	0,1320
Qret (mcg/g/cm2)	295,1	15,8	297,2	276,4	311,5	211,2	53,0	231,7	144,4	257,4	0,0022 **

Tal y como se puede apreciar en la Tabla 26 el valor del flujo transcorneal es muy similar para las NPs y para el Acular, ya que tal y como se ve en la figura 54 las pendientes de ambas rectas son prácticamente paralelas, no presentando diferencias estadísticamente significativas entre ellas. En donde se pueden apreciar diferencias significativas es en el valor del  $T_L$  siendo éste menor para las NPs, es decir, que a través de esta formulación las concentraciones de KT llegan antes al estado estacionario que en el caso del Acular, pudiendo acelerar en este caso el comienzo de la acción terapéutica. La cantidad retenida en el tejido corneal también es mayor en el caso de las NPs, habiendo más fármaco disponible para ejercer su acción antiinflamatoria. Esta diferencia parece ser debida al parámetro P2, que como ya se comentó anteriormente, es el parámetro relacionado con la difusión. Es decir, las NPs parece ser que incrementan la difusión del KT a través de la córnea. A pesar de observarse diferencias, éstas no son suficientes para verse reflejadas en la constante de permeación, dando lugar a que no se observen diferencias estadísticamente significativas entre ambas formulaciones. En cuanto al parámetro de permeación que gobierna el paso del KT a través de la córnea, se puede concluir que es el reparto entre la formulación y la córnea, ya que el valor de P1 es mayor al valor de P2 en ambas formulaciones.

En cuanto a los resultados obtenidos de la permeación escleral (tabla 27), se puede observar una superioridad de las NPs sobre el Acular, estadísticamente significativa, en el caso del flujo transescleral y  $T_L$ . Es decir que el KT pasa a través de la esclera antes y a más velocidad, cuando se formula en NPs que cuando se administra en solución oftálmica. También en este caso se obtiene una mayor cantidad retenida en el tejido, por lo que es de esperar que la acción terapéutica sea superior al ser administrada en forma de NPs. La superioridad en el flujo transescleral es debida, al igual que en el caso de la córnea, a las diferencias encontradas en el parámetro de difusión P2, en este caso sí suficiente para obtener diferencias en la constante de permeación escleral.

En este caso también se puede observar que el parámetro P1 es superior a P2, por lo que puede concluirse de nuevo que el paso de KT a través del tejido se encuentra gobernado por el proceso de reparto.

Tabla 27. Valores de los parámetros biofarmacéuticos en la permeación transescleral

Permeación Esclera	Nanopartículas					Acular					Test de Mann Whitney	
	Parámetros	media	sd	mediana	min	Max	media	sd	mediana	min	Max	p
J (mcg)	0,67	0,38	0,67	0,45	0,89	0,33	0,17	0,33	0,27	0,39	0,0022	**
Tl (min)	68,0	36,6	68,0	51,4	84,6	126,5	64,3	126,5	112,6	140,4	0,0022	**
P1 (cm)	0,07854	0,04331	0,07854	0,07153	0,08556	0,07777	0,04278	0,07777	0,07221	0,08333	0,8182	
P2 (1/min)	0,00261	0,00140	0,00261	0,00197	0,00324	0,00133	0,00068	0,00133	0,00119	0,00148	0,0022	**
Kp (cm/min)	0,00021	0,00012	0,00021	0,00014	0,00028	0,00010	0,00005	0,00010	0,00009	0,00012	0,0022	**
Qret (mcg/g/cm2)	666,8	229,5	690,4	399,2	910,7	367,2	55,0	396,1	296,6	408,9	0,0260	*

No es de extrañar que la penetración de KT a través de la córnea sea superior al de la esclera, tanto para las NPs como para el colirio, debido a la propia estructura de ambos tejidos, siendo el primero mucho más permeable. El tejido esclerótico es más grueso y está compuesto por un elevado número de fibras de colágeno. Este hecho puede también favorecer la mayor acumulación de KT que se produce en la esclera frente a la córnea, prácticamente el doble. El fármaco aquí acumulado puede ir liberándose de forma paulatina al interior de la cavidad ocular para difundir a través del humor vítreo y humor acuoso.

Se puede concluir, por tanto, que las NPs mejorarían el perfil de absorción *in vivo* en córnea y en esclera, pudiendo dar lugar a una superioridad terapéutica.

### ***Permeación in vivo***

Con el fin de confirmar la ventaja cinética de las NPs respecto a Acular obtenida *in vitro*, se desarrolló un estudio *in vivo*. Para ello se administraron ambos productos a cerdos, tal y como se detalla en la sección 3.6.3. de material y métodos. Este estudio representa una aplicación real del producto, donde a diferencia del estudio *in vitro*, se evalúa el efecto del lagrimeo y del parpadeo en la absorción de KT en el ojo del animal, a partir de las formulaciones, observándose también la intervención conjunta de la capa córnea y esclerótica, antes estudiadas por separado.

Tras un periodo de tiempo de 8 horas, se sacrificaron a los animales y se determinó la cantidad acumulada presente en el humor vítreo y en el humor acuoso mediante HPLC. En este caso no se realizó ninguna cinética, debido a la necesidad de sacrificar a un elevado número de animales para ello.

Los resultados de contenido de KT en ambos fluidos se encuentran recogidos en la tabla 28 y la figura 56. Como puede observarse en ambos casos se obtiene una concentración del mismo rango de magnitud, siendo ligeramente superior en el caso de las NPs. Tras aplicar el test de Mann-Whitney se apreciaron diferencias estadísticamente

significativas entre los distintos valores obtenidos, la tabla 29 muestra el test de comparaciones múltiples realizado.

Tabla 28. Concentración de KT alcanzada en humor vítreo (HV) y humor acuoso (HA) tras su administración en forma de NPs o de solución oftálmica (Acular)

	Ketorolaco (mg/mL)		
	media	sd	n
<b>NP-HA</b>	1,56	0,08	6
<b>NP-HV</b>	1,55	0,07	6
<b>Acular-HA</b>	1,46	0,05	6
<b>Acular-HV</b>	1,44	0,04	6

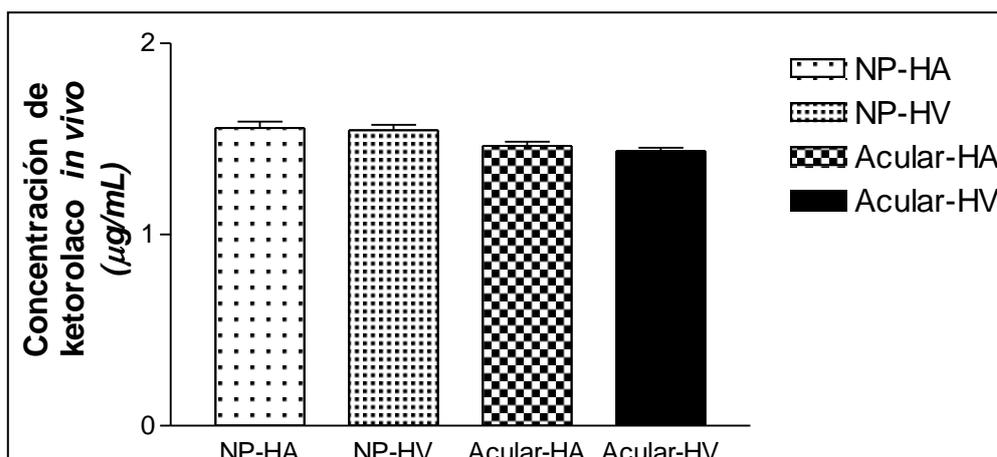


Figura 56. Concentración de KT hallado en el humor vítreo y humor acuoso tras la aplicación de las formulaciones a base de NPs y del colirio Acular®.

Se observan diferencias entre el contenido de KT en el humor vítreo cuando se administra a través de NPs frente al Acular. También hay un aumento significativo en el humor acuoso cuando se administra en forma de NPs frente al contenido de KT en el humor vítreo cuando se administra a partir de Acular.

Dentro de cada formulación, no se observan diferencias en el contenido de fármaco entre humor vítreo y acuoso, por lo que parece ser que la mayor viscosidad del humor vítreo no retrasa de forma significativa la difusión del KT dentro del ojo, por lo que se pueden obtener concentraciones homogéneas de fármaco dentro de todo el globo ocular, pudiendo quedar éste disponible para ejercer su acción en la parte posterior del ojo.

Tabla 29. Concentración de KT alcanzada en humor vítreo (HV) y humor acuoso (HA) tras su administración en forma de NPs o de solución oftálmica (Acular)

Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
NP-HA vs NP-HV	0,01159	0,4575	P > 0.05	-0.08867 to 0.1118
NP-HA vs Acular-HA	0,09288	3,666	P > 0.05	-0.007385 to 0.1931
<b>NP-HA vs Acular-HV</b>	0,1202	4,745	<b>P &lt; 0.05</b>	0.01994 to 0.2205
NP-HV vs Acular-HA	0,08129	3,209	P > 0.05	-0.01897 to 0.1815
<b>NP-HV vs Acular-HV</b>	0,1086	4,288	<b>P &lt; 0.05</b>	0.008352 to 0.2089
Acular-HA vs Acular-HV	0,02733	1,079	P > 0.05	-0.07293 to 0.1276

#### 4.6. ESTUDIOS DE TOLERANCIA OCULAR

Es bien conocida la biocompatibilidad de los polímeros usados en la elaboración de las NPs, tanto el PLGA como el PVA. Aun así, se considera necesaria la evaluación de la tolerancia ocular de los mismos. Clásicamente se han utilizado métodos *in vivo*, concretamente el test de Draize, para llevar a cabo dichos estudios. Como consecuencia un gran número de animales es necesario para llevarlo a cabo. Con el fin de disminuir el uso de animales de experimentación, debido a las consideraciones éticas que esto conlleva, se han desarrollado una serie de métodos alternativos entre los cuales destacan el estudio de HET-CAM.

El HET-CAM ha sido validado como alternativa al test de Draize y es ampliamente utilizado en la evaluación de cosméticos y en tareas de screening. Tal y como se describe en la sección de material y métodos una muestra de formulación de NPs, Acular, solución de KT libre, control positivo y control negativo fueron depositados

sobre la membrana corioalantoidea (figura 57) evaluando la hemorragia, vasoconstricción y coagulación provocada en el huevo de gallina.

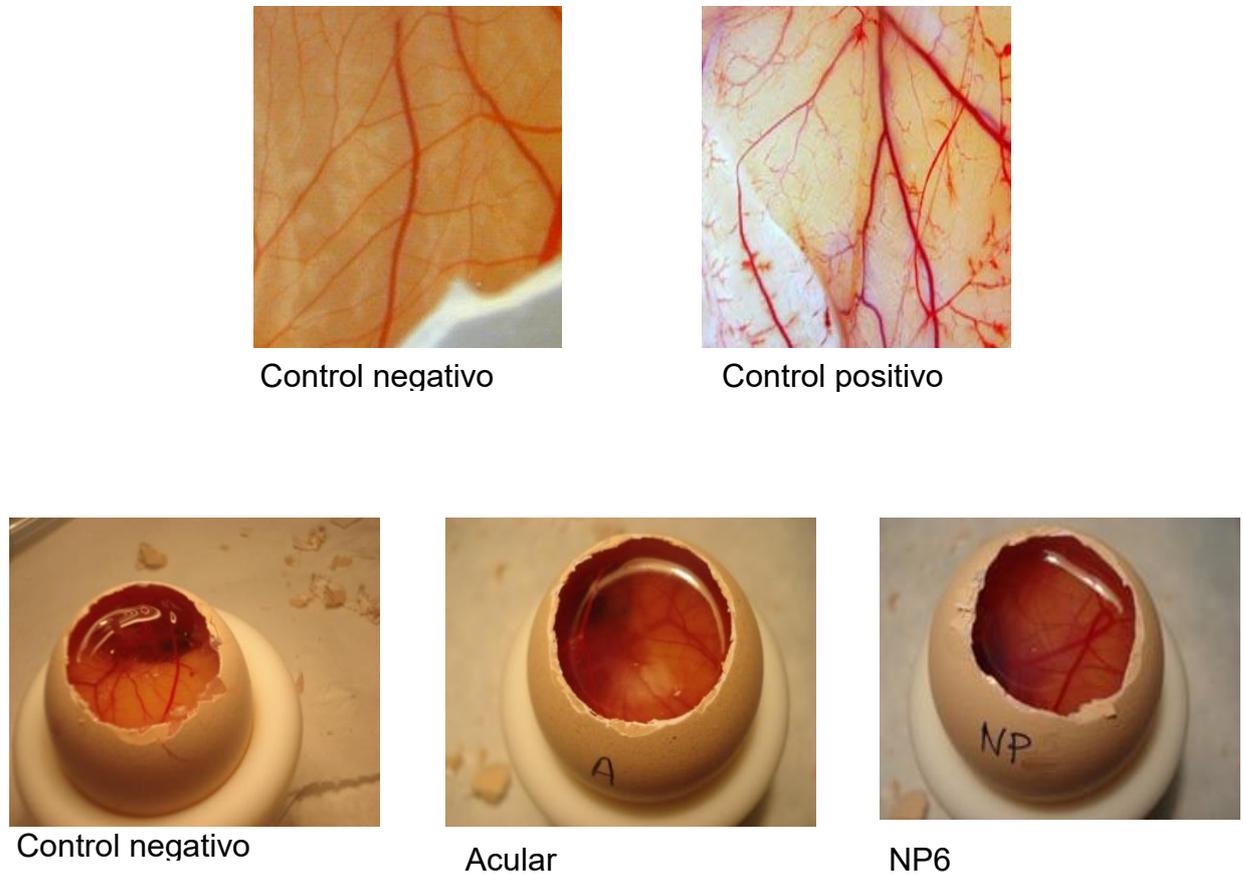


Fig. 57. Imágenes de la membrana corioalantoidea tras la administración de las formulaciones para administración oftálmica, NPs y Acular®. Se incluyen también imágenes del control positivo y control negativo.

## 4.7. ESTUDIOS DE EFICACIA ANTI-INFLAMATORIA

### 4.7.1. Eficacia anti-inflamatoria dérmica *in vivo*

La prueba de actividad anti-inflamatoria se examinó utilizando el modelo de edema de la piel del oído agudo inducido por aplicación tópica con TPA. Se tomó una solución de KT en acetona como referencia de inhibición inflamatoria. Como se muestra en la figura 58, el KT-P407-HG mostró una reducción aparente de la inflamación del 15,4% en comparación con la referencia. Sin embargo, el KT-C940-HG mostró un menor efecto anti-inflamatorio en comparación con la referencia.

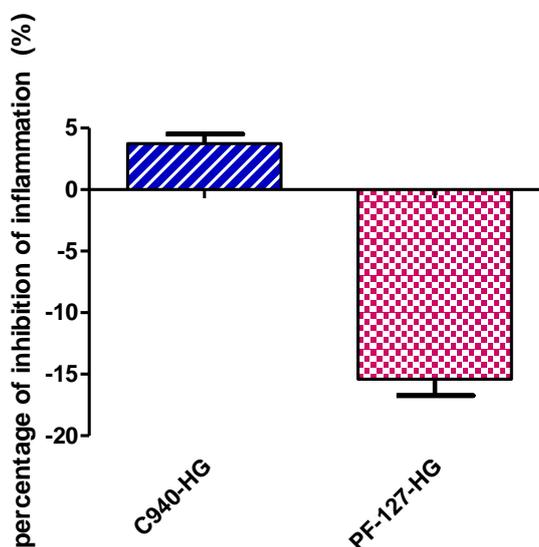


Figura 58. Actividad anti-inflamatoria de las formulaciones de hidrogel probadas, (hidrogel Carbopol® y hidrogel Pluronic®). Los resultados se expresan como el porcentaje de reducción de la inflamación en comparación con la referencia (valores medios  $\pm$  SD).

La notable eficacia anti-inflamatoria del KT-P407-HG reveló que éste aplicado en el oído del ratón posee suficiente capacidad para proporcionar una biodisponibilidad adecuada de KT para alcanzar fácilmente el sitio de acción. Aunque no se encontraron diferencias en la acumulación de piel KT entre formulaciones cuando se añadieron HG a la piel humana en el experimento de absorción percutánea, bajo condiciones *in vivo*, la

eficacia antiinflamatoria tópica de KT-P407-HG reveló una mayor eficacia antiinflamatoria que KT-C940-HG. Estas diferencias observadas entre experimentos *ex vivo* e *in vivo* pueden explicarse por la ausencia de flujo sanguíneo y metabolismo *ex vivo* (Vega et al., 2013).

Además, la piel viable actúa como un depósito local lleno con el fármaco asociado al vehículo para condiciones *in vivo*. Este depósito es parcialmente idéntico al sitio de la acción biológica deseada (Almeida et al., 2012).

### ***Estudio histológico***

El proceso de inflamación atrae células del sistema inmune al tejido afectado, los vasos sanguíneos se expanden y se vuelven más porosos permitiendo que las células abandonen el sistema circulatorio y entren en el tejido dañado.

La figura 59 muestra imágenes del estudio histológico. La inflamación causada por TPA en el oído de los ratones (control positivo) dio como resultado la presencia de células del sistema inmune en los vasos sanguíneos como respuesta a la inflamación (Fig. 59-B). No se observaron células del sistema inmune en el control negativo de la inflamación (figura 59-A), así como en muestras de orejas tratadas con KT-P407-HG y KT-C940-HG (figura 59-C y figura 59 -D, respectivamente).

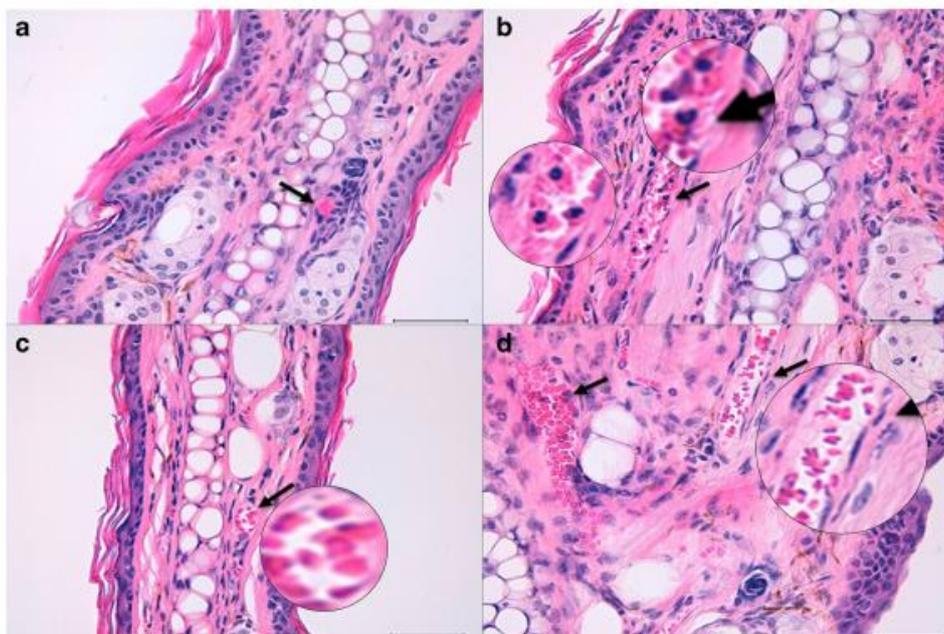


Figura 59. Imágenes histológicas del oído de los ratones. (A) control negativo de la inflamación, (B) control positivo de la inflamación, (C) oído inflamado tratado con KT-P407-HG y (D) oído inflamado tratado con KT-C940-HG.

#### 4.8. PARÁMETROS CUTÁNEOS EXPERIMENTALES

Con el fin de evaluar los cambios potenciales debidos a la formulación, se estudiaron las variaciones en las propiedades de las pieles mediante técnicas biometrológicas. Los parámetros evaluados son la temperatura cutánea, la hidratación del estrato córneo (SCH) y la pérdida transepidermica de agua (TEWL). Estos parámetros son indicativos de un posible efecto irritante o pro-inflamatorio. La medición de TEWL, debido a la difusión pasiva de agua a través de la piel, proporciona información importante sobre la función de barrera cutánea (Mohamed et al. 2014). La pérdida transepidermica de agua es una medida indirecta de la integridad de la función barrera de la piel; un incremento de los valores de TEWL refleja un posible deterioro en la función barrera, de la protección contra la pérdida de agua. El SCH se determina como conductancia que el agua libre proporciona a la superficie de la piel (del Pozo A et al. 2007).

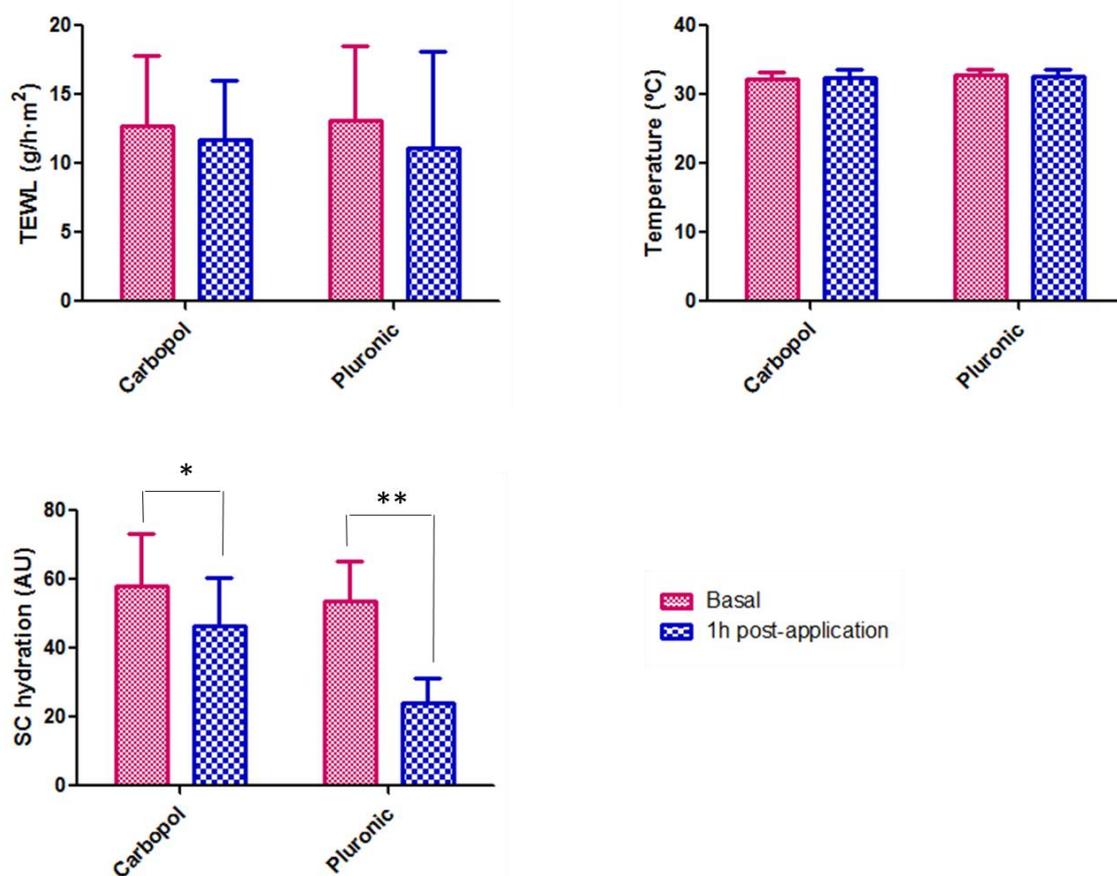


Figura 60. Evolución de los parámetros cutáneos experimentales monitorizados antes de la aplicación de las formulaciones (conteniendo un 2% de KT) y una hora después de la aplicación en la piel de voluntarios sanos. TEWL está expresado en g/h·cm<sup>2</sup>, la temperatura como grados Celsius (°C), y la hidratación como unidades arbitrarias (AU). \*= p < 0.005; \*\*= p < 0.0005.

La aplicación de los HG probados no indujo ninguna irritación visual de la piel y fue bien tolerada. La figura 60 representa las mediciones de los parámetros biomecánicos de la piel después de la aplicación de la formulación. Como se puede observar, no se observaron cambios en la temperatura de la piel para ninguno de los HG. En particular, el KT-P407-HG forma una película visible sobre la piel; En el momento de la aplicación KT-P407-HG es líquido y transparente, pero se gelifica unos minutos después de su aplicación sobre la piel debido a su naturaleza de gelificación dependiendo de la temperatura. Una hora después de la aplicación, el agua se ha evaporado por completo y se puede ver que una película delgada y transparente toca la piel.

Se registró una ligera disminución en los valores de TEWL para ambos HG, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con los valores basales. Sin embargo, el SCH sufrió una leve pero estadísticamente significativa disminución después de la aplicación de KT-C940-HG ( $p < 0,05$ ). Esta caída fue aún más pronunciada para KT-P407-HG.

Se realizaron estudios de swelling y degradación en condiciones cutáneas, PBS pH 5,5 y 32°C. Estas condiciones difieren de las de los hidrogeles para uso interno, mientras que nuestros hidrogeles se prepararon para la aplicación dérmica (Yin L 2007, Sarker A, 2014, Malik NS 2017, García-Astrain C 2016 y Sarker A 2014). Así, se consideró la temperatura y el pH de la piel. Debe observarse que aquellos hidrogeles para uso interno estarán rodeados por fluidos fisiológicos en contraste con los hidrogeles dérmicos que formarán una película sobre la piel. Por lo tanto, un lado estará en contacto con el estrato córneo mientras que el otro lado estará en contacto con la atmósfera. La aplicación de los hidrogeles en la piel sana de los voluntarios mostró una disminución en la hidratación del estrato córneo una hora después de la aplicación. Entonces, parece que los hidrogeles absorben el fluido de la pérdida de agua transepidérmica en el lado que mira hacia el SC, pero al mismo tiempo se ha desecado por el aire en el lado orientado hacia la atmósfera que conduce a la formación de una película que cubre la piel.

Se sabe que la función de barrera cutánea reside en el SC. Pluronic P407 es ampliamente utilizado en medicina y biotecnología como tensioactivo biocompatible. Así, basándonos en los superiores resultados de la eficacia anti-inflamatoria del KT-P407-HG, hipotizamos una permeación más alta a través de la piel mediante la modificación de SC disminuyendo el orden de los lípidos (Shin et al. 2001, Erukova et al. 2000, Demina et al. 2005). Podría explicar el ligero cambio en TEWL (Figura 60), que fue evidente en los valores de SCH (Figura 60). Además, los HG se forman por absorción de agua; el polímero absorbe agua y se hincha formando una estructura de red tridimensional. Por lo tanto, la disminución de SCH para KT-C940-HG podría ser debida a la captación de agua de la superficie de la piel por parte del Carbopol.



## **5. CONCLUSIONES**



Two different formulations for dermal application and two other formulations with mucoadhesive properties were prepared for topical application. The semi-solid systems obtained were stable hydrogels formulations which showed suitable physical properties for topical or dermal application. The pH of the mucoadhesive systems is similar to the physiological pH, therefore, the topical administration of the gels, should not damage the mucous membranes.

The *in vitro* release studies performed on polymeric hydrogels, demonstrate a fast release profile of ketorolac tromethamine.

Although PF-127-HG presented slightly higher permeated amounts, and C940-HG showed slighted retained amounts in the skin, the permeation studies showed that KT penetrates skin in similar amounts from both formulations. However, the C940-HG diffused to deeper layers of the skin. Taking into account a human plasma clearance of 34.3 ml/min and an application area of 10 cm<sup>2</sup>, the predicted plasma concentration at the steady state would be below the plasma therapeutic range. Thus, the formulations are suitable for local therapy without systemic side effects.

Cutaneous parameters showed no statistically significant differences in the skin's barrier function, such as temperature and TEWL after the application of C940-Hg and PF-127-HG. Additionally, hydrogels did not cause any irritant effects, and were well tolerated. These data suggest that the association of ketorolac tromethamine in hydrogels may be suitable for topical medication for local anti-inflammatory therapy and has potential for development. Compared to the reference KT solution, a decrease in the degree of inflammation in the ear mice was observed when applying the hydrogels made with Pluronic® but not for the carbomer-based one.

Regarding mucoadhesive gels for mucosal delivery, Carbopol and Sodium Carboxymethylcellulose (CMCNa) were tested. Results show that CMCNa provides favorable biopharmaceutical parameters and the predicted plasma levels achieved would be within the therapeutic concentration range for both routes. Carbopol mucoadhesive gel is suitable for buccal transmucosal delivery; however, it would be required to reformulate it at a lower dose for sublingual transmucosal. Thus, the mucoadhesive

systems developed for transmucosal delivery might be considered as an alternative route to the oral, with systemic action but diminishing the first-pass hepatic metabolism and enzymatic degradation.

Polymeric PLGA-PLA Nps was successfully developed. They have a particle size around 100 nm and a low polydispersion index and a round-shape structure. They were found to be stable in short-term conditions. NP release was rapid, but delayed compared with Acular eye drops, following in both cases a Weibull kinetic release equation, with a complex release associated mechanism. Nanoparticulate system also exhibited a higher transcorneal and transescleral flux and a lower lag-time, compared with Acular, potentially improving the therapeutic index. KT concentrations in vitreous and aqueous humor were similar for both formulations. KT-NPs had an excellent eye compatibility based on HET-CAM assay. All these characteristics made KT-NPs as a good alternative to commercial eye drops.

## **BIBLIOGRAFÍA**



A

Abrego G., Alvarado HL., Egea MA., Gonzalez-Mira E., Calpena AC., Garcia ML. Design of nanosuspensions and freeze-dried PLGA nanoparticles as a novel approach for ophthalmic delivery of pranoprofen. *J. Pharm. Sci.* 2014;103(10):3153-3164.

Abrego G., Alvarado H., Souto EB., Guevara B., Halbaut L., Garduño M.L., Garcia, M.L., Calpena, A.C. Biopharmaceutical profile of hydrogels containing pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles for skin administration: In vitro, ex vivo and in vivo characterization. *Int. J. Pharm.* 2016;501:350–361.

ACOFARMA: Ficha de información técnica de Carboximetilcelulosa sódica Acofarma distribución,2016. Monografía en Internet. Terrassa (Barcelona). Acceso 24 enero de 2016 Disponible en: <http://www.acofarma.com/>

Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J. Adv. Res.* 2015;6(2):105-21.

Ahmed I., Ponery AS., Nur EKA., Kamal J., Meshel AS., Sheetz MP., Schindler M. and Meiners S. Morphology, cytoskeletal organization, and myosin dynamics of mouse embryonic fibroblasts cultured on nanofibrillar surfaces. *Mol. Cell. Biochem.* 2007;301(1-2):241-249.

Al-Khamis K., Davis SS., Hadgraft J. Microviscosity and drug release from topical. Gel formulations. *Pharm. Res.* 1986;3(4):214-217.

Allan G. Azone®. In: Smith EW, Maibach HI, editors. *Percutaneous Penetration Enhancers* FL. USA: CRC Press, Boca Raton. 1995.

Almeida IF., Fernandes AR., Fernandes L., Pena Ferreira MR., Costa PC., Bahia MF. Moisturizing Effect of Oleogel/Hydrogel Mixtures. *Pharm Dev Technol.* 13(6):487–94. 2008.

Alonso C., Ramón E., Lozano C., Parra JL., Torres JL., Coderch L. Percutaneous absorption of flavan-3-ol conjugates from plant procyanidins. *Drugs Exp. Clin. Res.* 2004;30:1-10.

Alonso C., Martí M., Martínez V., Rubio L., Parra JL., Coderch L. Antioxidant cosmeto-textiles: skin assessment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013;84:192–199.

Alonso C., Ramón E., Lozano C., Parra JL., Torres JL., Coderech L. Antioxidative effects and percutaneous absorption of five polyphenols. *Free radical biology & medicine* 2014;75:149-155.

Alonso C., Lucas R., Barba C., Marti M., Rubio L., Comelles F., Morales JC., Coderch L., Parra JL. Skin delivery of antioxidant surfactants based on gallic acid and hydroxytyrosol. *J.Pharm.Pharmacol.* 2015; 67(7):900-908.

Alsarra IA., Alanazi FK., Mahrous GM., Abdel Rahman AA., Al Hezaimi KA. Clinical evaluation of novel buccoadhesive film containing ketorolac in dental and post-oral surgery pain management. *Pharmazie.* 2007;62(10):773-778.

Alur HH, Johnston TP, Mitra AK. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.* New York: Marcel Dekker Inc; 2001.

Amores Grazón S. Estudio de la permeación de una serie de betabloqueantes a través de mucosa de cerdo. Tesis Doctoral. Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona; 2012.

Amores S., Amores S., Domenech J., Colom H., Calpena AC., Clares B., Gimeno A, Lauroba J. An improved cryopreservation method for porcine buccal mucosa in ex vivo drug permeation studies using Franz diffusion cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014;18;60:49-54.

Anigbogu ANC., Williams AC., Barry BW., Edwards HGM. Fourier transform Raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethyl sulfoxide and human stratum corneum. *Int. J. Pharm.* 1995;125:265-282.

Araujo de DR., da Silva DC., Barbosa RM., Franz-Montan M., Cereda CM., Padula C., Santi P. de Paula E. Strategies for delivering local anesthetics to the skin: focus on liposomes, solid lipid nanoparticles, hydrogels and patches. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2013;10(11):1551-63.

Ashton P., Walters KA., Brain KR., Hadgraft J. Surfactant effects in percutaneous absorption: II. Effects on protein and lipid structure of stratum corneum. *Int. J. Pharm.* 1992;87:265-269.

Aungst BJ. Fatty acid as skin permeation enhancers. In: Smith EW, Maibach HI, editors. *Percutaneous Penetration Enhancers* FL: CRC Press, Boca Raton; 1995. p. 277.

Aungst BJ., Blake JA., Rogers NJ., Hussain MA. Transdermal oxymorphone formulation development and methods for evaluating flux and lag times for two skin permeation-enhancing vehicles. *J. Pharm. Sci.* 1990;79(12):1072-1076.

## B

Baranda L., González-Amaro R., Torres-Alvarez B., Alvarez C., Ramírez V. Correlation between pH and irritant effect of cleansers marketed for dry skin. *Int. J. Dermatol.* 2002;41:494-499.

Barry BW. Action of skin penetration enhancers-the Lipid Protein Partitioning theory. *Int. J. Cosmet. Sci.* 1988;10(6):281-293.

Barry BW. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Adv. Drug Del. Rev.* 2002;54(suppl.1):S31-S40.

Barry BW. Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement. *J. Control. Rel.* 1991;15(3):237-248.

Barry BW. Methods for studying percutaneous absorption A: Barry BW, editor. *Dermatological formulation* New York: Marcel Dekker; 1983. p. 234-295.

Barry BW. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J. Control. Rel.* 1987;6:85-97.

Beastall JC., Hadgraft J., Washington C. Mechanism of action of Azone as a percutaneous penetration enhancer: Lipid bilayer fluidity and transition temperature effects. *Int. J. Pharm.* 1988;43(3):207-213.

Beiro R., Vidal MC., Vidal I., Orgeira J., Papel de los bioadhesivos en el tratamiento tópico de las enfermedades orales, *Revista de la SEMG* N° 50, Enero 2003, p. 486.

Bell CL., Peppas NA. Modulation of drug permeation through interpolymer complexed hydrogels for drug delivery applications. *J. Control. Release.* 1996;39:201-207.

Bernal Provenza N., Calpena AC., Mallandrich M., Ruiz A., Clares B. Development, Physical-Chemical Stability, and Release Studies of Four Alcohol-Free Spironolactone Suspensions for Use in Pediatrics. *Dissolution Technologies*. 2014;21(1):19-30.

Berner B., Juang RH., Mazzenga GC. Ethanol and water sorption into stratum corneum and model systems. *J. Pharm. Sci.* 1989;78(6):472-476.

Bettini R., Colombo P., Peppas N. A. Solubility effects on drug transport through pH-sensitive, swelling-controlled release systems: transport of theophylline and metoclopramide monohydrochloride. *J. Control. Rel.* 1995;37:105-111.

Bhati R., Madan RJ. A detailed review on oral mucosal drug delivery system. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2012;3(1):659-681.

Bhatia KS, Singh J. Percutaneous absorption of LHRH through porcine skin: effect of N-methyl 2-pyrrolidone and isopropyl myristate. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1997;23:1111-1114.

Bilati U., Allémann E., Doelker E. Sonication Parameters for the Preparation of Biodegradable Nanocapsules of Controlled Size by the Double Emulsion Method. *Pharm. Dev. Technol.* 2003;8(1):1-9.

Bonina FP., Montenegro L, Micali G., West DP., Palicharla P., Koch RL. In vitro percutaneous absorption evaluation of phenobarbital through hairless mouse, adult and premature human skin. *Int. J. Pharm.* 1993;98(1-3):93-99.

Bouwstra JA., de Vries MA., Gooris GS., Bras W., Brussee J., Ponc M. Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier. *J. Control. Rel.* 1991;15:209-220.

Boyce S., Chan C., Gordon R., Li C., Rodger IW., Webb KJ., Rupnick NMJ., Hill RG. A selective inhibition of cyclo-oxygenase-2 effects antinociception but not gastric acid secretion in rats. *Neuropharmacology*. 1994; 33:1609-1611.

Buckley MT., Brogden RN. Ketorolac: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential. *Drugs* 1990;39:86-109.

Burkman RT. The transdermal contraceptive patch: a new approach to hormonal contraception. *Int. J. Fertility Women's Med.* 2002;47(2):69-76.

C

Calpena AC., Lauroba J., Sunol M., Obach R., Domenech J. Effect of d-Limonene on the transdermal permeation of Nifedipine and Domperidone. *Int. J. Pharm.* 1994;103:179-86.

Capdevila JH., Falck JR., Harris RC. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J. Lipid Res.* 2000;41:163-181.

Carelli V., Di Colo G., Nannipieri E., Serafini MF. Enhancement effects in the permeation of alprazolam through hairless mouse skin. *Int. J. Pharm.* 1992;88:89-97.

Celia C., Trapasso E., Cosco D., Paolino D., Fresta M. Turbiscan® Lab Expert analysis of the stability of ethosomes and ultradeformable liposomes Containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2009;72:155-160.

Cevc G., Blume G., Schätzlein A., Gebauer D., Paul A. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1996;18(3):349-378.

Choi MJ., Maibach HI. Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2005;18(5):209-219.

Chrai SS., Makoid MC., Eriksen SP., Robinson JR. Drop size and initial dosing frequency problems of topically applied ophthalmic drugs, *J. Pharm. Sci.*, 1974; 63: 333-338.

Clares B., Gallardo V., Medina MM., Ruiz MA. Multilamellar liposomes of triamcinolone acetonide: preparation, stability, and characterization. *J. Liposome Res.* 2009;19(3):197-206.

Clarys P., Clijnsen R., Taeymans J. and Barel AO. Hydration measurements of the stratum corneum: comparison between the capacitance method (digital version of the Corneometer CM 825(R)) and the impedance method (Skicon-200EX(R)). *Skin Res. Technol.* 2012;18(3):316-23.

Cordero JA., Alarcon L., Escribano E., Obach R., Domenech J. A comparative study of the transdermal penetration of a series of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J. Pharm. Sci.* 1997;86(4):503-508.

Cordero JA., et.al. A comparative study of the transdermal penetration of a series of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J.Pharm. Sci.* 1997;86(4):503-508.

Cousido MC., Tomas Carmona I., Garcia-Caballero L., Limeres J., Alvarez M., Diz P. In vivo substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. *Clin. Oral Investig.* 2010;14(4):397-402.

## D

Danhier F., Ansorena E., Silva JM., Coco R., Le Breton A, Pr at V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Control. Rel.* 2012;161(2):505-522.

Demina T., Grozdova I., Krylova O., Zhirnov A., Istratov V., Frey H., et al. Relationship between the structure of amphiphilic copolymers and their ability to disturb lipid bilayers. *Biochemistry.* 2005;44(10):4042–54.

Demircan S., Sayin F., Basci NE.,  nl  N., Kir S. Determination of ketorolac tromethamine in human eye samples by HPLC with photo diode-array detection. *Chromatographia.* 2007;66(Suppl. 1):S135-S139.

Diez-Sales O., Watkinson AC., Herraez-Dominguez M., Javaloyes C., Hadgraft J. A mechanistic investigation of the in vitro human skin permeation enhancing effect of Azone®. *Int. J. Pharm.* 1996;129(1):33-40.

Dimitriu S., Popa V. *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded.* Marcel Dekker, Inc. 2nd ed. Canada. 2002. p.383.

Domènech Berrozpe J. Formas farmacéuticas de liberación transdérmica. XVII Symposium AEFI, II Symposium AEPAR. 1996. 31-37.

Domer F. Characterization of the analgesic activity of ketorolac in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1990;177:127-135.

Domínguez-Villegas V., Clares-Naveros B., García-López ML. Calpena-Campmany, AC., Bustos-Zaga P., Garduño-Ramírez ML. Development and characterization of two nanostructured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia platycarpa*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014;116:183–192.

Dong L., Liu C., Cun D., Fang L. The effect of rheological behavior and microstructure of the emulgels on the release and permeation profiles of Terpinen-4-ol. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2015;8:140-150.

dos Santos KC., da Silva MFG., Pereira-Filho ER., Fernandes JB., Polikarpov I., Forim MR. Polymeric nanoparticles loaded with the 3,5,3'-triiodothyroacetic acid (Triac), a thyroid hormone: Factorial design, characterization, and release kinetics. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2012;5(1):37-48.

du Plessis J., Pugh WJ., Judefeind A., Hadgraft J. Physico-chemical determinants of dermal drug delivery: effects of the number and substitution pattern of polar groups. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002;16(3):107-112.

Dubey V., Mishra D., Asthana A., Jain NK. Transdermal delivery of a pineal hormone: melatonin via elastic liposomes. *Biomaterials*. 2006;27(18):3191-3496.

Dubey V., Mishra D., Nahar M., Jain V., Jain NK. Enhanced transdermal delivery of an anti-HIV agent via ethanolic liposomes. *Nanomedicine* 2010;6(4):590-596.

Duchene D. et al. Bioadhesion: a new pharmacotechnical method for improving therapeutic efficiency. *S.T.P.Pharma*. 1989;5(12):830-838.

E

el Gendy AM., Jun HW., Kassem AA. In vitro release studies of flurbiprofen from different topical formulations. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2002;28(7):823-31.

Elia J., Wilson Z., La Porta LS., Algon SA., Prowler ML., Cartwright ST., et al. Methylphenidate transdermal system: clinical applications for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 2011;4(3):311-328.

Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* 1983;80 Suppl:44s-49s.

Elias PM., Cooper ER., Korc A., Brown BE. Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition. *J. Invest. Dermatol.* 1981;76(4):297-301.

El-Setouhy DA., El-Ashmony SM. Ketorolac trometamol topical formulations: release behaviour, physical characterization, skin permeation, efficacy and gastric safety, *J. Pharm. Pharmacol.* 2010;62(1):25-34.

Erjavec V., Pavlica Z., Sentjurc M., Petelin M. In vivo study of liposomes as drug carriers to oral mucosa using EPR oximetry. *Int. J. Pharm.* 2006;307(1):1-8.

Erukova VY., Krylova OO., Antonenko YN., Melik-Nubarov NS. Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer lipid membranes to small solutes including doxorubicin. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000;1468(1-2):73-86.

Escribano E., Calpena AC., Queralt J., Obach R., Domenech J. Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2003;19(4):203-10.

European Commission. Guidelines for in vitro methods to assess percutaneous absorption of cosmetic ingredients. Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers. OECD num. 28, 2004.

F

Feldmann RJ., Maibach HI. Penetration of 14c Hydrocortisone through Normal Skin: the Effect of Stripping and Occlusion. *Arch. Dermatol.* 1965;91:661-666.

Fernández Campos F., Calpena Campmany A.C., Rodríguez Delgado G., López Serrano O., Clares Naveros B. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies. *J. Pharm. Sci.* 2012; 101:3739-3752.

Fleeger CA ed. USP Dictionary of USAN and International Drug Names (33rd ed.). Rockville: USP Convention. 1996.p. 959.

Flo A., Calpena AC., Halbaut L. et al. Melatonin Delivery: Transdermal and Transbuccal Evaluation in Different Vehicles. *Pharm. Res.* 2016;33(7):1615-1627.

Fuhrman Jr LC., Michniak BB., Behl CR., Malick AW. Effect of novel penetration enhancers on the transdermal delivery of hydrocortisone: an in vitro species comparison. *J. Control. Rel.* 1997;45:199-206.

## G

Gabrielii I., Gatenholm P. Preparation and properties of hydrogels based on hemicellulose. *J. Appl. Polym. Sci.* 1998. 69:1661-1667.

Galer BS., Gammaitoni AR., Oleka N., Jensen MP., Argoff CE. Use of the lidocaine patch 5% in reducing intensity of various pain qualities reported by patients with low-back pain. *Curr. Med. Res. Opin.* 2004;20 Suppl 2:S5-12.

Galey WR., Lonsdale HK., Nacht S. The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water. *J. Invest. Dermatol.* 1976;67(6):713-717.

Gao, S., Singh, J. Mechanism of transdermal transport of 5-fluorouracil by terpenes: Carvone, 1,8-cineole and thymol. *Int. J. Pharm.* 1997;154(1):67-77.

Gárete Hernández RA. Cambios en las propiedades Reológicas y en el rendimiento de extracción de materia grasa de la palta Hass (Persea Americana Mill) durante su maduración en condiciones de refrigeración y ambiente. Universidad de Chile. Fac de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2014. p. 5-8.

Geckil H., Xu F., Zhang X., Moon S., Demirci U. 'Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine.* 2010;5(3):469-484.

Gibas I. , Janik H. Review: Synthetic Polymer Hydrogels for Biomedical Applications. *Chemistry & Chemical Technology*. 2010; 4(4):298-304.

Goebel C., Hewitt NJ., Kunze G., Wenker M., Hein DW., Beck H., et al. Skin metabolism of aminophenols: human keratinocytes as a suitable in vitro model to qualitatively predict the dermal transformation of 4-amino-2-hydroxytoluene in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009;235(1):114-123.

Gómez de Ferraris M.E., Campos A. *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. Medica Paramericana*. 3ª ed. 2006. 138-150.

Gonzalez-Mira E., Egea MA., Garcia ML., Souto EB. Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;81(2):412-421.

Goodman M, Barry BW. Action of penetration enhancers on human stratum corneum as assessed by differential scanning calorimetry. In: Bronaugh RL, Maibach HI, editors. *Percutaneous absorption Mechanisms-Methodology-Drug Delivery* New York: Marcel Dekker. 1989. p. 567-593.

Goodman R., Barry BW. Action of skin permeation enhancers azone, oleic acid and decylmethyl sulphoxide. Permeation and DSC studies. *J. Pharm. Pharmacol.* 1986;38:71-79.

Gore AV., Chien YW. The nicotine transdermal system. *Clin. Dermatol.* 1998;16(5):599-615.

Grass GM., Robinson JR. Mechanisms of corneal drug penetration II: Ultrastructural analysis of potential pathways for drug movement. *J. Pharm.Sci.* 1988;77:15-23.

Gupta AK, Madan S., Majumdar D., Maitra A. Ketorolac entrapped in polymeric micelles: preparation, characterisation and ocular anti-inflammatory studies. *Int. J. Pharm.* 2000;209(1):1-14.

Gupta M., Gupta A. K. In vitro cytotoxicity studies of hydrogel pullulan nanoparticles prepared by aot/n-hexane micellar system. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2004;7(1):38-46.

Gupta NV., Shivakumar HG. Investigation of Swelling Behavior and Mechanical Properties of a pH-Sensitive Superporous Hydrogel Composite. *Iran J Pharm Res.* 2012;11(2):481-93.

Guzmán A., Yuste F., Toscano RA., Young JM., Van Horn AR., Muchowski JM. Absolute configuration of (-)-5-benzoyl-1,2-dihydro-3H-pyrrolo[1,2- $\alpha$ ]pyrrole-1-carboxylic acid, the active enantiomer of ketorolac. *J. Med. Chem.* 1986;29:589-91.

## H

Halkier-Sorensen L., Thestrup-Pedersen K. and Maibach HI. Equation for conversion of transepidermal water loss (TEWL) to a common reference temperature: what is the slope?. *Contact Dermatitis.* 1993;29(5):2180-281.

*Handbook of Pharmaceutical Excipients.* Edited by Rowe RC., Sheskey PJ., Quinn ME. Pharmaceutical Press. 6ª edición. 2009

*Handbook of Pharmaceutical Excipients.* Edited: Arthur H. Kibbe; American Pharmaceutical Association. The Pharmaceutical Press-American Pharmaceutical Association. 3ª Ed. 2000.

Hansen B. Analgesic therapy. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 1994;16: 868-875.

Harizi H., Corcuff, J.B., Gualde, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol. Med.* 2008;14:461-469.

Hayball PJ., Tamblyn JG., Holden Y., Wrobel J. Stereoselective analysis of ketorolac in human plasma by HPLC. *Chirality* 1993;5:31-35.

Hearnden V., Sankar V., Hull K., Juras DV., Greenberg M., Kerr AR., Lockhart PB., Patton LL., Porter S., Thornhill MH. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012;64(1):16-28.

Higgins AJ., Lees P. The acute inflammatory process, arachidonic acid metabolism and the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Equine Vet. J.* 1984;16:163-175.

Hosny KM., Tayeb MM., Fallatah OM., Mahmoud AA., Mandoura MS., Al-Sawahli, MM. Preparation and evaluation of ketorolac tromethamine hydrogel. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2013;20:269–274.

## I

Ibarrola EL. Introducción a los fluidos no newtonianos. Cátedra de Mecánica de fluidos. UnCor 2007.

ICH, 2006. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), <http://www.ich.org/home.html>.

Idson B. Percutaneous absorption . *J. Pharm. Sci.* 1975;64(6):901-924.

Innocenti M., Moscatelli G., Lopez S. Efficacy of gelclair in reducing pain in palliative care patients with oral lesions: preliminary findings from an open pilot study. *J. Pain Symptom. Manage.* 2002;24(5):456-457.

## J

Jacobi U., Tassopoulos T., Surber C., Lademann J. Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. *Arch. Dermatol. Res.* 2006;297(7):303-310.

Jacques Y., Buri P. An investigation of the physical behaviour of moistureactivated mucoadhesive hydrogels upon contact with biological and nonbiological substrates. *Pharmaceutica Acta Helvetiae.* 1997;72:225-232.

Jadoul A., Hanchard C., Thysman S., Preat V. Quantification and localization of fentanyl and TRH delivered by iontophoresis in the skin. *Int. J. Pharm.* 1995;120:221-228.

Järvinen K., Järvinen T., Urtti A. Ocular absorption following topical delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1991;16:3-19.

Jiang R., Benson HA., Cross SE., Roberts MS. In vitro human epidermal and polyethylene membrane penetration and retention of the sunscreen benzophenone-3 from a range of solvents. *Pharm. Res.* 1998;15(12):1863-1868.

## K

Kai T., Nakazono M., Kurosaki Y., Nakayama T., Kimura T. Keratinized epithelial transport of beta-blocking agents. III. Evaluation of enhancing effect on percutaneous absorption using model lipid liposomes. *Biol. Pharm. Bull.* 1993;16(8):801-805.

Kammerau B., Zesch A., Schaefer H. Absolute concentrations of dithranol and triacetyl-dithranol in the skin layers after local treatment: in vivo investigations with four different types of pharmaceutical vehicles. *J. Invest. Dermatol.* 1975;64(3):145-149.

Kandimalla K., Kanikkannan N., Andega S., Singh M. Effect of fatty acids on the permeation of melatonin across rat and pig skin in-vitro and on the transepidermal water loss in rats in-vivo. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999;51(7):783-790.

Karnes HT., March C. Precision, accuracy, and data acceptance criteria in biopharmaceutical analysis. *Pharm Res.* 1993;10(10): 1420-1426.

Khare AR., Peppas NA. Release behavior of bioactive agents from pHsensitive hydrogels. *J. Biomater. Sci. Polym.* 1993;4:275-289.

Kim CK., Kim JJ., Chi SC., Schim CK. Effect of fatty acids and urea on the penetration of ketoprofen through rat skin. *Int. J. Pharm.* 1993;99:109-118.

Kim MK., Lee CH., Kim DD. Skin permeation of testosterone and its ester derivatives in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 2000;52(4):369-375.

Kim YH., Ghanem AH., Mahmoud H., Higuchi WI. Short chain alkanols as transport enhancers for lipophilic and polar/ionic permeants in hairless Mechanism(s) of action. *Int. J. Pharm.* 1992;80:17-31.

Kobayashi Y., Iwai I., Akutsu N., Hirao T. Increased carbonyl protein levels in the stratum corneum of the face during winter. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2008;30(1):35-40.

Kogan A, Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv. Colloid Interf. Sci.* 2006;123-126:369-385.

Komai Y., Ushikif T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. 1991; 32: 2244-2258.

Komata Y., Inaoka M., Kaneko A., Fujie T. In vitro percutaneous absorption of thiamine disulfide from a mixture of propylene glycol and fatty acid. *J. Pharm. Sci.* 1992;81(8):744-746.

Koop HS., De Freitas RA., De Souza MM., Savi-Jr. R., Silveira JLM. Topical curcumin-loaded hydrogels obtained using galactomannan from *Schizolobium parahybae* and xanthan. *Carbohydr. Polym.* 2015;116:229-236.

Koyama Y., Bando H., Yamashita F., Takakura Y., Sezaki H., Hashida M. Comparative analysis of percutaneous absorption enhancement by d-limonene and oleic acid based on a skin diffusion model. *Pharm. Res.* 1994;11(3):377-383.

Kratz K., Hellweg T., Eimer W. Influence of charge density on the swelling of colloidal poly(N- isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2000;170:137-149.

Kumari AV., Yadav SK., Yadav SC. Biodegradable Polymeric Nanoparticles based Drug Delivery Systems. *Elsevier Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2009 Sep; 27:1-18.

Kunta JR., Goskonda VR., Brotherton HO., Khan MA., Reddy IK. Effect of menthol and related terpenes on the percutaneous absorption of propranolol across excised hairless mouse skin. *J. Pharm. Sci.* 1997;86(12):1369-1373.

## L

Lalla RV., Bensadoun RJ. Miconazole mucoadhesive tablet for oropharyngeal candidiasis. *Expert Rev. Anti-Infective Ther.* 2011;9(1):13-17.

Lampe MA., Burlingame AL., Whitney J., Williams ML., Brown BE., Roitman E., et al. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J. Lipid Res.* 1983;24(2):120-130.

Lemarchand C., Couvreur P., Vauthier C., Constatini D., Gref R. Study of emulsion by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. *Int. J. Pharm.* 2003;254:77-82.

Leopold CS, Lippold BC. Enhancing effects of lipophilic vehicles on skin penetration of methyl nicotinate in vivo. *J. Pharm. Sci.* 1995b;84(2):195-198.

Leopold CS., Lippold BC. An attempt to clarify the mechanism of the penetration enhancing effects of lipophilic vehicles with differential scanning calorimetry (DSC). *J. Pharm. Pharmacol.* 1995a;47(4):276-281.

Levin J., Miller R. A guide to the ingredients and potential benefits of over-the-counter cleansers and moisturizers for rosacea patients. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2011;4:31-49.

Lina Dong, Chao Liu, Dongmei Cun, Liang Fang. The effect of rheological behavior and microstructure of the emulgels on the release and permeation profiles of Terpinen-4-ol. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2015; 78:140-150.

Lippold BC. How to optimize drug penetration through the skin. *Pharm. Acta Helv.* 1992;67(11):294-300.

Llabot JM., Palma SA., Allemandi DA. Nanopartículas Poliméricas Sólidas. *Nuestra Farmacia.* 2008;53:40-47.

Loll PJ., Picot D., Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin Hz synthase. *Nat Struct. Biol.* 1995; 2: 637-643.

López-Muñoz FJ., Waterbury LD., Michel A., Seavey W. Lee J. Lack of addictive potential of ketorolac. *Pharmacologist.* 1987;29:136.

Lu GW., Gao P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. In: Kulkarni V, editor. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*: Elsevier; 2010. p. 59-94.

Lubrizol Corporation. Polímeros Carbopol®, Pemulen™ y Noveon®. Monografías Internet. Lubrizol corporation, 2016. Acceso 24 enero de 2016. Disponible en: <https://espanol.lubrizol.com/CorporateResponsibility/ProductStewardship/Carbopol.htm>

## M

Madhav NV., Shakya AK., Shakya P., Singh K. Orotransmucosal drug delivery systems: a review. *J Control. Rel.* 2009;140(1):2-11.

Mahrhauser D., Nagelreiter C., Baierl A., Skapiol J., Valenta C. Influence of a multiple emulsion, liposomes and a microemulsion gel on sebum, skin hydration and TEWL. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2015;37(2):181-186.

Mainardes RM., Evangelista RC. Praziquantel-loaded PLGA nanoparticles: Preparation and characterization. *J. Microencapsul.* 2005;22(1):13-24.

Mak V., Potts RO., Guy RH. Percutaneous penetration enhancement in vivo measured by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. *Pharm. Res.* 1990;7(8):835-841.

Mannermaa E., Vellonen KS., Urtti A. Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006; 58:1136-1163.

Manosroi A., Kongkaneramt L., Manosroi J. Characterization of amphotericin B liposome formulations. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2004;30(5):535-543.

Martín A. Diseño y formulación de películas poliméricas como sistema de transporte de clorhexidina. Universidad Nacional de Colombia. 2009. p. 3

Mashru R., Sutariya V., Sankalia M., Sankalia J. Transbuccal delivery of lamotrigine across porcine buccal mucosa: in vitro determination of routes of buccal transport. *J Pharm. Pharm. Sci.* 2005;28;8(1):54-62.

Matanović MR. Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. *Int. J. Pharm.* 2014;472(1-2):262 -275.

Mathiowitz E., Chickering D., Lehr C. *Bioadhesive Drug Delivery Systems Fundamentals, novel approaches and development.* Marcel Dekker Inc, New York, 1999, p. 3-65.

Megrab NA., Williams AC., Barry BW. Oestradiol permeation through human skin and silastic membrane and snake skin membranes: effects of ethanol water co-solvent systems. *Int. J. Pharm.* 1995;116:101-112.

Meshali MM., El-Sayed GM., El-Said Y., El-Aleem HM. Preparation and evaluation of theophylline sustained release tablets. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1996;22(4):373-376.

Micaela MT., Buckley and Brogden RN. Ketorolac. A review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Potential. *ADIS Drug Information Services.* 1990;39(1):86-109.

Miguel SP., Ribeiro MP., Brancal H., Coutinho P., Correia IJ. Thermoresponsive chitosan-agarose hydrogel for skin regeneration. *Carbohydr Polym.* 2014;111:366-373.

Mitchell JA., Belvisi MG., Akarasereenont P., Robbins RA., Kwon O., Croxtall J., Bames PJ., Vane JR. Induction of cyclo-oxygenase by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br. J. Pharmacol.* 1994;113:1008-1014.

Mohammed D., Hirata K., Hadgraft J., Lane ME. Influence of skin penetration enhancers on skin barrier function and skin protease activity. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014;51:118–22.

Montagna W. *The Structure and Function of Skin.* 2nd ed. New York: Academic Press; 1961.

Muller RH, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Deliv. Rev.* 2007;59(6):522-530.

## N

Nachum Z., Shupak A., Gordon CR. Transdermal scopolamine for prevention of motion sickness : clinical pharmacokinetics and therapeutic applications. *Clin. Pharmacokinet* 2006;45(6):543-566.

Nagarwal RC., Kant S., Singh PN, Maiti P., Pandit JK. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *J. Control. Rel.* 2009;136(1):2-13.

Nakanishi T., Kaiho F., Hayashi M. Improvement of drug release from carbopol 934 P formulation. *Chem. Pharm. Bull.* 1998;46(1):171-173.

Ng SF., Rouse J., Sanderson D., Eccleston G. A Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells. *Pharmaceutics.* 2010;2(2):209.

### O

Ogiso T, Iwaki M, Paku T. Effect of various enhancers on transdermal penetration of indomethacin and urea, and relationship between penetration parameters and enhancement factors. *J. Pharm. Sci.* 1995;84(4):482-488.

### P

Pal Kaur I., Kanwar M., *Ocular Preparations: The Formulation Approach*, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2002;28:473-493.

Park I., Kim D., Song J., In CH., Jeong SW., Lee SH., et al. Buprederm, a new transdermal delivery system of buprenorphine: pharmacokinetic, efficacy and skin irritancy studies. *Pharm. Res.* 2008;25(5):1052-1062.

Parthiban KG. Formulation and evaluation of ketorolac ocular pH-triggered in-situ gel. *Int. J. Drug Dev. Res.* 2010;2(2):379-387.

Patel VF, Liu F, Brown MB. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J. Control. Rel.* 2011;153(2):106-116.

Patel DA. Buccal Mucosa as A Route for Systemic Drug Delivery: A Review. *Int. J. Drug Dev. Res.* 2012;4(2):99-116.

Peniche C., Elvira C., San Roman J. Interpolymer complexes of chitosan and polymethacrylic derivatives of salicylic acid: preparation, characterization and modification by thermal treatment. *Polymer.* 1998. 39:6549-6554.

Peppas NA., Bures P., Leobandung WY., Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000;50:27-46.

Peppas N.A., Merrill EW. Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels as swollen elastic networks. *J. Appl. Polym. Sci.* 1977. 21:1763-1770.

Potts RO., Golden GM., Francoeur MI., Mak V., Guy RH. Mechanism and enhancement of solute transport across the stratum corneum. *J. Control. Rel.* 1991;15:249-260.

Pozo del A., Viscasillas A. Efficacy evaluation. In: Salvador A, Chisvert A, editors. *Analysis of cosmetic products.* Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 462–74.

## R

Radwan MA., Alquadeib BT., Aloudah NM., Aboul Enein HY. Pharmacokinetics of ketorolac loaded to polyethylcyanoacrylate nanoparticles using UPLC MS/MS for its determination in rats. *Int. J. Pharm.* 2010;397(1):173-178.

Rao JP., Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science.* 2011;36(7):887-913.

Rathbone M., Senel S., Pather I. Oral Mucosal Drug Delivery and Therapy. *Adv. Del. Sci. Tech.* 2015:18-21.

Rauk PN., Laifer SA. The prostaglandin synthesis inhibitor ketorolac blocks ritodrine stimulated production of PGF<sub>2</sub>, in pregnant sheep. *Obstet. Gynecol.* 1993;81:323-326.

Ricciotti E., FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31:986-1000.

Rocha MM., Rodríguez OE. Elaboración de una biopelícula bioadhesiva incorporando *Amphipteryngium adstringens* (Cuachalalate) para uso en mucosa oral. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 2015. p.14.

Rodriguez IC., Cerezo A., Salem II. Sistemas de liberación bioadhesivos. *Ars Pharmaceutica.* 2000;41(1):115-128.

Rooks WH., Tomolonis AJ., Maloney PJ. The analgesic and antiinflammatory profile of RS-37619. *Agents Actions* 1982;12:684-690

Roy SD., Manoukian E., Combs D. Absorption of transdermally delivered ketorolac acid in humans. *J. Pharm. Sci.* 1995;84(1):49-52.

Rubio L., Rodríguez G., Barbosa-Barros L., Alonso C., Cócera M., de la Maza A., Parra J.L., López, O. Bicellar systems as a new colloidal delivery strategy for skin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2012;92:322–326.

## S

Salamat-Miller N., Chittchang M., Johnston TP. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* 2005;57(11):1666-1691.

Samuelsson BI., Goldyne M., Granstrom E., Harnberg M., Harnnarstrom S., Malmsten C. Prostaglandins and thromboxanes. *Annu Rev. Biochem.* 1978; 47:997-1029.

Sánchez-López E., Egea MA., Cano A., Espina M., Calpena AC., Ettcheto M., Camins A., Souto E.B., Silva A.M., García M.L. PEGylated PLGA nanospheres optimized by design of experiments for ocular administration of dexibuprofen– in vitro, ex vivo and in vivo characterization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2016;145:241–250.

Sankar V., Hearnden V., Hull K., Juras DV., Greenberg M., Kerr AR., et al. Local drug delivery for oral mucosal diseases: challenges and opportunities. *Oral Dis.* 2011;17 Suppl 1:73-84.

Sasaki H., Yamamura K., Nishida K., Nakamura J., Ihikawa M. Delivery of drugs to the eye by topical application. *Prog. Retin. Eye Res.* 1996; 15:583-620.

Sato K., Sugibayashi K., Morimoto Y. Effect and mode of action of aliphatic esters on the in vitro skin permeation of nicorandil. *Int. J. Pharm.* 1988;43(1-2):31-40.

Sattar M., Sayed OM., Lane ME. Oral transmucosal drug delivery – Current status and future prospects. *Int. J. Pharm.* 2014;471(1-2):498-506.

Sauermann K., Clemann S., Jaspers S., Gambichler T., Altmeyer P., Hoffmann K. Ennen J. Age related changes of human skin investigated with histometric measurements by confocal laser scanning microscopy in vivo. *Skin Res. Technol.* 2002;8(1):52-56.

Save T., Shah MU., Ghamande AR., Venkitachalam P. Comparative study of buccoadhesive formulations and sublingual capsules of nifedipine. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994;46(3):192-195.

Scheuplein RJ., Blank IH. Permeability of the skin. *Physiol.* 1971;51:702-747.

Seibert KI., Zhinag Y., Leahy K., Hauser S., Masferrer J., Perkins W., Lsakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase- 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994;6; 91(25): 12013-12017.

Shim J., Kim MJ., Kim HK., Kim DH., Oh SG., Ko SY., et al. Morphological effect of lipid carriers on permeation of lidocaine hydrochloride through lipid membranes. *Int. J. Pharm.* 2010;388(1-2):251-256.

Shin SC., Cho CW., Oh IJ. Effects of non-ionic surfactants as permeation enhancers towards piroxicam from the poloxamer gel through rat skins. *Int. J. Pharm.* 2001;222(2):199-203.

Shin HS., Kim SY., Lee YM. Indomethacin release behaviors from pH and thermoresponsive poly (vinyl alcohol) and poly (acrylic acid) IPN hydrogels for site-specific drug delivery. *J. Appl. Polym. Sci.* 1997;65:685-693.

Shojaei AH. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *J. Pharm. Sci.* 1998;1(1):15-30.

Siegel RA. Stimuli sensitive polymers and self regulated drug delivery systems: A very partial review. *J. Control. Rel.* 2014;190:337–351.

Sierra AM., Calpena AC., Halbaut L. Aróztegui, MA., Clares B. Validated spectrofluorometric method for determination of gemfibrozil in self nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS)', *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2013; 113, p. 22-27.

Singhal, PJ. Formulation and evaluation of buccal patches of terbutaline sulphate. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* 2010;1(4):440-449.

Singh SK., Durrani MJ., Reddy IK., Khan MA. Effect of permeation enhancers on the release of ketoprofen through transdermal drug delivery systems. *Pharmazie* 1996;51(10):741-744.

Singla AK., Chawla M., Singh A. Investigations on interpolymer complexes of cationic guar gum and xanthan gum for formulation of bioadhesive films. *Res. Pharm. Sci.* 2010; 5(2):79-87.

Singla A.K., Chawla M., Singh A. Potential Applications of Carbomer in Oral Mucoadhesive Controlled Drug Delivery System: A Review. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2000;26(9):913-924.

Sinha V., Kumar R., Singh G. Ketorolac tromethamine formulations: an overview. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2009;6(9):961-75.

Slovin EM., Robinson JR. In vivo swelling kinetics of a series of hydrogel polymers in the cannulated gastrointestinal tract of the canine. *Int. Journal Pharm.* 1997;155 (1):53-63.

Smith JB., Willis AL. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat. New Biol.* 1971;231:235-237.

Song EJ., Lee JA., Park JJ., Kim HJ., Kim NS., Byun KS., et al. A study on seasonal variation of skin parameters in Korean males. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2015;37(1):92-97.

Southwell D, Barry BW. Penetration enhancement in human skin; effect of 2-pyrrolidone, dimethylformamide and increased hydration on finite dose permeation of aspirin and caffeine. *Int. J. Pharm.* 1984;22(2-3):291-298.

Staquet MJ. A double-blind study with placebo control of intramuscular ketorolac tromethamine in the treatment of cancer pain. *J. Clin. Pharmacol.* 1989;29(11):1031-1036.

Sudhakar Y., Kuotsu K., Bandyopadhyay AK. Buccal bioadhesive drug delivery. A promising option for orally less efficient drugs. *J. Control. Rel.* 2006;114(1):15-40.

## T

Takanashi Y., Higashiyama K., Komiya H., Takayama K., Nagai T. Thiomenthol derivatives as novel percutaneous absorption enhancers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1999;25(1):89-94.

Takeuchi Y., Yasukawa H., Yamaoka Y., Taguchi K., Fukushima S., Shimonaka Y., et al. Behavior of propylene glycol (PG) in dermis after treatment of rat intact skin surface with fatty acids, fatty amines or azone dissolved in PG. *Biol. Pharm. Bull.* 1995;18(2):304-309.

Takeuchi Y., Yasukawa H., Yamaoka Y., Takahashi N., Tamura C., Morimoto Y., et al. Effects of oleic acid/propylene glycol on rat abdominal stratum corneum: lipid extraction and appearance of propylene glycol in the dermis measured by Fourier transform infrared/attenuated total reflectance (FT-IR/ATR) spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.* 1993;41(8):1434-1437.

Tanner T, Marks R. Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. *Skin Res. Technol.* 2008;14(3):249-260.

Tanojo H., Bouwstra JA., Junginger HE., Bodde HE. In vitro human skin barrier modulation by fatty acids: skin permeation and thermal analysis studies. *Pharm. Res.* 1997;14(1):42-49.

Taylor LJ., Lee RS., Long M., Rawlings AV., Tubek J., Whitehead L., et al. Effect of occlusion on the percutaneous penetration of linoleic acid and glycerol. *Int. J. Pharm.* 2002;249(1-2):157-164.

Thomas BJ, Finnin BC. The transdermal revolution. *Drug Discov. Today* 2004;9(16):697-703.

Touitou E., Abed L. Effect of propylene glycol, Azone and n-decylmethyl sulphoxide on skin permeation kinetics of 5-fluorouracil. *Int. J. Pharm.* 1985;27(1):89-98.

Touitou E., Levi-Schaffer F., Dayan N., Alhaique F., Ricciari F. Modulation of caffeine skin delivery by carrier design: liposomes versus permeation enhancers. *Int. J. Pharm.* 1994;103(2):131-136.

Torre de la, PM., Gastres JL. Hidrogeles poliiónicos de chitosán y ácido poliacrílico como nuevos sistemas de liberación gástrica de amoxicilina para tratamiento de *H. pylori*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, 2003.

Trindade PA., Giglio FP, Colombini-Ishikiriana BL., Calvo AM., Modena KC., Ribeiro DA., Dionísio TJ., Brozowski DT., Lauris JR., Faria FA., Santos CF. Comparison of oral versus sublingual piroxicam during postoperative pain management after lower third molar extraction. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2011;40(3):292-297.

Tsai TF., Maibach HI. How irritant is water? An overview. *Contact Dermatitis* 1999;41(6):311-314.

Turi JS., Danielson D., Woltersom JW. Effects of polyoxypropylene 15 stearyl ether and propylene glycol on percutaneous penetration rate of diflorasone diacetate. *J. Pharm. Sci.* 1979;68(3):275-280.

## U

Uphouse LA., Welch SP., Ward CR., Ellis EF., Embrey JR. Antinociceptive activity of intrathecal ketorolac is blocked by the kappa opioid receptor antagonist, nor-binaltorphimine. *Eur. J. Pharmacol.* 1993;242:53-58.

## V

Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature.* 1971;231:232-235.

Vázquez-González, ML., Bernad R., Calpena A.C., Domènech O., Montero M.T., Hernández-Borrell J. Improving ex vivo skin permeation of non-steroidal anti-inflammatory drugs: enhancing extemporaneous transformation of liposomes into planar lipid bilayers. *Int. J. Pharm.* 2014;461:427-436.

Vázquez-González, ML., Calpena AC., Domènech Ò., Montero MT., Borrell J.H. Enhanced topical delivery of hyaluronic acid encapsulated in liposomes: A surface-dependent phenomenon. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2015;134:31-39.

Vega E, EgeaMA, Garduño-RamírezML, GarcíaML, Sánchez E, Espina M, Calpena AC. Flurbiprofen PLGA-PEG nanospheres: role of hydroxy- $\beta$ -cyclodextrin on ex vivo human skin permeation and in vivo topical anti-inflammatory efficacy. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2013;110:339-346.

## W

Walker M, Hadgraft J. Oleic acid - a membrane fluidiser or fluid within the membrane. *Int. J. Pharm.* 1991;71:R1-R4.

Wang H., Li W., Lu Y., Wang Z. Studies on chitosan and poly (acrylic acid) interpolymer complexes. I. Preparation, structure, pH-sensitivity and salt sensitivity of complex-forming poly (acrylic acid): chitosan semiinterpenetrating polymer network. *J. Appl. Polym. Sci.* 1997;65:1445-1450.

Watsky MA., Jablonski MM., Edelhauser HF. Comparison of conjunctival and corneal surface areas in rabbit and human. *Curr. Eye Res.* 1988;7:483-486.

Webster GV. Practical Aspects of Cosmetic Rhinoplasty. Webster G V, editor. *Pacific medicine and surgery*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011. p. 12-15.

Wertz PW. The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. *Adv. Drug Del. Rev.* 1996;18:283-294.

Wester RC., Maibach HI. Regional Variation in Percutaneous Absorption In: Bronaugh RL, Maibach HI, editors. *Percutaneous Absorption Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methods*. 4th ed. New York: Marcel Dekker Inc. 1999. p. 219.

Whittle BJR., Higgs GA., Eakins KE., Moncada S., Vane JR. Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. *Nature* 1980; 284:271.

Wilkes GL., Brown IA., Wildnauer RH. The biomechanical properties of skin. *CRC Critical Reviews in Bioengineering* 1973;1(4):453-495.

Williams AC, Barry BW. Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Pharm. Res.* 1991b;8(1):17-24.

Williams AC, Barry BW. The enhancement index concept applied to terpene penetration enhancers for human skin and model lipophilic (oestradiol) and hydrophilic (5-fluorouracil) drugs. *Int. J. Pharm.* 1991a;74:157-168.

Williams, A. C. and Barry, B. W. (2004) 'Penetration enhancers', *Adv Drug Deliv Rev*, 56(5), p. 603-18.

## X

Xie W., Robertson DL., Simmons DL. Mitogen-inducible prostaglandin WH synthase: a new target for non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Drug Dev. Res.* 1992;25:249.

## Y

Yamada M, Uda Y. Enhancement of percutaneous absorption of molsidomine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 1987;35:3390-3398.

Yamahara H, Lee VHL. Drug metabolism in the oral cavity. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1993;12:25-40.

Yamashita F., Koyama Y., Kitano M., Takakura Y., Hashida M. Analysis of in vivo skin penetration enhancement by oleic acid based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum. *Int. J. Pharm.* 1995;117(2):173-179.

Ya-Xian Z., Suetake T., Tagami H. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin - relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Arch. Dermatol. Res.* 1999; 291(10):555-559.

Yosipovitch G., Xiong GL., Haus E., Sackett-Lundeen L., Ashkenazi I., Maibach HI. Time-dependent variations of the skin barrier function in humans: transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and skin temperature. *J Invest. Dermatol.* 1998;110(1):20-23.

Yum S., Lee E., Taskovich L., Theeuwes F. Permeation enhancement with ethanol: mechanism of action through skin. In: Hsieh DS, editor. *Drug Permeation Enhancement* New York: Marcel Dekker Inc.; 1994. p. 143-170.

**Z**

Zambaux MF., Bonneaux F., Gref R., Maincent P., Dellacherie E., Alonso MJ., et al. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J. Control. Rel.* 1998;50(1-3):31-40.

Zhao K., Singh J. Mechanisms of percutaneous absorption of tamoxifen by terpenes: eugenol, D-limonene and menthone. *J. Control. Rel.* 1998;55(2-3):253-260.



# **ANNEXOS**

## **Publicaciones**





## Developing Transdermal Applications of Ketorolac Tromethamine Entrapped in Stimuli Sensitive Block Copolymer Hydrogels

Mireia Mallandrich<sup>1,2</sup> · Francisco Fernández-Campos<sup>1</sup> · Beatriz Clares<sup>2,3</sup>  · Lyda Halbaut<sup>1,2</sup> · Cristina Alonso<sup>4</sup> · Luisa Coderch<sup>4</sup> · María L. Garduño-Ramírez<sup>5</sup> · Berenice Andrade<sup>5</sup> · Alfonso del Pozo<sup>1</sup> · Majella E. Lane<sup>6</sup> · Ana C. Calpena<sup>1,2</sup>

Received: 31 January 2017 / Accepted: 11 May 2017 / Published online: 24 May 2017  
© Springer Science+Business Media New York 2017

### ABSTRACT

**Purpose** In order to obtain dermal vehicles of ketorolac tromethamine (KT) for the local treatment of inflammation and restrict undesirable side effects of systemic levels hydrogels (HG) of poloxamer and carbomer were developed.

**Methods** KT poloxamer based HG (KT-P407-HG) and KT carbomer based HG (KT-C940-HG) were elaborated and characterized in terms of swelling, degradation, porosity, rheology, stability, *in vitro* release, *ex vivo* permeation and distribution skin layers. Finally, *in vivo* anti-inflammatory efficacy and skin tolerance were also assessed.

**Results** HGs were transparent and kept stable after 3 months exhibiting biocompatible near neutral pH values. Rheological

patterns fitted to Herschel-Bulkley for KT-C940-HG and Newton for KT-P407-HG due to its low viscosity at 25°C. Rapid release profiles were observed through first order kinetics. Following the surface the highest concentration of KT from C940-HG was found in the epidermis and the stratum corneum for P407-HG. Relevant anti-inflammatory efficacy of KT-P407-HG revealed enough ability to provide sufficient bioavailability KT to reach easily the site of action. The application of developed formulations in volunteers did not induce any visual skin irritation.

**Conclusions** KT-P407-HG was proposed as suitable formulation for anti-inflammatory local treatment without theoretical systemic side effect.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11095-017-2181-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Beatriz Clares  
beatrizclares@ugr.es

<sup>1</sup> Department of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, School of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 27-31 Joan XXIII Av, 08028 Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Nanoscience and Nanotechnology Institute (IN2UB), University of Barcelona, 27-31 Joan XXIII Av 08028 Barcelona Spain

<sup>3</sup> Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>4</sup> Institute of Advanced Chemistry of Catalonia, 18-26 Jordi Girona St 08034 Barcelona Spain

<sup>5</sup> Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, 62209 Cuemavaca Morelos, Mexico

<sup>6</sup> Department of Pharmaceutics, UCL School of Pharmacy, 29-39 Brunswick Square, London, WC1N 1AX, UK

**KEY WORDS** carbomer · hydrogels · ketorolac tromethamine · poloxamer · transdermal

### ABBREVIATIONS

C940	Carbopol® 940
HG	Hydrogel
HPLC	High performance liquid chromatography
KT	Ketorolac tromethamine
P	Porosity
P407	Pluronic® F-127
PBS	Phosphate buffer solution
PEO	Poly(ethylene oxide)
PPO	Poly(propylene oxide)
SC	Stratum corneum
SCH	Stratum corneum hydration
SR	Swelling ratio
TEWL	Trans epidermal water loss
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate
WL	Weight loss

## INTRODUCTION

Ketorolac tromethamine (KT) belongs to the pyrrolo-pyrrole group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with potent analgesic and moderate anti-inflammatory activities used for the short-term management of moderate to severe acute post-operative pain (1,2). At present this drug is administered either intramuscularly or orally for the short-term management of post-operative pain and as an ophthalmic suspension for the prophylaxis and reduction of postoperative ocular inflammation. Injections, however, are invasive and often inconvenient for patients, especially in terms of self-administration. Oral therapy requires a frequent dosing regimen due to a biological half-life of 4–6 h with associated adverse effects such as, peptic ulceration and gastrointestinal bleeding.

The application of this type of drugs via the dermal route could offer additional advantages, e.g. it avoids the first pass metabolism, averts the risk of gastrointestinal disturbance, targeting only the areas of disease (3). However, the stratum corneum (SC) of the skin represents a formidable barrier which is the rate-limiting step for permeation across the skin (4). To overcome this problem, and to enhance drug bioavailability, the active is incorporated into different drug delivery systems based on polymeric nanostructures (5). Among these drug delivery systems, hydrogels emerged as the third generation biomaterial systems that function as drug delivery systems (6). Hydrogels (HG) are three-dimensional cross-linked polymeric networks that exhibit the ability to swell and retain a large amount of water, without dissolution (7). Their highly porous structure can easily be tuned by controlling the density of cross-links in the gel matrix and the affinity of the HG for the aqueous environment in which they are swollen (8,9). By modifying the HG density, the rate at which an entrapped drug is released can be altered to allow the delivery of the drug over a specific period (10). Concretely, micro/nanostructured polymeric systems have attracted much attention because of their pharmaceutical applications. In particular, poloxamer, also known as pluronic®, is a amphiphilic thermoresponsive block copolymer consisting of a central hydrophobic block of Poly(propylene oxide) (PPO) flanked by hydrophilic Poly(ethylene oxide) (PEO) blocks (PEO-PPO-PEO), has held interest in the design of dermal and transdermal delivery systems with a view to promoting, improving or retarding drug permeation through the skin (11).

On the other hand, carbomer, also known as carbopol®, is a hydrophilic pH responsive acrylic acid polymer cross-linked with polyalkenyl ethers or divinyl glycol (12), with optimal topical applications (13).

In this study is evaluated if poloxamer and carbomer HGs can be used to produce dermal vehicles of KT for the local treatment of inflammation without reaching systemic levels in order to restrict undesirable side effects of KT. For that, this work aimed at developing KT delivery systems with improved

biopharmaceutical profile for dermal administration. Thus, to target KT in the skin in a controlled release manner enhancing the contact of KT with the skin and improving its retention, we elaborated a poloxamer based HG and a carbomer based HG loading KT. After physical characterization in terms of rheological behavior and stability, *in vitro* release, as well as, *ex vivo* permeation studies of KT from HGs were accomplished. Finally, *in vivo* skin tolerance and anti-inflammatory efficacy were also assessed.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

KT was purchased from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). Carbopol® 940 (C940) and Pluronic® F-127 (P407) were obtained from Fagron Iberica (Terrassa, Spain). Sodium phosphate dibasic and monopotassium phosphate were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). The purified water utilized in all experiments was obtained from a Milli-Q Gradient A10 system apparatus home supplied (Millipore Iberica S.A.U., Madrid, Spain). All other chemicals and reagents were of analytical grade.

### Tissues for *ex Vivo* Assays

Ear porcine (Landrace Large White race) skin was obtained from the Bellvíte animal facility services, and approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation of the University of Barcelona. 1 mm thickness skin tissue was used for experiments. The skin was initially cleaned with tap water, and then hairs and subcutaneous fat tissue were removed with a scalpel.

Human skin was obtained from the abdominal region of healthy women (plastic surgery department, Barcelona-SCIAS Hospital, Barcelona, Spain). The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Barcelona-SCIAS Hospital and written informed consent forms were provided by volunteers. After being frozen to  $-20^{\circ}\text{C}$ , tissues were dermatomed (GA630, Aesculap, Tuttlingen, Germany) into 500  $\mu\text{m}$ -thick pieces. Human skin integrity was verified by measuring the trans epidermal water loss (TEWL) using a TEWL-meter TM210 (Courage & Khazaka, Köln, Germany). Human skin pieces exhibiting TEWL values above  $10\text{ g/m}^2\text{ h}$  were ruled out.

### Experimental Animals

Male Swiss CD-1 mice (20–25 g) were acquired from Círculo ADN S.A. de C.V. (Coyoacan D.F., Mexico) and were subjected to a quarantine period of 7 days on arrival. The animals were housed in plastic cages with soft bedding with access to

controlled diet and tap water ad libitum. The temperature was kept at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  and the relative humidity was kept at 50–60%. Artificial lighting was used to provide 12 h light and 12 h dark every 24 h. The studies were conducted under a protocol in accordance with the Mexican Official Normative for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and with the approval of the Academic Committee of Ethics of the Vivarium at the Universidad Autónoma del Estado de Morelos (Mexico).

### Elaboration of HGs

P407 and C940 were used as polymers for the preparation of two HGs (18% and 2%, respectively). KT loaded HGs (KT-P407-HG and KT-C940-HG) were elaborated at laboratory scale at a concentration of 2% (*w/v*) as previously described (11). Briefly, KT was dissolved in distilled water. The pre-weighed quantity of polymer was gradually added to this solution under continuous stirring, until a thin dispersion, without residual powder, was formed. HGs were then kept in a tightly closed container at the following conditions: P407 was kept at  $4^\circ\text{C}$  for 24 h and C940 was allowed to swell for 24 h at room temperature, and then, triethanolamine was added to the formulation. Once elaborated, both formulations were stored at room temperature until following studies.

### Physical Characterization

All HGs formulations were visually observed immediately and 3 months after preparation for color, odor and viscosity.

The pH of the prepared HGs was measured at room temperature and  $32^\circ\text{C}$ , using the CRISON micro-pH 200 micro-processor controlled pH-meter (Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain), immediately after preparation of formulations and after three months.

### Swelling and Degradation Tests

The swelling ratio (SR) was assessed by a gravimetric method. Briefly, dried HGs were incubated in PBS (pH = 5.5) at  $32^\circ\text{C}$  for 24 h in the case of KT-C940-HG and 30 min KT-P407-HG. At predetermined times, samples were removed and weighed ( $W_t$ ) after blotting the surface water. The PBS uptake was carried out in triplicate. The swelling ratio was calculated based on the following equation:

$$QR(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \quad (1)$$

Where  $W_s$  is the weight of the swollen HG at different times and  $W_d$  is the weight of dried HG.

The degradation as percentage of weight loss (WL) was calculated by immersing known amounts of dried HGs in

PBS (pH = 5.5) at  $32^\circ\text{C}$  for 24 h in the case of KT-C940-HG and 19 min for KT-P407-HG. At regular time intervals, samples ( $n = 3$ ) were dried and weighed. WL was calculated according to the equation:

$$WL(\%) = \frac{W_i - W_d}{W_i} \times 100 \quad (2)$$

Where  $W_i$  is the initial weigh of HG and  $W_d$  the weight of HG at different times.

### Porosity and Morphological Studies

The porosity ( $P$ ) was estimated by the solvent replacement method, which consisted in submerging the dried HG in absolute ethanol for 4 h in the case of KT-C940-HG and 2 min for KT-P407-HG, and then weighed after the excess ethanol on the surface was blotted. The porosity was calculated according to the equation:

$$P = \frac{W_2 - W_1}{\rho \times V} \times 100 \quad (3)$$

Where  $W_1$  stands for the weight of the dried HG to be immersed in ethanol,  $W_2$  represents the weight of HG after being immersed in ethanol,  $\rho$  and  $V$  are the density of absolute ethanol and the volume of the hydrogel, respectively.

Furthermore, the structure of HGs was examined by Scanning Electron Microscopy (SEM) in a JEOL J-7100F (JEOL Inc., Peabody, MA, USA) by coating with a thin layer of carbon in an Emitech K950X coater (Quorum Technologies Ltd., Kent, UK).

### Analytical Conditions and KT Content

The amount of KT in samples was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) methodology validated according ICH Q2 (R1) validation guidelines in terms of linearity, accuracy and precision (14). HPLC system consisted of Hitachi-Merck HPLC equipment with a variable L-4250 UV-Vis detector ( $\lambda = 314\text{ nm}$ ), and a C18 column (LiChrocart 250-4/LiChrosorb RP-18,  $5\ \mu\text{m}$ ) with a flow rate of 1 mL/min at isocratic conditions. The injection volume was 20  $\mu\text{L}$ . Elution conditions for detection of KT were sodium dihydrogen phosphate (pH 2.9) (Sigma, St Louis, MO, USA) /methanol (Merck, Darmstadt, Germany) (450/550, *v/v*) at 314 nm.

The KT content in HGs was addressed as follows: an exact volume of 10  $\mu\text{L}$  of each formulation was dissolved in 10 mL of water:methanol (1:1) under stirring for 15 min in an Elma Transsonic Digital S T490 DH ultrasonic bath (Elma, Singen, Germany). Solutions were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  Cameo® syringe filter nylon membrane (Sigma Aldrich, Barcelona, Spain) and analyzed by HPLC.

**Rheological Study**

Rheological properties were determined using a rotational Haake RheoStress 1 rheometer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) equipped with cone-plate geometry (Haake C60/2° Ti, 60 mm diameter, 0.105 mm gap between cone-plate) at 25 and 32°C (Thermo Haake Phoenix II + Haake C25P). Samples underwent a program consisting of 3 steps shear profile; firstly, a ramp-up period from 0 to 100 s<sup>-1</sup> during 3 min, followed by a constant shear rate period at 100 s<sup>-1</sup> for 1 min and finally the ramp-down period from 100 to 0 s<sup>-1</sup> for 3 min. Steady-state viscosity determined at t<sub>0</sub> (25 and 32°C), was also calculated from the constant shear stretch at 100 s<sup>-1</sup>.

The gelation temperature of KT-P407-HG was also evaluated according to Brugués et al. (11). Briefly, the formulation was placed in a water bath under stirring with a magnetic bar. The temperature of the hydrogel was steadily increased from 21 to 36°C. The gelation temperature was assumed as the one that the magnetic bar stopped because of gelation. The experiment was carried out by triplicate.

**Data Analysis**

The obtained flow data of KT-P407-HG and KT-C940-HG were fitted to different mathematical models in order to characterize flow properties and to describe the data:

$$\text{Newton} : \tau = \eta \cdot \gamma \tag{4}$$

$$\text{Bingham} : \tau = \tau_0 + (\eta_p \cdot \gamma) \tag{5}$$

$$\text{Ostwald-de-Waele} : \tau = K \cdot \gamma^n \tag{6}$$

$$\text{Herschel-Bulkley} : \tau = \tau_0 + K \cdot \gamma^n \tag{7}$$

$$\text{Casson} : \tau = \sqrt{\tau_0^2 + (\eta_0 \cdot \gamma)^2} \tag{8}$$

$$\text{Cross} : \tau = \gamma \cdot (\eta_\infty + (\eta_0 - \eta_\infty) / (1 + (\gamma/\gamma_0)^n)) \tag{9}$$

Where,  $\tau$  is the shear stress (Pa),  $\gamma$  is the shear rate (1/s),  $\eta$  is the dynamic viscosity (mPa·s),  $\tau_0$  is the yield shear stress (Pa),  $\eta_0$  is the zero shear rate viscosity,  $\eta_p$  is a constant plastic viscosity (mPa·s),  $\eta_\infty$  is the infinity shear rate viscosity,  $n$  is the flow index and  $K$  is the consistency index. Best fitting was based on the calculation of the correlation coefficient ( $r$ ) by linear regression analysis of the flow plots.

**In Vitro Release**

The release assay was performed using thermostated (32 ± 0.5°C) amber glass Franz-type diffusion cells (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NY, USA) with an active

diffusion area of 2.54 cm<sup>2</sup>, cellulose dialysis membranes with molecular weight cut-off of 12KDa (Iberlavo, Madrid, Spain), and phosphate buffer solution (PBS) (0.06 M, pH 7.6) under continuous stirring as receptor medium, assuring sink conditions. 100 mg samples were placed in the donor compartment and sealed with Parafilm® to avoid evaporation. 300 µL samples were collected via syringe at pre-established intervals for 9 h, and immediately replaced with similar volume and temperature of PBS. The collected samples were analyzed for drug content by HPLC. The experiment was performed in quadruplicate, and the cumulative percentage of KT released was calculated.

**Kinetics**

The amount of KT released was fitted to the following equations:

$$\text{Zero-order} : \%Rt/\%R_\infty = K_0 \times t \tag{10}$$

$$\text{First-order} : \%Rt/\%R_\infty = 1 - e^{-k \cdot t} \tag{11}$$

$$\text{Higuchi} : \%Rt/\%R_\infty = k_h \times t^{1/2} \tag{12}$$

$$\text{Korsmeyer-Peppas} : \%Rt/\%R_\infty = K \times t^n \tag{13}$$

Where  $Rt$  is the amount of drug released at time ( $t$ ),  $R_\infty$  is the maximum amount of drug released,  $k$  is the release rate constant expressed in units of concentration/time, and  $n$  is the diffusion release exponent that can be used to characterize the different release mechanisms. It has been established that  $n \leq 0.43$  (Fickian diffusion mechanism),  $0.43 < n < 0.85$  (anomalous transport) and  $n \geq 0.85$  (super case II transport, i.e. zero, order release). A nonlinear least squares regression was performed using the WinNonLin®, V. 3.3 software (Pharsight Co., MountainView, CA, USA). The Akaike information criterion (AIC) was determined for each model as an indicator of the model's suitability for a given dataset based on maximum likelihood.

**Ex Vivo Permeation Protocols**

The following guidelines were adhered during these studies: OECD guidelines (15,16), the published opinions of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products (17) and classical and updated principles of percutaneous absorption (18).

**Estimation of Permeation Parameters**

The estimation of permeation parameters was carried out using Franz diffusion cells as described previously. The ear pig skin was mounted between the receptor and donor compartments

with the SC towards the donor chamber with a diffusion area of 2.54 cm<sup>2</sup>. 300 mg samples were placed in the donor compartment in contact with porcine skin. Samples of the receptor phase (300 µL aliquots) were withdrawn periodically and replaced by receptor medium at various time intervals for 24 h, and analysed by HPLC for drug content. Six parallel determinations were addressed. Once the experiment finalized, the amount of drug retained ( $A_R$ , µg/g skin/cm<sup>2</sup>), in the porcine membrane was determined. For that purpose, the skin was cleaned with sodium lauryl sulphate solution 0.05% and rinsed with distilled water. The permeation area was excised and weighed, then the drug retained was extracted with methanol:water (50:50, v:v) under sonication for 20 min in ultrasound bath, and analysed by HPLC.

The following parameters were calculated from experimental data:

The cumulative amount of KT permeated through porcine skin membrane was plotted as a function of time. The slope and intercept of the linear portion of the plot was derived by regression using the Prism®, V. 5 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). KT fluxes ( $J$ , µg/cm<sup>2</sup>/h) from the assayed formulations were calculated from the slope of linear portion of the cumulative amounts permeated through the membrane per unit surface area versus time plot, and the extrapolation of this line will intercept with the X-axis at a time equal to lag time ( $T_L$ , h). The permeability coefficients ( $k_p$ , cm/h) were obtained by dividing the  $J$  by the initial drug concentration ( $C_0$ ) in the donor compartment, and it is assumed that under sink conditions the drug concentration in the receiver compartment is negligible compared to that in the donor compartment (19). The predicted steady-state plasma concentration ( $C_{ss}$ ) of drug, which would penetrate skin barrier after topical application, was obtained using the following equation:

$$C_{ss} = \frac{\bar{J} \times A}{Cl_p} \quad (14)$$

where  $C_{ss}$  is the plasma steady-state concentration,  $J$  the flux determined in this study,  $A$  the hypothetical area of application and  $Cl_p$  the plasmatic clearance.

#### Percutaneous Absorption and KT Distribution in Human Skin Layers

Human skin discs with an internal diameter of 2.5 cm were placed on thermostated (32°C) Franz static diffusion cells (3 mL, 1.86 cm<sup>2</sup> of exposed area, Lara-Spiral, Courtenon, France) in order to determine the compartmental distribution of KT after an exposure time of

24 h. PBS at pH 7.6 (Sigma, St Louis, USA) in water (MilliQ quality) was used as receptor fluid, representing the pH of blood. The solubility of KT in the receptor medium and sink conditions were guaranteed throughout the assay by adding gentamicin sulphate 0.04% (w/v) (Sigma, St Louis, MO, USA) and bovine serum albumin 1% (w/v) (Sigma, St Louis, MO, USA) under magnetic stirring (20). Samples (10 µL) were applied to the skin. Control cells were also used, 10 µL of blank HGs (without KT) were applied to the skin surface to evaluate potential interferences of the HG or skin layer in the analysis of KT.

After 24 h exposure period, the skin discs were disassembled from the Franz cells and the excess of HGs formulations was removed from the skin in order to recover the excess of KT. Then, the receptor fluid was recovered, and stripping procedures were performed on the surface horny layers of the SC with adhesive tape (D-squame, Cuderm Co., Dallas, USA). Twelve strips were carried out in order to remove most of the amount of substance contained in the SC. The epidermis was separated from the dermis after heat treatment (20). The different samples to be analyzed were extracted and/or diluted in water:methanol (1:1,v/v) (Merck, Darmstadt, Germany). 10 mL of the extraction solvent was added to the S sample, 2 mL of extraction solvent were used for the SC and E, and 1 mL was used for the extraction of KT from D. The resulting mixtures were sonicated for 20 min and the supernatants were pipetted and analyzed by HPLC, yielding the amount of KT as µg(KT)/[g(human skin)/cm<sup>2</sup>] and % of the applied dose.

#### In Vivo Anti-Inflammatory Efficacy

Anti-inflammatory efficacy of developed HGs was assessed according to the protocol described by Domínguez-Villegas et al. (21). Briefly, 2.5 mg of 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) dissolved in 5 µL ethanol was used to induce mouse ear edema inflammation in mice. The animals were divided in different groups ( $n = 3$ ). 100 mg of KT-P407-HG (group 1) or KT-C940-HG (group 2) were applied to both sides of the right ear simultaneously with TPA, also 5 µL of ethanol was applied to both sides of the left ear. An equivalent KT solution in acetone was assayed similarly as reference (group 3) to both sides of the right ear and 5 µL of acetone to both sides of the left ear. 100 mg of blank HGs (groups 4 and 5) were applied to both sides of the right ear simultaneously with TPA and without TPA in both sides of the left ear.

Four hours after the application of the formulations, the animals were sacrificed by cervical dislocation and circular

sections with 7 mm of diameter were cut from left and right ears and weighted to determine the anti-inflammatory activity

expressed as the percentage of inhibition of the inflammatory process according to the equation:

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{\text{difference in weight of ear, control} - \text{difference in weight of ear, treated}}{\text{difference in weight of ear, control}} \times 100 \quad (15)$$

### Histological Evaluation

After the anti-inflammatory efficacy test, the circular sections of ears of treated animals, as well as, positive and negative controls were histologically evaluated to confirm the anti-inflammatory efficacy of HGs by detecting the presence of cells from the immune system in tissues. For this task, tissues were fixed in a 4% formaldehyde solution. Samples were embedded in paraffin and histological slices were obtained using standard procedures. Subsequently, samples were conventionally stained with hematoxylin-eosin and observed by light microscopy.

### In Vivo Tolerance Study

Ten female volunteers with healthy skin between 21–52 years old participated in the study. The study was approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona according to the recommendations of the Declaration of Helsinki (22), all the subjects provided signed a written informed consent forms. Subjects were also instructed for not to use skin cleansing or skin care products on the test sites during two days before and during the study. Prior to the measurements, the volunteers were allowed to stay in the test room for at least 30 min prior to the measurements.

Several measurements were performed before applying the formulation (baseline readings), immediately after application as a uniform layer ( $0.1 \text{ mL/cm}^2$ ) and one hour after application (23), on the flexor side of the left and right forearm for KT-P407-HG and KT-C940-HG, respectively. Skin temperature was measured using a Skin Thermometer® ST500 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany). TEWL, referring to the total amount of water vapor lost through the skin was measured with a Tewameter® TM 300 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany). The stratum corneum hydration (SCH) was measured using a Corneometer® CM 825 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany). All measurements were carried out according to published guidelines.

### Statistical Analysis

Results are reported as the mean of at least three replicates  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical analysis regarding the

permeation study was assessed by ANOVA, followed by Kruskal-Wallis test. Results from skin tolerance were analyzed by ANOVA, followed by t-student test. A *p* value below 0.05 was considered significant. Prism®, V. 5 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used for all statistical calculations.

## RESULTS

### Characterization

The obtained HGs were transparent. KT-C940-HG was highly viscous with limited flowability upon inverting the tube. KT-P407-HG was liquid at room temperature and gelled at skin temperature. No changes were observed in formulations after 3 months storage at room temperature ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Both formulations exhibited neutral or near neutral pH values:  $7.2 \pm 0.2$  and  $6.7 \pm 0.2$  at room temperature, and  $6.7 \pm 0.1$  and  $6.2 \pm 0.1$  at  $32^\circ\text{C}$  for KT-P407-HG and KT-C940-HG, respectively. No statistical significant changes were observed over time ( $p > 0.05$ ). The drug content was found to be  $99 \pm 0.5\%$ . Results of drug content uniformity test for both HGs indicated that the drug was properly and uniformly dispersed.

The swelling process of KT-C940-HG and KT-P407-HG followed a first order model (Fickian kinetic), which was represented by the kinetic constants  $k = 0.5188 \text{ h}^{-1}$  and  $0.29 \text{ min}^{-1}$ , respectively (the plot is provided in the supplementary material). The PBS uptake rate was inversely proportional to the PBS in the HG. Initially, there was a fast PBS uptake, probably due to the dehydration of the HG, and then the rate of PBS uptake reached a plateau corresponding to the maximum SR in the case of KT-C940-HG ( $Q_{\text{max}} = 25.26$ ). KT-P407-HG after a fast PBS uptake ( $Q_{\text{max}} = 1.15$ ) the HG solubilized.

The KT-C940-HG was completely degraded in 24 h. The degradation process followed a zero order kinetic ( $r^2 = 0.9987$ ). The degradation process did not depend on the concentration of the remaining polymer. This process was represented by a kinetic constant  $k = 4.36\%/h$ . Nevertheless the degradation process of KT-P407-HG took place at a much faster pace. It was finished in 17 min, and

followed a first-order kinetic model ( $r^2 = 0.9985$ ) (graph is provided in the supplementary material).

The P result of KT-C940-HG was higher than KT-P407-HG,  $98.70 \pm 3.76\%$  and  $74.93 \pm 7.96\%$ , respectively. HGs were examined by SEM. Fig. 1 shows the SEM micrographs of KT-C940-HG and KT-P407-HG. KT-C940-HG exhibited three-dimensional heterogeneous filament structure with capillary channels interconnected (Fig. 1A and B), quite different from that of KT-P940-HG (Fig. 1C and D), in which is showed a porous structure more compact.

### Rheological Behavior

Figure 2 shows the rheological behaviors of KT-C940-HG and KT-P407-HG at 25 and 32°C. No changes on rheological behavior were observed for KT-C940-HG between 25 and 32°C although a slight decrease on viscosity was observed as the temperature increased, from  $6.079 \pm 0.037$  to  $5.057 \pm 0.066$  Pa·s ( $p < 0.05$ ). Herschel-Bulkley model was the model that statistically best fitted rheological behaviour in ascending and descending stretches at 25°C ( $r = 0.9999$ ) and 32°C ( $r^2 = 0.9998$ ) in KT-C940-HG in line with others studies (24). KT-C940-HG also exhibited apparent thixotropy as the flow curves displayed hysteresis loops with the downward stretches below the upward stretches (Fig. 2A and B).

Conversely, KT-P407-HG showed a Newtonian flow at 25°C and the Newton equation fitted the experimental data perfectly ( $r = 1$ ) confirming that viscosity is not affected by

changes in shear rate (Fig. 2C). However, at 32°C the Newtonian behavior turned to pseudoplastic, being the Cross equation the mathematical model that best fitted experimental data ( $r^2 = 0.9988$ ) in ascending and descending stretches. The viscosity values (at  $100 \text{ s}^{-1}$ ) were of  $0.132 \pm 0.007$  Pa·s at at 25°C and  $0.876 \pm 0.008$  at 32°C.

Finally, the gelation temperature of KT-P407-HG was recorded to be 31°C.

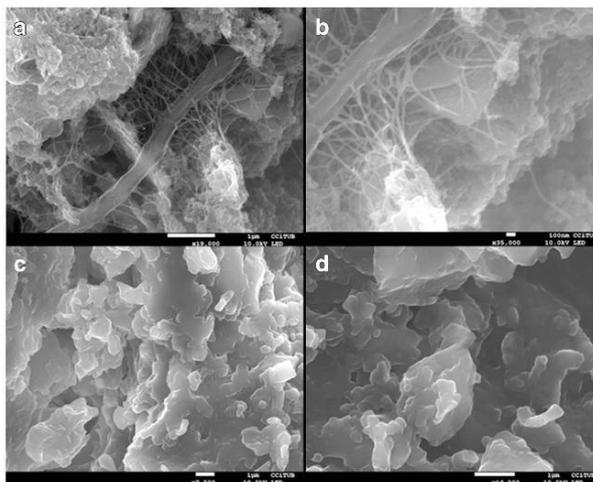
### In Vitro Release

As depicted in Fig. 3, KT was released from C940-HG and P407-HG in the first 2 h in a similar profile. This could be interpreted by viscosity of HGs formulations. The drug release pattern was rapid; reaching KT cumulative release values of  $93.33 \pm 2.66\%$  from C940-HG and  $94.06 \pm 3.58\%$  from P407-HG. On the base of the smaller AIC value, the first-order kinetic equation was the model that best fitted experimental data (Eq. 11) in which K values were  $3.46 \pm 0.84 \text{ h}^{-1}$  and  $1.37 \pm 0.22 \text{ h}^{-1}$  for KT-C940-HG and KT-P407-HG, respectively.

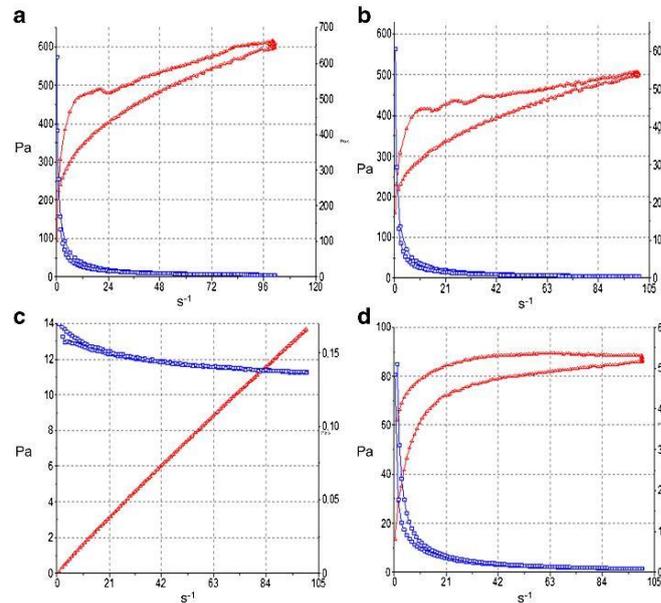
### Permeation Parameters

Figure 4 shows the cumulative amounts of KT permeated from C940-HG and P407-HG. Table I shows the permeation parameters of KT calculated from the amounts permeated across the skin and the retained amount after 24 h. The median values of the cumulative amount of KT

**Fig. 1** SEM images of dried discs of (A) KT-C940-HG (x1 9000); (B) KT-C940-HG (x35000); (C) KT-P407-HG (x7500) and (D) KT-P407-HG (x1 6000).

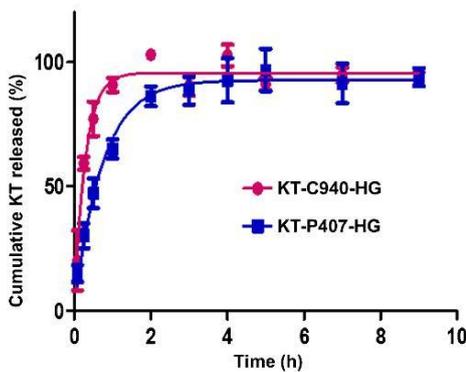


**Fig. 2** Rheograms of the two tested formulations: **(A)** KT-C940-HG at 25°C; **(B)** KT-C940-HG at 32°C; **(C)** KT-P407-HG at 25°C; **(D)** KT-P407-HG at 32°C. The flow curve represents shear stress (Pa) versus shear rate ( $s^{-1}$ ) in red, and the viscosity curve represents viscosity (Pa·s) versus shear rate ( $s^{-1}$ ) in blue.

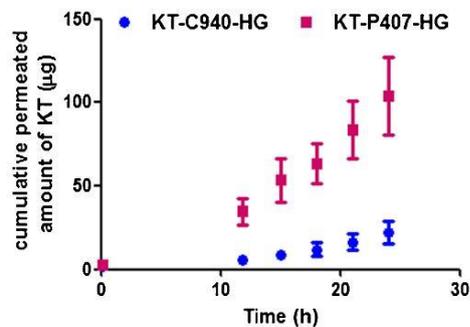


permeated after 24 h were 20.25  $\mu$ g and 105.06  $\mu$ g for KT-C940-HG and KT-P407-HG, respectively. The  $T_L$  is the time of KT to permeate through the skin membrane and to diffuse into the receptor medium when the steady state of diffusion is reached.  $T_L$  for KT-C940-HG was found to be 8.5 h and 4.9 h for KT-P407-HG. KT-C940-HG exhibited median  $K_p$  values of  $0.93 \times 10^{-5}$  cm/h and

$4.23 \times 10^{-5}$  cm/h for KT-P407-HG. The amounts of KT remaining in the skin are also depicted in Table I. Building on this data, other theoretical calculations could be estimated, such as  $C_{ss}$ , which is a useful prediction of plasma levels that would be achieved in humans after topical application of developed HGs, considering a human plasma clearance of 34.3 mL/min (25), and 1 cm<sup>2</sup> application area.  $C_{ss}$  of



**Fig. 3** Cumulative amount of KT released from formulations for 9 h. Data at each time point represent mean  $\pm$  SD of at least 4 experiments.



**Fig. 4** Cumulative amount of KT permeated through porcine ear skin from formulations for 24 h. Data at each time point represent mean  $\pm$  SD of at least 6 experiments.

**Table I** Transdermal Permeation Parameters of KT after 24 h. Results are Expressed as Median (Minimum-Maximum)

Parameters	KT-C940-HG	KT-P407-HG
$A_{P24h}$ ( $\mu\text{g}$ )	20.25 (17.68–26.81)	105.06 (87.83–120.29)
$A_R$ ( $\mu\text{g/g skin/cm}^2$ )	192.01 (188.88–347.94)	1475.84 (773.38–2107.53)
$T_L$ (h)	8.5 (7.5–8.9)	4.9 (7.04–9.08)
$J$ ( $\mu\text{g/cm}^2/\text{h}$ )	2.01 (1.67–2.27)	8.16 (7.04–9.08)
$K_p$ ( $\times 10^{-3}$ ) ( $\text{cm/h}$ )	0.93 (0.83–1.14)	4.23 (3.52–4.54)
$C_{ss}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.058 (0.049–0.066)	0.241 (0.205–0.265)

0.058 and 0.241  $\mu\text{g/mL}$  for KT-C940-HG and KT-P407-HG. A non-parametric Mann-Whitney U test showed significant statistical differences ( $p < 0.05$ ) for  $T_L$ ,  $J$ ,  $K_p$  and  $C_{ss}$  between KT-C940-HG and KT-P407-HG.

### Percutaneous Absorption

Table II shows the obtained results of KT recovered from the skin surface, SC, epidermis, and dermis after an exposure time of 24 h. It could be observed that KT-C940-HG exhibited 1% of percutaneous absorption, whereas KT-P407-HG showed less than 0.4%. The vast majority of KT remained on the surface of the skin in both formulations, ~92% of the applied dose in the donor compartment. The highest concentration of KT from C940-HG following the surface was found in the epidermis. In the case of P407-HG, the highest concentration of KT following the surface was found in the SC, at a concentration lower than 1%. In contrast to P407-HG, residual amounts of KT were found in the receptor medium from C940-HG.

### Anti-inflammatory Efficacy

The anti-inflammatory activity test was examined using the acute ear skin edema model induced by topical application with TPA. A KT solution in acetone was taken as the

**Table II** Compartmental Distribution and Percutaneous Absorption of KT on Human Skin Expressed as Percentage of Applied Amount. Data Represent Mean  $\pm$  SD of at Least 3 Separate Experiments

	KT-C940-HG	KT-P407-HG
Surface	92.89 $\pm$ 5.04	92.61 $\pm$ 4.52
Stratum corneum	0.29 $\pm$ 0.19	0.27 $\pm$ 0.19
Epidermis	1.29 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.07
Dermis	b.l.q.	b.l.q.
Receptor fluid	0.04 $\pm$ 0.03	b.l.d.
Total recovery	94.51 $\pm$ 5.24	93.01 $\pm$ 4.37
Percutaneous absorption	1.34 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.07

b.l.q. below limit quantification; b.l.d.: below limit detection

reference of inflammatory inhibition. As shown in Fig. 5, the KT-P407-HG showed an ostensible reduction of inflammation of 15.4% compared to the reference. However, the KT-C940-HG exhibited lower anti-inflammatory effect in comparison with the reference.

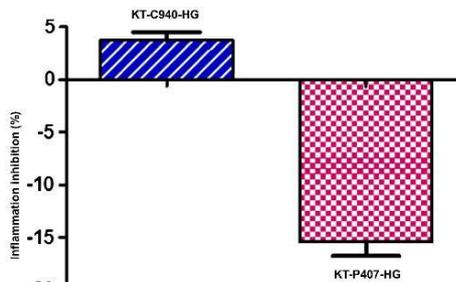
### Histological Studies

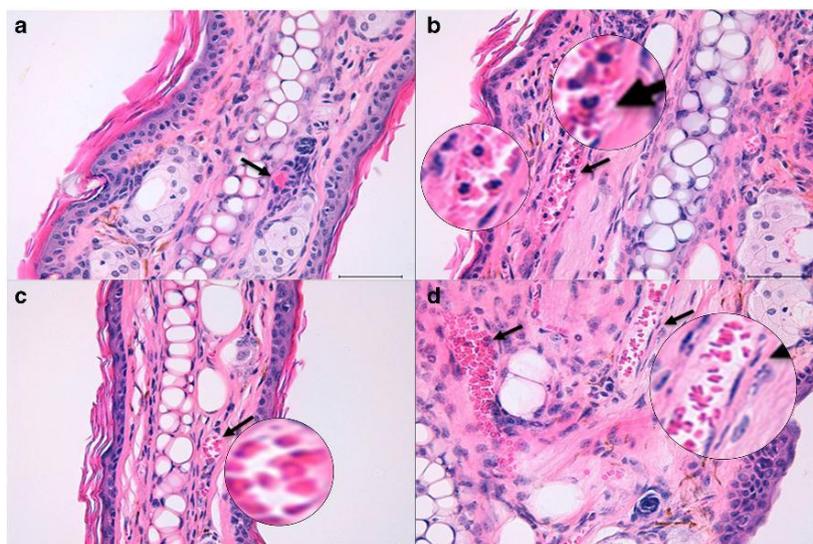
Figure 6 shows the histological photomicrographs of treated tissues, as well as, positive and negative controls. The inflammation caused by TPA in mice ear (positive control) resulted in the presence of immune system cells in blood vessels (small points in purple showed in magnifications, Fig. 6B) as a response to the inflammation. No cells from the immune system were observed in the negative control of inflammation (Fig. 6A) or in samples from treated ears with KT-P407-HG (Fig. 6C). Finally, samples from KT-C940-HG showed small number of immune system cells in blood vessels (Fig. 6D).

### Cutaneous Experimental Parameters

The application of tested HGs did not induce any visual skin irritation and were well tolerated. Figure 7 depicts the measurements of biomechanical parameters of skin after formulation application. As can be observed, no changes on skin temperature were observed for none of the HGs. In particular, the KT-P407-HG forms a visible film on the skin; at time of application KT-P407-HG is liquid and transparent but it gels a few minutes after its application onto the skin due to its gelation nature depending on the temperature. One hour after application, water has completely evaporated and a thin and transparent film can be seen to touch on the skin.

Slight decrease in TEWL values for both HGs was recorded, although no statistically significant differences were found when compared with basal values. However, SCH suffered slight but statistically significant decrease following KT-


**Fig. 5** Anti-inflammatory efficacy of tested formulations as the percentage of reduction of inflammation compared to the reference. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of 3 determinations.



**Fig. 6** Histological images of the mice ears. **(A)** negative control of inflammation; **(B)** positive control of inflammation; **(C)** inflamed ear treated with KT-P407-HG; **(D)** inflamed ear treated with KT-C940-HG. Bars length 50  $\mu$ m.

C940-HG application ( $p < 0.05$ ). This fall was even more pronounced for KT-P407-HG.

## DISCUSSION

P407 consisting of 70% (*w/w*) PEO units, was chosen because is a low toxicity excipient approved by U.S. Food and Drug Administration for different types of preparations and its attractive use as delivery system through the skin for local pain and inflammations (26). C940 was selected based on its excellent organoleptic characteristics and high viscosity at low concentration, as well as, its ability to retain water leading to the formation of a cross-linked polymeric network decreases the loss of moisture from the skin surface hindering water evaporation (24).

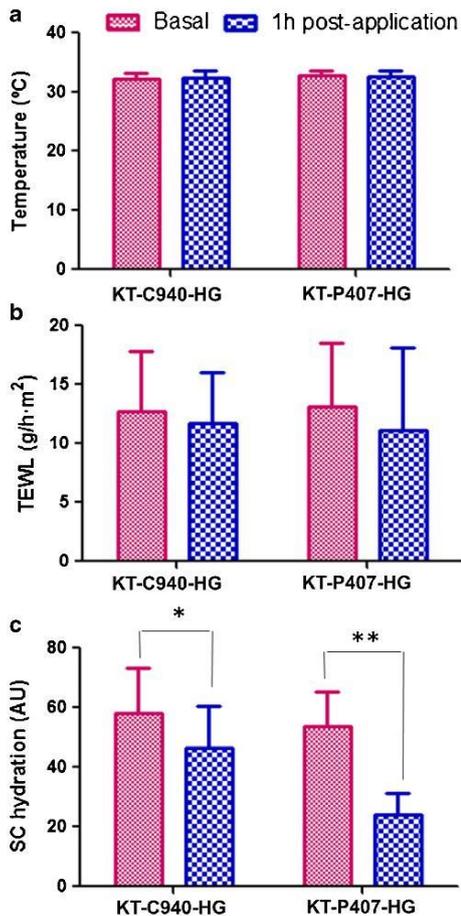
Among physical characteristics for dermal formulations pH is an important factor to avoid skin irritation or make the skin susceptible to bacterial infection (11). Natural acidity of the skin ranges from 4 to 6, depending on the skin area and the age of the individual, due to the buffer system in the skin that is able to absorb small quantities of acid or alkali material applied to reduce irritation (27). Our pH findings make both formulations suitable for topical application. Although statistical differences between 25 and 32°C were found in both formulations ( $p < 0.05$ ). There were not implications in terms

of tolerance and stability from the physiologic and technological points of views.

KT-C940-HG exhibited slower swelling behavior than KT-P407-HG. In KT-C940-HG the SR reached an equilibrium state within  $\sim 5$  h (supplementary material). This may be due to C940 possess low flexibility and high cross-linking degree (28). In contrast, KT-P407-HG after the critical micelle concentration (CMC) of P407 is a key factor in its sol-gel state. At concentrations below the CMC P407 is soluble in water, in our KT-P407-HG the polymer was 18%, and once poured in the swelling medium the concentration of P407 decreased rapidly below CMC, thus producing the swelling and solubilized in  $\sim 19$  min.

Morphological characteristics might contribute to the permeability, drug release and degradability properties. Morphological studies revealed a more compact surface in KT-P407-HG. However, this structure could be due to the drying process during SEM pre-treatment of samples, because drying induces collapse of the porous structure within the material. In the case of a micellar HGs (such as P407) a potential adhesion of these small structures could be occurred.

On the other hand, rheology is a useful technique to characterize the structure strength of semisolid systems and predict their behavior for topical uses (29). Concretely, viscosity of vehicles may play an important role in controlling the release and skin permeation of drugs (30). Rheological measurements



**Fig. 7** Evolution of biomechanical parameters monitored before the application of the formulations and 1 h after application. Temperature is expressed as degrees Celsius (°C), TEWL is expressed as  $\text{g/h} \times \text{cm}^2$ , and the SCH as arbitrary units (AU) (\* =  $p < 0.005$ ; \*\* =  $p < 0.0005$ ).

indicated how much a sample deforms or how fast it flows by means of stressing the sample. For the KT-C940-HG the Herschel-Bulkley equation provides a general model for plastic materials that are pseudoplastic substances which additionally feature a yield point. The fluid requires a certain minimum stress to initiate flowing and after that it exhibits a pseudoplastic flow where the viscosity changes depending on the shear rate: the more shear rate, the lower viscosity (Fig. 2A). This behaviour is often seen in polymer systems; the hydrogel forms a three-dimensional network under static

conditions, but it flows when stressed surpassing the yield point because the polymer chains become flow-oriented; therefore, the viscosity decreases. This behaviour is very interesting in semi-solid formulations because there is a high viscosity under static conditions that increases the physical stability of the formulation. Yet, the formulation thins under strain, desirable property for topical application. Furthermore, the apparent thixotropy exhibited evidenced a time-dependant shear thinning phenomenon when the system is stressed. This fact eases the spreading of the HG in a thin and homogeneous layer when it will be applied to the skin.

KT-P407-HG fitted to Newton equation. This is consistent with the poloxamer under temperature value below sol-gel transition temperature, in which PEO blocks are hydrated, and PPO is relatively soluble in water showing low viscosity. In this case, the formulation was found to be easily spreadable and nondripping in nature. Indeed, the Newtonian behavior of the KT-P407-HG at low temperatures makes it suitable for application as a spray or roll-on. A reversible sol-gelstate-transition allows a cool solution to flow onto skin providing a non-occlusive gel at body temperature (31).

As reported previously, P407-HG exhibited reversible sol-gel transition behavior and becomes a gel above the critical gelation temperature (11). This critical gelation temperature was 31°C, and thus gelled under release experiment conditions (32°C), which might explain that release profiles of both formulations were similar. The KT release from HGs was mainly via diffusion. In the first-order kinetic model the release constant is independent of the initial drug concentration, and the release rate at any given time is directly proportional to the drug concentration in the matrix. The obtained K values were indicative that formulations could allow providing a great amount of drug quickly on the surface of SC, and enhancing drug absorption through skin (2).

The first *ex vivo* skin permeation study of KT from C940-HG and P407-HG was performed in order to determine the permeation profile of drug from these vehicles as well as skin permeation parameters. Ear pig skin was used to this experiment because is a representative membrane for percutaneous absorption due to its structural similarity with human skin and density of hair follicles (20). The most remarkable was that theoretical  $C_{ss}$  values demonstrated that were below the therapeutic plasma concentration (0.3–5  $\mu\text{g/mL}$ ) (25). This is a distinctive attribute in managing local symptoms, while minimizing the potential risk of systemic side-effects.

Topical administration at the site of the inflammation is usually the most effective route because a much higher concentration of the drug can be attained. The percutaneous absorption profile permits the evaluation of the margin of safety of a given compound that is incorporated in a designed topical formulation designed. It is known that the SC is the primary barrier against drug penetration therefore, the amount of KT absorbed percutaneously is assumed to be that

from the epidermis, the dermis and the amount in the receptor medium.

From results obtained in KT skin distribution studies, it becomes apparent that the SC is the predominant barrier to KT penetration through the skin. It seems that C940-HG facilitated KT diffusion to the next layer of skin, the epidermis, in which the drug remained more retained. This finding was not surprising due to the highly hydrophilic nature of KT; both, the drug and the vehicle are hydrophilic compounds. Hence, it is expected that the drug remained bounded to the vehicle instead of diffusing through the skin. It might be a low vehicle-skin partition coefficient owing to the physical-chemistry properties of the drug and the vehicle. It is remarkable that for topical delivery systems, accumulation in the skin with minimal permeation is desired, in our case, anti-inflammatory drug, this is an important premise for a local inflammations at low doses (32).

The relevant anti-inflammatory efficacy of KT-P407-HG revealed that KT-P407-HG applied on the mouse ear possesses enough ability to provide sufficient bioavailability KT to reach easily the site of action. Although no differences in KT skin accumulation were found between formulations when HGs were added to the human skin in the percutaneous absorption experiment, under *in vivo* conditions, the topical anti-inflammatory efficiency of KT-P407-HG revealed a higher anti-inflammatory efficacy than KT-C940-HG. These differences observed between *ex vivo* and *in vivo* experiments may be explained by the absence of blood flow and metabolism *ex vivo* (4). Furthermore, the viable skin acts as a local reservoir filled with the carrier-associated drug for *in vivo* conditions. This reservoir is partially identical to the site of the desired biological action (33).

The inflammation process attract immune system cell to the affected tissue, blood vessels expand and become more porous allowing cells to leave the circulatory system and enter the damaged tissue. The histological results confirmed the *in vivo* anti-inflammatory efficacy showing that KT-P407-HG resulted in a more reduction of inflammation than KT-C940-HG.

In order to assess potential changes due to the formulation, variations in the skins properties were studied by biometrological techniques. TEWL measurement due to passive diffusion of water through the skin gives important information about skin barrier function (34). The SCH determined as conductance that the free water provides to the skin surface (35).

The skin barrier function is known to reside in the SC. P407 is widely used in medicine and biotechnology as biocompatible surfactant. Thus based on the higher anti-inflammatory efficacy results of KT-P407-HG let us hypothesize a higher permeation through skin by modification of SC by decreasing lipid order (36–38). It could explain the slight change in TEWL (Fig. 6B), which was evident in SCH values

(Fig. 6C). Besides, HGs are formed by water absorption; the polymer absorbs water and swells forming a three-dimensional net structure. Therefore, the decrease of SCH for KT-C940-HG could be due to the capture of water from the skin surface.

## CONCLUSIONS

Two HG systems loading KT have been elaborated for the local treatment of inflammation. These formulations were stable HGs with suitable physical properties for topical application.

The *in vitro* release studies demonstrated a fast release profile of KT. Although KT-P407-HG presented higher permeated and retained amounts in the skin, no theoretical systemic plasma concentrations were predicted to be reached. However, the skin layer distribution of KT showed that C940-HG diffused to deeper layers of the human skin. KT-P407-HG was the formulation with optimal anti-inflammatory efficacy. Finally, formulations did not cause any irritant effects, and were well tolerated. For these reason KT-P407-HG was proposed as suitable formulation for anti-inflammatory local treatment without theoretical systemic side effect. However, additional *in vivo* studies should be addressed assessing the *in vivo* bioavailability of KT after dermal treatment of our formulation.

## ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURES

This work was supported by the Ministry of Science and Innovation of Spain for the financial (MAT2014-59134R). Prof. Juan Blasí and Inmaculada Gómez de Aranda from the Department of Pathology and Experimental Therapeutics are also acknowledged for their excellent technical support in histological studies. The authors report no conflict of interests, financial or otherwise. All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

## REFERENCES

1. De Oliveira Jr GS, Agarwal D, Benzon HT. Perioperative single dose ketorolac to prevent postoperative pain: ameta-analysis of randomized trials. *Anesth Analg*. 2012;114(2):424–33.

2. El-Setouhy DA, El-Ashmony SM. Ketorolac trometamol topical formulations: release behaviour, physical characterization, skin permeation, efficacy and gastric safety. *J Pharm Pharmacol*. 2010;62(1):25–34.
3. Ting WW, Vest CD, Sonthheimer RD. Review of traditional and novel modalities that enhance the permeability of local therapeutics across the stratum corneum. *Int J Dermatol*. 2004;43(7):538–47.
4. Vega E, Egea MA, Garduño-Ramírez ML, García ML, Sánchez E, Espina M, Calpena AC. Flurbiprofen PLGA-PEG nanospheres: role of hydroxy- $\beta$ -cyclodextrin on ex vivo human skin permeation and in vivo topical anti-inflammatory efficacy. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2013;110:339–46.
5. Koop HS, de Freitas RA, de Souza MM, Savi-Jr R, Silveira JL. Topical curcumin-loaded hydrogels obtained using galactomannan from *Schizolobium Parahybae* and xanthan. *Carbohydr Polym*. 2015;116:229–36.
6. Guvendiren M, Lu HD, Burdick JA. Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. *Soft Matter*. 2012;8:260e272.
7. Ahmed EM. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review. *J Adv Res*. 2015;6(2):105–21.
8. Hoare TR, Kohane DS. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. *Polymer*. 2008;49:1993–2007.
9. Miguel SP, Ribeiro MP, Brancel H, Coutinho P, Correia JJ. Thermoresponsive chitosan-agarose hydrogel for skin regeneration. *Carbohydr Polym*. 2014;111:366–73.
10. de Araújo DR, da Silva DC, Barbosa RM, Franz-Montan M, Cereda CM, Padula C, et al. Strategies for delivering local anesthetics to the skin: focus on liposomes, solid lipid nanoparticles, hydrogels and patches. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013;10(11):1551–63.
11. Brugués AP, Naveros BC, Calpena Campmany AC, Pastor PH, Saladrigas RF, Lizandra CR. Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions. *Nanomedicine (London)*. 2015;10(2):227–40.
12. Chawla V, Saraf SA. Rheological studies on solid lipid nanoparticle based carbopol gels of aceclofenac. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2012;92:293–8.
13. Das B, Nayak AK, Nanda U. Topical gels of lidocaine HCl using cashew gum and Carbopol 940: preparation and in vitro skin permeation. *Int J Biol Macromol*. 2013;62:514–7.
14. ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: ICH; 2005.
15. Guidance document for the conduct of skin absorption studies. OECD series on testing and assessment No.28. Paris: OECD; 2004.
16. Skin absorption: in vitro Method. OECD guideline for the testing of chemicals. Guideline 428. Paris: OECD; 2004.
17. Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. SCCS/1358. Brussels: Scientific Committee on Consumer Safety; 2010.
18. Williams AC. Transdermal and topical drug delivery. London: Pharmaceutical Press; 2003.
19. Flo A, Calpena AC, Halbaut L, Araya EI, Fernández F, Clares B. Melatonin delivery: transdermal and transbuccal evaluation in different vehicles. *Pharm Res*. 2016;33(7):1615–27.
20. Alonso C, Lucas R, Barba C, Martí M, Rubio L, Comelles F, et al. Skin delivery of antioxidant surfactants based on gallic acid and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol*. 2015;67(7):900–8.
21. Domínguez-Villegas V, Clares-Naveros B, García-López ML, Calpena-Campmany AC, Bustos-Zagal P, Garduño-Ramírez ML. Development and characterization of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from *Eysenhardtia Platycarpa*. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2014;116:183–92.
22. World medical association. World medical association declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191–4.
23. Clarys P, Clijsen R, Taeymans J, Barel AO. Hydration measurements of the stratum corneum: comparison between the capacitance method (digital version of the Corneometer CM 825(R)) and the impedance method (Skicon-200EX(R)). *Skin Res Technol*. 2012;18(3):316–23.
24. Lee SG, Kim SR, Cho HI, Kang MH, Yeom DW, Lee SH, Lee S, Choi YW. Hydrogel-based ultra-moisturizing cream formulation for skin hydration and enhanced dermal drug delivery. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(10):1674–82.
25. Cordero JA, Alarcon L, Escribano E, Obach R, Domenech J. A comparative study of the transdermal penetration of a series of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Pharm Sci*. 1997;86(4):503–8.
26. Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naik A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharm Sci*. 2006;9(3):339–58.
27. Sierra AF, Ramírez ML, Campmany AC, Martínez AR, Naveros BC. In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. *J Dermatol Sci*. 2013;69(3):202–14.
28. Tang C, Yin L, Pei Y, Zhang M, Wu L. New superporous hydrogels composites based on aqueous carbopol® solution (SPHCs): synthesis, characterization and in vitro bioadhesive force studies. *Eur Polym J*. 2005;43(3):557–62.
29. Dong L, Liu C, Cun D, Fang L. The effect of rheological behavior and microstructure of the emulgels on the release and permeation profiles of Terpinen-4-ol. *Eur J Pharm Sci*. 2015;78:140–50.
30. Dewan M, Bhowmik B, Sarkar G, Rana D, Bain MK, Bhowmik M, et al. Effect of methyl cellulose on gelation behavior and drug release from poloxamer based ophthalmic formulations. *Int J Biol Macromol*. 2015;72:706–10.
31. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumel JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res*. 2006;23(12):2709–28.
32. Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Lobo JM. Pluronic F-127 and pluronic lecithin organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs. *J Pharm Pharm Sci*. 2012;15(4):592–605.
33. Cevc G, Blume G. Biological activity and characteristics of triamcinolone-acetonide formulated with the self-regulating drug carriers. *Transfersomes Biochim Biophys Acta*. 2003;1614(2):156–64.
34. Mohammed D, Hirata K, Hadgraft J, Lane ME. Influence of skin penetration enhancers on skin barrier function and skin protease activity. *Eur J Pharm Sci*. 2014;51:118–22.
35. del Pozo A, Viscasillas A. Efficacy evaluation. In: Salvador A, Chisvert A, editors. *Analysis of cosmetic products*. Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 462–74.
36. Shin SC, Cho CW, Oh JJ. Effects of non-ionic surfactants as permeation enhancers towards piroxicam from the poloxamer gel through rat skins. *Int J Pharm*. 2001;222(2):199–203.
37. Erukova VY, Krylova OO, Antonenko YN, Melik-Nubarov NS. Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer lipid membranes to small solutes including doxorubicin. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1468(1–2):73–86.
38. Demina T, Grozdova I, Krylova O, Zhirmov A, Istratov V, Frey H, et al. Relationship between the structure of amphiphilic copolymers and their ability to disturb lipid bilayers. *Biochemistry*. 2005;44(10):4042–54.