



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Aportación al estudio de permeación transdérmica de cetirizina

Claudia Paola Ciurlizza Celis



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartiqual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartiqual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.**



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

DEPARTAMENTO DE
FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA Y FISICOQUÍMICA

**APORTACIÓN AL ESTUDIO DE PERMEACIÓN
TRANSDÉRMICA DE CETIRIZINA**

CLAUDIA PAOLA CIURLIZZA CELIS, 2017



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO
INVESTIGACIÓN DESARROLLO Y CONTROL DE MEDICAMENTOS

APORTACIÓN AL ESTUDIO DE PERMEACIÓN TRANSDÉRMICA DE CETIRIZINA

Memoria presentada por Claudia Paola Ciurlizza Celis para optar al título de doctor por
la Universidad de Barcelona

Directores

Dra. Ana C. Calpena Campmany

Dr. Francisco Fernández Campos

Doctoranda
Claudia Paola Ciurlizza Celis

Tutora
Dra. Ana C. Calpena Campmany

CLAUDIA PAOLA CIURLIZZA CELIS, 2017

A mi madre

“En la vida hay algo peor que el fracaso: el no haber intentado nada”

Franklin D. Roosevelt

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Han sido muchos años de esfuerzo y dedicación para llegar a este momento tan esperado. Muchas veces pensé que este día nunca llegaría.

En primer lugar, quisiera agradecer a la Dra. Ana Calpena y el Dr. Francisco Fernández Campos, directores del presente trabajo, por la dedicación, confianza, amistad y ánimos que me han dado a lo largo de todos estos años.

Al Dr. Josep Doménech por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en la unidad de Biofarmacia y Farmacocinética.

A los demás miembros de la Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética, Dr. Antoni Boix, Dra. Helena Colom, Dr. Jacinto Lauroba, Dra. Elvira Escribano, que siempre han estado dispuestos a ayudarme en cualquier duda que se me haya podido presentar.

Al Colegio de Farmacéuticos de Barcelona por la beca concedida el curso 2006-2007 para poder llevar a cabo parte de los estudios de la presente tesis.

A Lili, Mónica, Meritxell, Xantal, Montse, Xavi, Sonia y todas aquellas personas que han pasado por la Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética a lo largo de todos estos años, por su ayuda y por los momentos compartidos.

A Violeta (D.E.P) y Esther, por su amistad y los ánimos que siempre me han dado para acabar la tesis.

En especial a Fernando, por su comprensión, paciencia y tolerancia que siempre ha tenido conmigo, en especial en aquellos momentos de estrés, así como por los ánimos que me ha dado en todo momento.

A mi familia, en especial a mi madre, Angélica y a mis hermanos, Carlo, Carmen, Sandra y Carla por su amor y apoyo incondicional a pesar de estar lejos.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1	INTRODUCCION	3
1.1	ALERGIA	3
1.1.1	Antecedentes	3
1.1.2	El sistema inmunitario	4
1.1.3	Tipos de reacciones alérgicas:.....	7
1.1.4	Diagnóstico	11
1.1.5	Prevención y tratamiento	12
1.1.6	Cetirizina.....	21
1.2	MICROEMULSIONES Y NANOEMULSIONES.....	25
1.2.1	Concepto y denominación.....	25
1.2.2	Selección de los componentes de las microemulsiones y nanoemulsiones	27
1.2.3	Estructura y técnicas de caracterización	29
1.2.4	Propiedades físico-químicas	33
1.2.5	Vías de administración de las microemulsiones y nanoemulsiones	34
1.2.6	Ventajas de las microemulsiones y nanoemulsiones	36
1.3	PIEL.....	38
1.3.1	Fisiología de la piel	38
1.3.2	La piel como vía de administración de fármacos.....	41
1.3.3	Vías de penetración a través de la piel.....	42
1.3.4	Proceso de permeación cutánea	43
1.3.5	Factores que influyen en la absorción percutánea	44
1.3.6	Ecuaciones que definen las cinéticas de penetración transdérmica	55
1.4	REDES NEURONALES.....	58
1.4.1	Elementos de proceso que componen las RNA	58
1.4.2	Características de las RNA	59
1.4.3	Redes neuronales con activación hacia adelante.....	61
1.4.4	Aplicaciones de las Redes Neuronales.....	62
2	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	69

3	MATERIAL Y MÉTODOS	75
3.1	MATERIAL	75
3.1.1	Fármacos	75
3.1.2	Excipientes	75
3.1.3	Promotores de la permeación cutánea.....	76
3.1.4	Reactivos químicos	77
3.1.5	Reactivos biológicos	77
3.1.6	Soluciones	77
3.1.7	Formulaciones farmacéuticas.....	78
3.1.8	Aparatos	80
3.2	MÉTODOS.....	94
3.2.1	Metódica analítica	94
3.2.2	Validación de las metódicas analíticas.....	94
3.2.3	Preparación de las formulaciones farmacéuticas	98
3.2.4	Caracterización fisicoquímica de las formulaciones.....	101
3.2.5	Estudios de estabilidad de las formulaciones.....	104
3.2.6	Estudios de permeación transdérmica de cetirizina en piel humana.....	104
3.2.7	Estudios de liberación del hidrogel y la nanoemulsión de cetirizina diclorhidrato in vitro.....	109
3.2.8	Estudio de retención de cetirizina en las formulaciones nanoestructuradas: hidrogel y nanoemulsión.....	110
3.2.9	Prueba de la actividad antihistamínica de hidrogeles y nanoemulsiones de cetirizina en conejos albinos.....	111
3.2.10	Búsqueda y selección de formulaciones transdérmicas de cetirizina con la ayuda de Redes Neuronales.....	112
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	121
4.1	VALIDACIÓN DE LA METÓDICA ANALÍTICA	121

4.1.1 Validación de la metodica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) para los estudios de absorción percutánea.....	121
4.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS NANOEMULSIONES	126
4.2.1 Determinación del tamaño de gota.....	126
4.2.2 Observación de la nanoemulsión por Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)	127
4.2.3 Determinación del pH	128
4.2.4 Determinación de la viscosidad	128
4.3 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROGEL DE CETIRIZINA	130
4.3.1 Determinación del pH	130
4.3.2 Determinación de la viscosidad	130
4.4 ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL HIDROGEL Y DE LA NANOEMULSIÓN DE CETIRIZINA DICLORHIDRATO.....	131
4.4.1 Análisis de la retrodispersión de la luz del hidrogel de cetirizina	132
4.4.2 Análisis de la retrodispersión de la luz de la nanoemulsión	132
4.5 ESTUDIOS DE PERMEACIÓN TRANSDÉRMICA DE CETIRIZINA EN PIEL HUMANA	133
4.5.1 Permeación intrínseca de cetirizina base y cetirizina diclorhidrato en propilenglicol/agua (50:50) y en etanol/agua (50:50)	134
4.5.2 Estudios de permeación transdérmica en piel humana de diferentes formulaciones al 5% de cetirizina diclorhidrato con 10% de distintos promotores (Screening de promotores)	139
4.6 ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DEL HIDROGEL Y LA NANOEMULSIÓN DE CETIRIZINA DICLORHIDRATO IN VITRO	179
4.7 ESTUDIO DE RETENCIÓN DEL HIDROGEL Y DE LA NANOEMULSIÓN DE CETIRIZINA.....	180
4.8 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIHISTAMÍNICA DE HIDROGELES Y NANOEMULSIONES DE CETIRIZINA DICLORHIDRATO EN CONEJOS MACHOS ALBINOS.....	181

4.9	BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE FORMULACIONES TRANSDÉRMICAS DE CETIRIZINA CON AYUDA DE REDES NEURONALES ARTIFICIALES (RNA).....	183
5	CONCLUSIONES	191
6	BIBLIOGRAFÍA	195
7	INDICE DE FIGURAS	219
8	ÍNDICE DE TABLAS	225
9	ANEXO: ARTICULO REVISTA ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, OCTUBRE 2014.....	231

RESUMEN

Actualmente los antihistamínicos son muy utilizados en el tratamiento de patologías relacionadas con procesos alérgicos, tanto aplicados directamente sobre la piel para obtener un efecto local, como administrados por vía oral. Sin embargo, en el transcurso de los últimos años, se ha puesto de manifiesto que puede utilizarse la piel como vía de administración de fármacos, formulados de tal forma que el principio activo desarrolle una acción sistémica. Así pues, el empleo de la vía dérmica y de la transdérmica como alternativa a la vía oral, ha dado lugar a un avance en cuanto al conocimiento de la estructura de la piel y en cuanto a los mecanismos de transporte de sustancias a través de ella. Cabe considerar que una de las líneas de investigación aplicada en el campo de la industria farmacéutica es el diseño de nuevos sistemas de liberación de fármacos sobre la piel (parches transdérmicos, liposomas, microemulsiones, nanoemulsiones, etc), que contienen excipientes novedosos y promotores de la permeación cutánea que permitan alcanzar el objetivo deseado: liberación local, regional o transdérmica del fármaco.

Por lo tanto, resulta interesante estudiar las características de permeación cutánea de la cetirizina en piel humana, vehiculizada en sistemas de liberación nanoestructurados destinados al tratamiento de alteraciones patológicas locales que cursen con procesos alérgicos.

Así pues, el objetivo principal del presente proyecto de tesis consiste, en la obtención de formulaciones nanoestructuradas de cetirizina (hidrogel y nanoemulsión) con el fin de obtener un efecto antihistamínico local, por un lado, y un efecto sistémico por el otro.

Para llevar a cabo este objetivo, se realiza un estudio “ex vivo” de la absorción transdérmica de cetirizina con distintos promotores, así, también se optimizan las formulaciones por medio de redes neuronales con el fin de obtener concentraciones plasmáticas predichas dentro del intervalo terapéutico, por último, se desarrolla y evalúa una formulación nanoestructurada de cetirizina para la obtención de un efecto local tópico sobre la piel.

El estudio de permeación transdérmica del hidrogel y de la nanoemulsión al 5% de cetirizina, demostró que sólo la nanoemulsión penetró a través de la piel después de 19h de la aplicación tópica, a pesar de esto, el flujo, el tiempo de latencia y el coeficiente de permeabilidad resultaron ser bajos. Pequeñas cantidades de la dosis tópica aplicada son absorbidas y las concentraciones séricas están significativamente por debajo del rango terapéutico (0,257-0,384 µg/ml). Parece que la aplicación tópica de cetirizina es óptima sólo para un efecto de aplicación local.

La velocidad de liberación de cetirizina para las nanoemulsiones fueron estadísticamente más bajas cuando se compararon con los hidrogeles. Ambos vehículos proporcionaron una liberación sostenida de cetirizina, siendo los hidrogeles los más adecuados, ya que se alcanzó un 75% de fármaco liberado en 6 horas.

En el estudio de la actividad antihistamínica del hidrogel y de la nanoemulsión de cetirizina en conejos, estadísticamente no se observaron diferencias, pero se pudo observar que el hidrogel demostró el efecto máximo en 30 min. El antihistamínico comercial, la dexclorfeniramina, exhibió levemente mayor reducción de la pápula que el hidrogel de cetirizina (14,12 y 12,60%), seguida por el dimetindeno maleato (9,02%) y finalmente la nanemulsión (8,32%).

En la búsqueda y selección de formulaciones transdérmicas de cetirizina con ayuda de redes neuronales artificiales, se construyó un test de 89 vectores de entrada, $x_i \in \mathbb{R}^{18}$, donde cada x_i representa la composición de una formulación propuesta en términos de 18 constituyentes (agua, propilenglicol, transcutol, isostearato, etc.), como en el conjunto de entrenamiento. Las veintiuna redes entrenadas se aplicaron a las entradas de test para predecir los valores de las cuatro características (J ($\mu\text{g}/\text{h}$), T_l (h), K_p (cm/h) y C_{ee} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)) para cada nueva formulación. A partir de estas predicciones, se seleccionaron siete formulaciones candidatas para las que al menos el 50% de las redes (incluyendo la lineal) predijeron resultados satisfactorios, y en dos de ellas (las más prometedoras) al menos el 75% de las redes coincidieron.

Actualmente no existe en el mercado farmacéutico antihistamínicos de segunda generación disponibles para ser administrados por vía tópica, por lo que se puede concluir de acuerdo con los estudios realizados en este proyecto de tesis, que la nanoemulsión de cetirizina diclorhidrato es un sistema prometedor para el tratamiento de alergias producidas en la piel.

1. INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCION

1.1 ALERGIA

1.1.1 Antecedentes

El término “alergia” deriva de las palabras griegas *allos*, extraño, y *ergos*, reacción, y fue introducido en 1906 por el pediatra vienés Clemens von Pirquet. El término alergia se usó así para describir la reacción temprana de la piel a la vacuna por ántrax, encontrada 24 horas después de la inoculación, definiendo las reacciones de tipo anafiláctico a sustancias no tóxicas (Méndez, 2008).

La alergia es una respuesta exagerada (reacción de hipersensibilidad) del sistema inmunitario que identifica como nocivas determinadas sustancias inocuas (alérgenos), habitualmente toleradas por la mayoría de las personas. Esta respuesta inapropiada y equivocada produce una serie de alteraciones inflamatorias de la piel y mucosas, que originan los diferentes síntomas de las enfermedades alérgicas (Zubeldia, 2012).

La naturaleza de las reacciones alérgicas permaneció desconocida hasta el descubrimiento de la inmunoglobulina (IgE) por los Drs. Kimishige y Terumo Ishizaka, quienes identificaron a esta inmunoglobulina como el portador de la actividad reagínica en el suero de pacientes con fiebre del heno (Méndez, 2008).

Existen unos factores predisponentes genéticos y unos factores ambientales desencadenantes. Los antecedentes familiares son muy importantes. Se ha calculado, que si uno de los progenitores es alérgico, la probabilidad de que el niño padezca alergia es aproximadamente del 50%. Si los dos progenitores son alérgicos, la probabilidad se acerca al 70% (Zubeldia, 2012).

Existen muchos tipos de alérgenos:

- Inhalados o aero alérgenos (pólenes, ácaros, epitelios de animales, etc.).
- Alimentarios (proteínas de leche de vaca, huevo, frutas, frutos secos, etc.).
- Fármacos (antibióticos, antiinflamatorios, anestésicos, etc.).
- De contacto (níquel, cromo, perfumes, etc.).

1. INTRODUCCIÓN

- Ocupacionales o laborales (látex, harina de trigo, etc.).
- Veneno de insectos (abeja, avispa, etc.).

1.1.2 El sistema inmunitario

El sistema inmunológico se ha desarrollado durante la evolución a lo largo de millones de años y constituye la defensa del organismo contra virus, bacterias y otros invasores, así como también contra células malignas (Cardona, 2010).

Debemos tener en cuenta que el sistema inmune, como lo entendemos, constituye la segunda y tercera línea de la defensa del cuerpo. La primera línea de defensa está compuesta por varias barreras físicas, como la piel y las membranas mucosas, los ácidos grasos de la piel, el pH ácido del estómago, las enzimas y moléculas microbicidas secretadas por varios tipos de células, algunos microorganismos que residen en el organismo y las células que atacan de forma inespecífica a los organismos infecciosos.

Cuando los microorganismos rompen las barreras de la primera línea de defensa, se enfrentan con la segunda, el sistema inmune innato y, si esto no es suficiente, con la tercera, el sistema inmune adaptativo (Grammer, 2011).

El sistema inmune innato está representado por los monocitos/macrófagos, los granulocitos y las llamadas células asesinas naturales (natural killer, NK). El componente humoral consta de proteínas de fase aguda y del sistema del complemento.

El sistema inmune adaptativo comprende las líneas celulares de los linfocitos (LT y LB) y el componente humoral con los anticuerpos específicos. Existen, al menos, cinco características que definen la respuesta inmune adaptativa. Primero, las respuestas son específicas para distintos antígenos o patógenos; segundo, las respuestas son diversas; tercero, luego de la exposición inicial a un antígeno, las respuestas guardan un recuerdo, con lo cual, ante una nueva exposición al antígeno, se genera una respuesta inmune más fuerte, larga y efectiva; cuarto, la mayor parte de las respuestas inmunes son auto limitadas luego de la eliminación del antígeno. Finalmente, la respuesta inmune permite distinguir el propio organismo de organismos distintos (Cardona, 2010).

1.1.2.1 El papel del sistema inmunitario en la alergia

Una de las funciones del sistema inmunitario es la capacidad de distinguir, dentro de lo ajeno, aquello que no supone ninguna amenaza para el organismo que está defendiendo. Y es precisamente este matiz, tan importante, el que falla en la alergia. Como consecuencia de esta alteración del sistema inmunitario, y al encontrarse distribuido por todo el organismo, las enfermedades alérgicas pueden producir síntomas en cualquier órgano del cuerpo, aunque sean más frecuentes los problemas respiratorios, digestivos o de la piel, debido a que éstas son las zonas de mayor contacto con los agentes externos (Zubeldia, 2012).

Las reacciones de hipersensibilidad pueden clasificarse de acuerdo a los mecanismos celulares y moleculares implicados en el desarrollo de cada una de ellas, y dependiendo del tiempo transcurrido en un individuo sensibilizado entre el contacto con el alérgeno y el comienzo de la reacción inmunológica que provoca la inflamación. Así las características clínicas de cada tipo de hipersensibilidad son el reflejo de la respuesta inmunológica que causó la inflamación del tejido, pues cada una de ellas induce un patrón propio de inflamación. No obstante, la mayoría de las respuestas alérgicas o de hipersensibilidad son multifásicas, y se combinan diversos elementos de la respuesta inmune en la cascada de reacciones de hipersensibilidad. A grandes rasgos se pueden distinguir los siguientes tipos:

a. Hipersensibilidad inmediata :

La hipersensibilidad inmediata se caracteriza por una respuesta inflamatoria de instalación rápida, que está mediada por la reacción de un alérgeno con su anticuerpo específico del isotipo IgE, anticuerpo que se encuentra unido a los receptores de alta afinidad para la IgE de la superficie de los mastocitos y basófilos. Esta interacción causa la liberación de ciertos mediadores antiinflamatorios preformados (histamina, serotonina y factores quimiotácticos) y genera otros mediadores de novo (derivados del ácido araquidónico, como leucotrienos y prostaglandinas, y análogos del acetyl-glicerol-éter de la fosfatidilcolina).

La histamina es una potente amina vasoactiva, que se almacena preformada en los gránulos de los mastocitos y basófilos; una vez liberada, se difunde rápidamente en los tejidos gracias a su bajo peso molecular, para ejercer su actividad biológica, al unirse a receptores altamente

1. INTRODUCCIÓN

específicos presentes en la membrana celular (receptores H1 y H2). Los receptores H1 se encuentran en el músculo liso del endotelio y de los bronquios, en células calciformes y en la mucosa gastrointestinal. En el endotelio vascular, la histamina media la triple respuesta de Lewis: vasodilatación periférica, vasoconstricción central y aumento de la permeabilidad vascular con edema. Estos fenómenos se traducen clínicamente en las vías respiratorias, en obstrucción nasal, prurito, aumento de la secreción de moco y broncoconstricción. Además, la histamina estimula los nervios aferentes, lo que provoca un reflejo axonal con liberación local de neuropéptidos, lo que todavía provoca una mayor degranulación mastocitaria.

Otras acciones adjudicadas a la histamina son: inducción de la producción de otros mediadores proinflamatorios; quimiotaxis de eosinófilos; modulación de la actividad de las células dendríticas y los linfocitos T y B (Cardona, 2010).

b. La sensibilización :

Cuando un antígeno irrumpe por primera vez en el organismo, la probabilidad de células del sistema inmune para reconocerlo es muy baja; se requiere, entonces, que el antígeno sea procesado por las células presentadoras de antígeno (CPA), como macrófagos, células dendríticas o linfocitos B, para que sus epítomos antigénicos sean efectivamente presentados a los linfocitos T. Cuando esto ocurre, el linfocito T se activa, prolifera para formar una clona y despliega sus funciones efectoras secretando citocinas y expresando moléculas de superficie. En conjunto, todas estas moléculas estimulan los linfocitos B para que se activen y secreten inmunoglobulinas, o bien dirigen las respuestas de hipersensibilidad retardada (TDH). Desde entonces, el individuo queda inmunizado contra el antígeno o, en el caso de las reacciones alérgicas, queda “sensibilizado” contra un alérgeno específico (Figura 1.1).

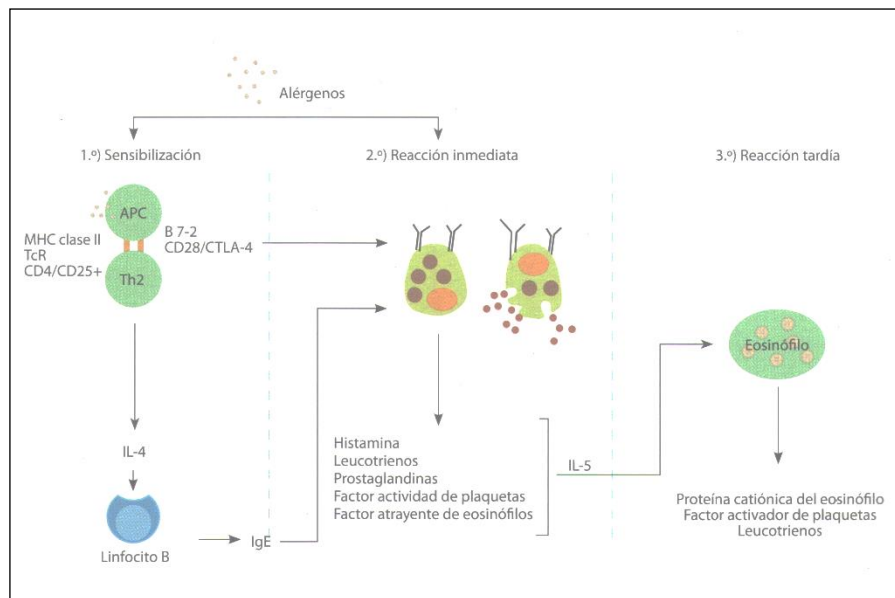


Figura 1.1. Mecanismo de la reacción alérgica (Zubeldia, 2012)

c. Reacciones de hipersensibilidad retardada :

Están mediadas por células ya sensibilizadas y aparecen de forma retardada (después de varios días, como una inflamación crónica). El ejemplo sería la dermatitis de contacto causada por metales.

Una vez que se produce la sensibilización, el individuo permanece asintomático, hasta que se produzca una nueva exposición al alérgeno contra el que se sensibilizó; desde ese momento, la reacción del alérgeno con el anticuerpo específico o linfocito T efector provocará una respuesta inflamatoria anormal, que desencadena en los síntomas y signos de una reacción alérgica (Cardona, 2010).

1.1.3 Tipos de reacciones alérgicas:

1.1.3.1 Reacciones sistémicas

La anafilaxia es la manifestación clínica de hipersensibilidad inmediata. Se define como una “reacción alérgica grave que se desencadena rápidamente y puede causar la muerte”. Este efecto adverso se produce repentinamente, de forma drástica e inesperada.

El inicio y el curso de la anafilaxia varían enormemente entre las personas. Los síntomas típicamente aparecen 5 a 60 minutos después de la exposición desencadenante. Pueden presentarse muchos signos y síntomas, y diferenciarse entre individuos y de un episodio al otro. La anafilaxia es la forma más grave de alergia y es una verdadera emergencia médica. La muerte puede ocurrir de repente por edema de las vías respiratorias superiores y asfixia, broncoespasmo irreversible o colapso vascular irreversible.

Las manifestaciones cutáneas incluyen urticaria y angioedema, por lo general, con una duración inferior a 24 horas, a menudo precedidas por prurito, enrojecimiento (quemadura de la piel) y una sensación de mortalidad inminente. Las manifestaciones respiratorias incluyen disnea, sibilancias y opresión en el pecho. La dificultad para hablar o tragar es el resultado del edema orofaríngeo y/o laríngeo. El fallo respiratorio puede producirse por obstrucción del flujo de aire, edema pulmonar o síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), en cuyo caso, el gasto cardíaco elevado inicialmente se reduce, la permeabilidad capilar aumenta causando hipovolemia y colapso cardiovascular. Las manifestaciones gastrointestinales son náuseas, vómitos, diarrea intensa (algunas veces, con sangre) y retortijones en el abdomen. Las manifestaciones neurológicas de confusión, vértigo, síncope, convulsiones y pérdida de conocimiento pueden ocurrir como consecuencia de la hipoperfusión cerebral o como un efecto tóxico directo de la liberación del mediador (Grammer, 2011).

Las causas más habituales de la anafilaxia son los medicamentos, los alimentos y las picaduras de abejas y avispas. En los adultos, la principal causa son los fármacos, y entre ellos destacan los antibióticos como las penicilinas y sus derivados, seguidos en frecuencia por la aspirina y los antiinflamatorios. El segundo lugar lo ocupan los alimentos, entre los cuales destacan las frutas como el melocotón, los frutos secos, y el marisco. En los niños, el desencadenante más común son alimentos como el huevo, la leche, los frutos secos, el pescado y el marisco (Zubeldia, 2012).

1.1.3.2 Reacciones locales

a. Atopia

Desde hace más de un siglo se conoce que las enfermedades alérgicas presentan una base genética. Se ha empleado el término atopia, que engloba el asma alérgica, la rinitis alérgica y la dermatitis atópica, para definir una predisposición genética a responder frente a antígenos ambientales comunes, de carácter inocuo, con la producción de cantidades significativas de

anticuerpos específicos de la clase IgE. Dentro de los fenotipos atópicos existe una gran variabilidad de manifestaciones, desde una sensibilización subclínica (pero susceptible de ser heredada), hasta, por ejemplo, un asma grave (Méndez, 2008; Cardona, 2010).

b. Dermatitis alérgica de contacto

Consiste en una reacción inflamatoria cutánea que puede ser de tipo inmunológico o no inmunológico, tras el contacto con agentes exógenos de tipo irritante o bien haptenos (sustancias químicas que unidas a una proteína “carrier” es capaz de desencadenar una respuesta alérgica). Es difícil distinguir entre ambas entidades, tanto en el ámbito clínico como histológico, y solamente la demostración de una reacción de tipo inmune retardado frente al alérgeno puede distinguirlas.

Los acontecimientos fisiopatológicos que están implicados en el desarrollo de la dermatitis por contacto de tipo alérgico son: penetración del alérgeno a través de la barrera cutánea, interacción con las células epidérmicas o dérmicas, interacción con el sistema inmune y respuesta antiinflamatoria.

La presentación de una dermatitis por contacto puede ser aguda o crónica. El proceso agudo se inicia con eritema y edema muy intensos, seguidos de vesiculación y prurito muy importante. Estas vesículas pueden confluir y llegar a formar ampollas según el grado de severidad del contacto con el alérgeno. Al poco tiempo estas vesículas se rompen y exudan un líquido seroso; posteriormente se secan y forman costras y descamación de tipo laminar. El proceso se resuelve a las pocas semanas sin dejar cicatriz. En la etapa crónica hay pocas lesiones papulovesiculares y predominan la hinchazón, la liquenificación y la rugosidad (Cardona, 2010; Grammer, 2011).

c. Conjuntivitis y rinitis alérgica

La alergia ocular engloba en su sentido más amplio a todas las enfermedades ocasionadas por un mecanismo inmunológico que afecta a cualquiera de las estructuras oculares: párpados, conjuntiva, córnea, cristalino, esclerótica y retina.

Las enfermedades conjuntivales de tipo alérgico más frecuentes son (Méndez, 2008):

- Conjuntivitis alérgica
- Queratoconjuntivitis vernal
- Queratoconjuntivitis atópica
- Conjuntivitis papilar gigante
- Dermatoconjuntivitis de contacto

Normalmente, la conjuntivitis alérgica aguda es fácil de reconocer. El prurito es siempre una característica destacada. Frotarse los ojos intensifica los síntomas. La afectación es casi siempre bilateral. Sin embargo, puede producirse conjuntivitis alérgica aguda unilateral a causa de la contaminación manual de la conjuntiva con alérgenos como comidas o caspa de animales. En algunos casos, los signos oculares son mínimos, a pesar de que haya prurito. La conjuntiva puede estar enrojecida y edematosa. En casos graves, el ojo puede estar hinchado.

La conjuntivitis alérgica raramente se produce sin que le acompañe una rinitis alérgica; los síntomas oculares pueden ser más intensos que los nasales y pueden ser el principal síntoma del paciente. La conjuntivitis alérgica también puede ser crónica. Los síntomas suelen ser menos intensos (Grammer, 2011).

La rinitis alérgica se define como la inflamación de la mucosa nasal, que se caracteriza por rinorrea, estornudos, congestión nasal y/o prurito nasal. Estos síntomas se presentan generalmente durante dos o más días consecutivos, por más de una hora la mayoría de los días, y son reversibles espontáneamente o con medicamentos. La rinitis alérgica se asocia, frecuentemente, con síntomas oculares como lagrimeo, prurito ocular, ojo rojo y síntomas laríngeos y óticos (Cardona, 2010; Zubeldia, 2012).

Las guías para la clasificación y tratamiento de la rinitis alérgica han permitido clasificar la enfermedad alérgica nasal como intermitente o persistente, y leve o moderada a grave. La rinitis intermitente se define en función de los síntomas presentes menos de 4 días a la semana durante menos de 4 semanas. Cuando los síntomas están presentes durante más de 4 días por semana y durante más de 4 semanas, se define como rinitis persistente. Los síntomas leves no afectan al sueño, ni impiden la participación en actividades diarias, deporte y ocio, ni interfieren con el trabajo o la escuela, y no se consideran molestos. Por el contrario, los síntomas moderados a graves alteran el sueño, interfieren con las actividades diarias,

deportivas y de ocio, afectan al trabajo y a las actividades escolares y se consideran problemáticos (Cardona, 2010; Grammer, 2011).

1.1.4 Diagnóstico

Las pruebas cutáneas han representado la herramienta diagnóstica primordial en la alergia desde su introducción en 1865 por Blackely, posteriormente la prueba intradérmica propuesta por Mantoux en 1908, también tuvo una rápida aplicación al diagnóstico, y luego por Lewis y Grant, quienes describieron la prueba de punción cutánea, en 1924 (Méndez, 2008; Cardona, 2010). Se deben realizar en pacientes con historia clínica sugestiva de enfermedad alérgica: rinitis, asma, dermatitis, urticaria, anafilaxia, alergia alimentaria, reacciones a medicamentos o a venenos de animales.

Por lo general, inicialmente se realiza la **prueba de punción cutánea** (prick test). Se preparan soluciones diluidas de extractos de polen (de árboles, césped, malezas), esporas de hongos, polvo, caspa de animales, venenos de insectos, alimentos y algunos fármacos. Se coloca sobre la cara anterior del antebrazo una gota de cada solución y luego se introduce con cuidado una aguja o lanceta a través de la gota en la epidermis. De esta forma, se permite que el extracto penetre y contacte directamente con las células responsables de las reacciones alérgicas. Si la persona es alérgica a una o más de esas sustancias, la piel reacciona con una pápula y un enrojecimiento a su alrededor (eritema): la pápula aparece como una prominencia ligeramente elevada, pálida, donde se ha realizado el pinchazo y en unos 15 o 20 minutos (Manual Merck, 2008; Cardona, 2010; Grammer, 2011; Zubeldia, 2012).

El diámetro del habón o pápula y el eritema es utilizado para evaluar la positividad de la prueba. El punto de corte en el que la prueba se indica como positiva, según la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica, es de 3 mm en el diámetro de la roncha y más de 10 mm en el diámetro del eritema.

Generalmente, las pruebas de *prick* suelen ser suficientes para detectar la mayoría de los casos de hipersensibilidad inmediata. No obstante, es posible que, para algunos alérgenos, o en personas con una sensibilización débil, las pruebas en *prick* sean insuficientes. En estos casos, se recomienda hacer **pruebas intradérmicas**, ya que son más sensibles que las anteriores. Éstas consisten en la inyección directa de extracto en la dermis, generalmente, se aplica en el brazo, con una aguja extremadamente fina, y se produce a la lectura de forma similar a como se hace en el *prick*, a los 15 o 20 minutos. Esta

técnica cuenta también con la ventaja de ser útil para investigar la hipersensibilidad de tipo tardío, si bien, para este caso habrá que hacer una nueva lectura a las 24, 48 e incluso 96 horas.

La **prueba epicutánea** (prueba del parche) o de contacto es utilizada para el estudio de reacciones alérgicas tipo IV o de hipersensibilidad tardía. Son útiles para hacer diagnóstico en dermatitis por contacto alérgico, alergia a inhalantes (ácaros y pólenes) y alimentos. Existen diferentes maneras para realizar esta prueba. La más utilizada consiste en un pequeño disco de polietileno de 10 mm, adherido a una cinta adhesiva que luego se pega en la espalda del paciente. La lectura se realiza a las 48 horas cuando se retira el parche y, luego, a las 96 horas (Cardona, 2010).

La **prueba radioalergoabsorbente** (RAST) se práctica cuando las pruebas cutáneas no pueden ser utilizadas, por ejemplo, si la erupción cutánea es generalizada. Esta prueba mide las concentraciones en sangre de diferentes tipos de IgE específicos para determinados alérgenos y de ese modo ayuda al médico a identificar el alérgeno (Manual Merck, 2008).

1.1.5 Prevención y tratamiento

El mejor tratamiento es evitar el alérgeno, en la medida de lo posible. Evitar un alérgeno puede suponer la suspensión de un fármaco, mantener un animal doméstico fuera de la casa, instalar filtros de aire de alta potencia o no consumir un alimento determinado. Una persona con alergias estacionales graves puede considerar la posibilidad de trasladarse a una zona donde no exista el alérgeno. Una persona con alergia al polvo casero debe retirar los objetos que acumulan polvo (Manual Merck, 2008).

Se puede intentar intervenir en el proceso patológico a distintos niveles (Lüllman, 2010) (Figura 1.2):

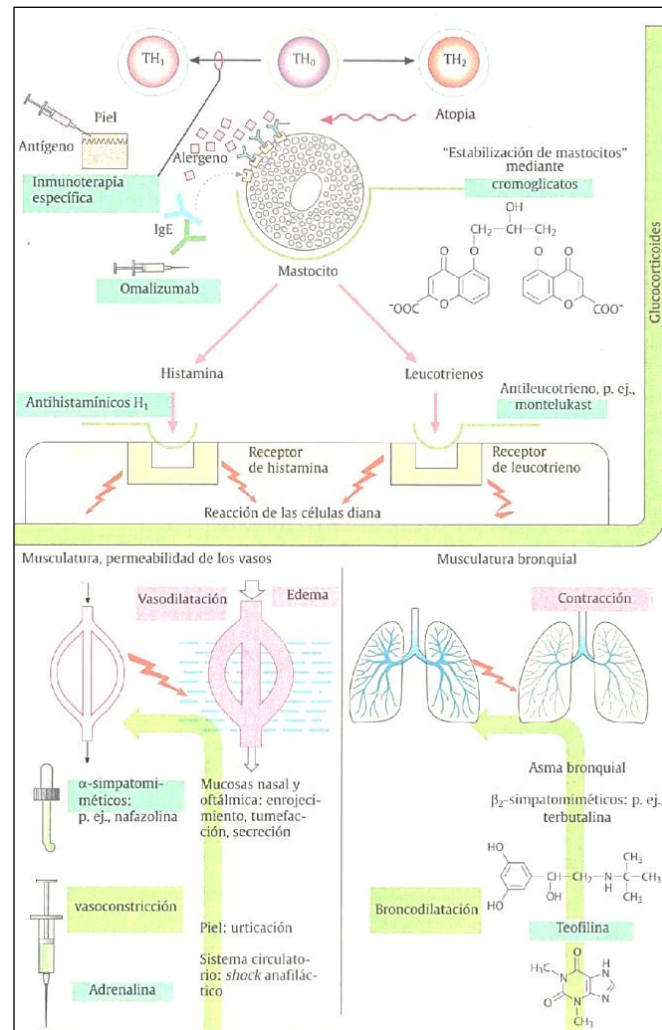


Figura 1.2. Atopía y terapia antialérgica (Lüllman, 2010)

1.1.5.1 Inmunoterapia

a. Terapia inmune específica con alérgenos.

Dado que no se pueden evitar algunos alérgenos, especialmente los que son transportados por el aire, se puede utilizar la inmunoterapia alérgica, popularmente denominada *inyecciones para la alergia*, para desensibilizar a una persona del alérgeno. Con la inmunoterapia alérgica, las reacciones alérgicas se pueden evitar o reducir en número o en intensidad. La inmunoterapia se utiliza con mayor frecuencia en las alergias al polen, a los ácaros del polvo de la casa, al veneno de los insectos y a la caspa de los animales.

Se inyectan debajo de la piel pequeñas cantidades del alérgeno. Se suele aplicar inyecciones una o dos veces por semana hasta alcanzar la dosis de mantenimiento. Luego se aplican las

inyecciones, generalmente, entre cada dos y seis semanas. El procedimiento es más efectivo cuando se continúan aplicando las inyecciones de mantenimiento durante todo el año (Manual Merck, 2008).

b. Inactivación de IgE.

Puede lograrse mediante el anticuerpo monoclonal recombinante humanizado *omalizumab*. Es un anticuerpo dirigido contra la IgE, para inhibir la respuesta del sistema inmunitario a la exposición de alérgenos. Impide la unión de la IgE con su receptor, y evita la liberación de sustancias implicadas en los fenómenos inflamatorios y el consecuente daño tisular. Es eficaz para pacientes con asma persistente moderada a grave que no han controlado la acción de la IgE con corticosteroides (Grammer, 2011; Zubeldia, 2012).

1.1.5.2 Farmacoterapia

a. Estabilizadores de la degranulación de mastocitos.

El cromoglicato disódico es un inhibidor de alta eficacia de la histamina y de otros mediadores proinflamatorios (leucotrienos, serotonina) en las vías respiratorias. Es capaz de mejorar significativamente todos los síntomas secundarios a liberación mastocitaria, sobre todo digestivos, pero también disminuir los picores, los episodios de flushing, la malabsorción intestinal.

Se administra en forma local: conjuntiva de los ojos, mucosa nasal, tronco bronquial (inhalación), mucosa intestinal. Se utiliza en la profilaxis de asma bronquial de tipo alérgico y en la inducida por el ejercicio físico. También se utiliza en alergias a productos alimenticios. El nedocromilo desarrolla un efecto similar (Cardona, 2010; Lüllman, 2010; Velázquez, 2013).

b. Los α -simpatomiméticos

Como efedrina, pseudoefedrina, fenilefrina, nafazolina, oximetazolina, tetrizolina son de uso local en la conjuntiva y la mucosa nasal, tienen un efecto vasoconstrictor y, en todo caso, deberían ser administrados a corto plazo (Lüllman, 2010; Zubeldia, 2012).

La adrenalina tiene diferentes efectos farmacológicos, y se caracteriza por un rápido inicio de sus acciones. Principalmente posee un efecto broncodilatador y uno directo sobre el aparato circulatorio, que producen la constricción de los vasos sanguíneos y, consecuentemente, elevan la tensión arterial. Es el fármaco más eficaz para el tratamiento de la anafilaxia y de las crisis agudas de asma. Debe administrarse por vía intravenosa (Zubeldia, 2012).

c. Los β 2-simpatomiméticos

Los agonistas β 2 inhalados son los broncodilatadores más efectivos de los que se dispone en la actualidad y los fármacos más empleados en el tratamiento del asma. Los agonistas β 2 inhalados de acción corta, como salbutamol, terbutalina y fenoterol, se usan a demanda para un alivio rápido de los síntomas, pero tienen una duración de acción relativamente breve. Los agonistas β 2 inhalados de acción prolongada, salmeterol y formoterol, han tenido un gran impacto en el tratamiento del asma, en especial en pacientes con asma moderado o grave. Ambos fármacos tienen una larga duración de acción y es recomendable administrarlos dos veces al día, añadidos al tratamiento con corticosteroides inhalados para el control del asma (Cardona, 2010; Lüllman, 2010; Zubeldia, 2012).

d. Xantinas

La teofilina forma parte de las metilxantinas. Hace muchos años la teofilina fue utilizada como broncodilatador, e incluso, se trataba de la medicación de primera elección en el tratamiento de mantenimiento del asma bronquial. En la actualidad, hay fármacos con mayor potencia broncodilatadora y mayor eficacia, por lo que la teofilina ha pasado a ocupar un plano secundario. Posee un estrecho margen terapéutico, esto es, sólo es eficaz cuando sus concentraciones en la sangre se encuentran entre 10 y 20 mg/ml, de ahí la necesidad de monitorizar sus niveles en sangre. Actualmente se contempla su uso como complemento a los corticoides y a los broncodilatadores, para conseguir un adecuado control del asma.

El mayor factor limitante en el empleo de teofilina como tratamiento crónico del asma son los efectos secundarios. Pueden aparecer náuseas, insomnio, dolor de cabeza, irritabilidad o aumento de la producción y reflujo de ácidos, desde el estómago hacia la boca. Cuando los niveles en sangre son muy elevados, pueden asociarse convulsiones y alteraciones cardíacas graves (Grammer, 2011; Zubeldia, 2012).

e. Los glucocorticoides

Los glucocorticoides tienen importantes acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras. Pueden evitar o suprimir la inflamación en respuesta a estímulos muy diversos, sean estos de origen mecánico, químico, ionizante, infeccioso o inmunológico, mediante acciones ejercidas sobre múltiples células y utilizando múltiples mecanismos. Se utilizan en procesos alérgicos broncopulmonares, nasales, cutáneos, oculares, etc. Los glucocorticoides más utilizados son el dipropionato de beclometasona, budesonida, flunisolida y la fluticasona (Cardona, 2010; Lüllman, 2010; Zubeldia, 2012).

f. Bloqueo de receptores de leucotrienos

Los cisteinil-leucotrienos son sustancias con un papel importante en el mecanismo de origen del asma, ya que participan en el proceso inflamatorio y obstructivo de las vías respiratorias de esta enfermedad. Los antileucotrienos son fármacos que inhiben la síntesis de los cisteinil-leucotrienos y/o bloquean los receptores de éstos, suprimiendo los efectos adversos que pudieran causar en la mucosa respiratoria.

El montelukast se usa para el tratamiento del asma bronquial y la rinitis. Se recomienda su uso en combinación con los corticoides, como tratamiento de mantenimiento en el asma bronquial. Asimismo, puede ser útil en el asma inducida por ejercicio y en el asma asociada a intolerancia a antiinflamatorios no esteroideos (Lüllman, 2010; Grammer, 2011; Zubeldia, 2012).

g. Antihistamínicos

La histamina, una de las aminas biológicas más importantes, es sintetizada y almacenada por los mastocitos y los basófilos. Sus funciones son importantes en procesos fisiológicos, como la secreción ácida del estómago o como neurotransmisor en el SNC, y en procesos patológicos, puesto que es liberada durante la inflamación y en las reacciones alérgicas.

El término *antihistamínico* se refiere convencionalmente a los antagonistas de los receptores H1 de la histamina, los cuales afectan a diversos mecanismos inflamatorios y alérgicos. Aunque se describen como antagonistas competitivos reversibles, se sabe que algunos de

ellos, son realmente agonistas inversos de los receptores H1 (Rang, 2004; Velázquez, 2008; Grammer, 2011; Velázquez, 2013).

Cabe distinguir los siguientes cuatro tipos de receptores (Velázquez, 2013):

- 1. Receptores H1:** Se localizan en el músculo liso de las vías respiratorias, los aparatos gastrointestinal y genitourinario, cardiovascular, médula suprarrenal, células endoteliales, linfocitos y cerebro.
- 2. Receptores H2:** Se encuentran en mastocitos, basófilos, neuronas y músculo liso.
- 3. Receptores H3:** Localizados en el SNC y en terminaciones nerviosas periféricas, es un autorreceptor presináptico que inhibe la síntesis y la liberación de histamina.
- 4. Receptores H4:** Se encuentran en los tejidos linfoides.

Los antihistamínicos suelen clasificarse en seis grupos químicos, pero desde el punto de vista clínico se clasifican en antihistamínicos clásicos o de 1ª generación, y antihistamínicos no sedantes o de 2ª generación (Zubeldía, 2012).

i. Antihistamínicos de 1ª generación

Estos fármacos bloquean los receptores H1 tanto periféricos como centrales y provocan cierto grado de sedación. Su acción no es completamente selectiva, ya que inhiben, en mayor o en menor medida, receptores colinérgicos centrales y periféricos, receptores α -adrenérgicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos (Velázquez, 2008).

En función de su estructura química se clasifican en **etanolaminas** (difenhidramina, dimenhidrinato, clemastina), **etilendiaminas** (mepiramina), **alquilaminas** (clorfeniramina, doxilamina), **piperacinas** (meclicina, hidroxicina), **fenotiacinas** (prometacina) y **pirrolidinas** (tripolidina).

Los antihistamínicos de 1ª generación se absorben bien por vía oral e inician su acción en 15 a 30 minutos (Tabla 1.1). Alcanzan concentraciones plasmáticas máximas en 2 a 3 horas y la duración de los efectos suele ser de 4 a 6 horas. Se distribuyen ampliamente por el organismo, atraviesan la placenta y la barrera hematoencefálica (BHE) por difusión pasiva. La mayoría de ellos sufren metabolización hepática y son eliminados por las heces con mayor rapidez en los niños que en los adultos, aunque algunos se eliminan principalmente por vía renal (Velázquez, 2008; Grammer, 2011).

Al bloquear los receptores H1 periféricos, estos fármacos reducen la permeabilidad vascular, el prurito y la vasoconstricción provocados por la liberación de histamina. Sin embargo, antagonizan sólo parcialmente la vasodilatación inducida por este mediador, ya que en ella participan también receptores H2.

La reacción adversa más frecuente de los antihistamínicos de 1ª generación es la sedación, produciendo desde ligera somnolencia hasta sueño profundo con una gran variabilidad interindividual entre los diferentes fármacos del grupo. En determinadas circunstancias esta sedación puede ser útil (prurito, dermatitis atópica en los niños, etc.) e incluso, puede ser la acción farmacológica buscada. Otras reacciones adversas relacionadas con su acción sobre el SNC son cansancio, debilidad, ataxia, hiporreflexia, vértigo, diplopía, visión borrosa, euforia, nerviosismo e insomnio (más frecuentes en niños). Por su acción sobre los receptores serotoninérgicos, aumentan el apetito. Debido al bloqueo colinérgico, estos fármacos pueden producir sequedad de boca, nariz y garganta, midriasis, retención urinaria y disuria. Las principales reacciones adversas en el aparato digestivo son anorexia, náuseas, vómitos, molestias epigástricas y estreñimiento o diarrea. Utilizados por vía tópica provocan en ocasiones reacciones de hipersensibilidad y fotosensibilización (Velázquez, 2008; Velázquez, 2013).

Los antihistamínicos de 1ª generación más utilizados son la difenhidramina (empleada como hipnótico y como antihistamínico) y su derivado, dimenhidrinato, usado en el tratamiento de la cinetosis, el vértigo y los vómitos; la clorfeniramina y su análogo, la dexclorfeniramina, que es, prácticamente, el único antihistamínico utilizado por vía parenteral; la clemastina y la hidroxicina (también empleada como hipnótico y como antihistamínico) (Zubeldia, 2012).

ii. Antihistamínicos de 2ª generación

Son más selectivos de los receptores H1 que los antihistamínicos de 1ª generación y no atraviesan la BHE. Tienen, por lo tanto, un perfil diferente de efectos adversos y apenas producen sedación. Los antihistamínicos de 2ª generación comercializados en España son: acelastina, ebastina, cetirizina, epinastina, levocabastina, levocetirizina, loratadina, mizolastina, olopatadina, rupatadina, terfenadina y su metabolito activo, fexofenadina.

Presentan una absorción rápida y completa por vía oral, que es facilitada en algunos casos (loratadina) por los alimentos y dificultada en otros (fexofenadina). Su acción se inicia de 1 a 2 horas después de la administración (Tabla 1.1), se unen a las proteínas plasmáticas en elevada proporción y prácticamente no atraviesan la BHE. Presentan volúmenes de distribución variables, que es bajo en el caso de la cetirizina, lo que le confiere menor riesgo de toxicidad dependiente de la dosis, mínima variación interindividual en el efecto terapéutico, menores interacciones con otros fármacos y menor acumulación del fármaco en los tejidos. La semivida de eliminación de estos fármacos permite dosificarlos una vez al día. Casi todos son metabolizados en el hígado, y la cetirizina, fexofenadina y la mizolastina son las que presentan menor tasa de metabolismo. La ebastina, loratadina y terfenadina sufren un importante efecto de primer paso que da lugar a metabolitos activos (carebastina, desloratadina y fexofenadina) (Velázquez, 2008; Velázquez, 2013).

De los antihistamínicos de 2ª generación, la cetirizina tiene un riesgo más alto de producir sedación, la acelastina por vía tópica nasal presenta una incidencia importante de somnolencia. El efecto adverso más importante descrito para algunos de estos fármacos se produce en el aparato cardiovascular. La terfenadina puede prolongar el intervalo QT en el electrocardiograma (ECG), ya que bloquea los canales ventriculares de K⁺, produciendo un retraso en la repolarización ventricular. Ello puede originar arritmias, principalmente *torsades de pointes*, hipotensión, discinesia, paro cardíaco y muerte (Velázquez, 2013). El riesgo es extremadamente bajo, pero aumenta si se ingiere de forma concomitante zumo de pomelo o fármacos que inhiben el citocromo P450 en el hígado. En la actualidad está disponible fexofenadina, el metabolito atóxico metabólicamente activo de terfenadina (Rang, 2004).

1. INTRODUCCIÓN

Los antihistamínicos de 2ª generación son efectivos en la rinoconjuntivitis alérgica, especialmente en los niños. Alivian la rinorrea, el picor y los estornudos, pero carecen de efecto en la obstrucción nasal. En el asma bronquial presentan una eficacia muy limitada y no se utilizan como tratamiento único. Sin embargo, sí resultan beneficiosos en los pacientes asmáticos con rinitis alérgica, en la que mejoran de manera notable los síntomas. En las dermatitis atópicas y en algunos casos de dermatitis por contacto, los antihistamínicos de 2ª generación reducen de manera eficaz el prurito, efecto que se relaciona también con su acción sedante, por lo que en este caso se recomienda la utilización de antihistamínicos 1ª generación o bien de cetirizina. Inhiben también los síntomas agudos de las picaduras de insectos. Muchas de las reacciones de tipo alérgico a los medicamentos mejoran con la administración de estos fármacos, especialmente si tienen componentes de tipo prurito, urticaria y angioedema, y a veces se utilizan como profilaxis (Velázquez, 2008; Velázquez, 2013).

En la Tabla 1.1 se resumen las características farmacocinéticas de los antihistamínicos de 1ª y 2ª generación.

Tabla 1.1. Características farmacocinéticas de los antihistamínicos de 1ª y 2ª generación (t_{1/2}: semivida; Vd: volumen de distribución)

Fármaco	Inicio de acción	Duración de acción (h)	T1/2 (h)	Unión a Proteínas (%)	Vd (L/Kg)
Anti-H1 de 1ª generación					
Clemastina	2h	12	21	-	13,0
Clorfeniramina	30min	4-6	20	70	3,2
Difenhidramina	15-30min	3-6	8,5	78	4,5
Dimenhidrinato	15-30min	4-6	5-10	-	-
Hidroxizina	10-30min	6-12	20	-	20,0
Prometazina	10-20min	4-12	7-13	93	13,0
Tripolidina	-	4-6	3-6	-	9,0
Anti-H1 de 2ª generación					
Acelastina	3-4h	12	25	78-88	14,5
Cetirizina	1-2h	12-24	10	88-90	0,4
Desloratadina	2h	24	27	82-87	>100
Ebastina	1-4h	12-24	10-12	95	2,0
Fexofenadina	1h	12	18	60-70	5,6
Levocabastina	1-2h	16-24	35-40	55	1,1
Levocetirizina	0,5-1h	>24	6-8	96	0,3
Loratadina	1-2h	12-24	12	97	120,0
Mizolastina	1h	24	13	98	1,4
Rupatadina	2h	24	5,9	>95	143,0
Terfenadina	1-3h	12-24	16-22	98	2,2

1.1.6 Cetirizina

1.1.6.1 Propiedades físicoquímicas

La cetirizina es un derivado de la piperazina y el metabolito activo carboxilado de la hidroxizina. Tiene una acción prolongada y bloquea de forma competitiva y reversible a los receptores H1, disminuyendo los efectos sistémicos de la histamina (AHFS, 2010; Vademécum, 2014). Se presenta como un polvo cristalino blanco soluble en agua (AHFS, 2010).

1. INTRODUCCIÓN

Su estructura química es hidrocloruro del ácido [2-4(p-clorofenilo) fenilmetilo]-1-piperazino] etoxiacético, con la fórmula molecular $C_{21}H_{25}ClN_2O_3 \cdot 2HCl = 461,8$ (Figura 1.3) (Zaater, 2000).

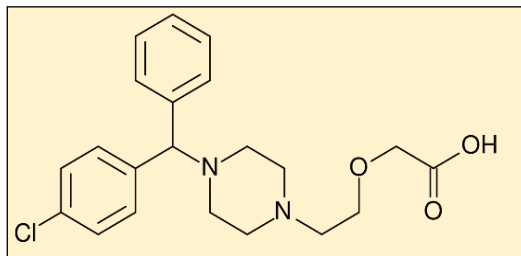


Figura 1.3. Estructura química de la cetirizina

El coeficiente de reparto (P) es una constante físico-química característica de los fármacos, indicadora de su lipofilia, parámetro muy relacionado con la capacidad de un fármaco de penetrar las membranas lipídicas como el estrato córneo. Para que el cálculo del coeficiente de reparto sea representativo del paso a través de la piel se determina el coeficiente de reparto octanol-agua (Flynn, 1990; Potts y Guy, 1992), posiblemente debido a que el octanol es capaz de solubilizar una pequeña cantidad de agua (Margolis y Levenson, 2000). Se ha sugerido que la solubilidad del agua en octanol es ideal para representar barreras biológicas, ya que, aunque las barreras biológicas generalmente se consideran lipófilas, de hecho, son bicapas formadas de materiales lipófilos además de agua (Scott y Clymer, 2002).

Cuando se trata de fármacos ionizables, se estima el coeficiente de distribución (D) (Hadgraft y Valenta, 2000; Scott y Clymer, 2002). Este parámetro también es característico de la lipofilia del fármaco, pero es variable en función del pH de la fase acuosa.

Según Pagliara y cols. (1998); y Bouchard y cols. (2001), la cetirizina tiene los siguientes valores de pK_a : $pK_{a1} = 2,19$; $pK_{a2} = 2,93$ y $pK_{a3} = 8,0$; $\text{Log } Doct^{7,4} = 1,5$ y $\text{Log } P = 3,7$.

1.1.6.2 Propiedades farmacológicas

Es un antihistamínico que da lugar a vasoconstricción y disminución de la permeabilidad vascular, disminuyendo el enrojecimiento y el edema asociado a la alergia. Mitiga parcialmente síntomas asociados a los procesos alérgicos como enrojecimiento ocular o congestión nasal. Además, produce un ligero efecto broncodilatador y una disminución del prurito dérmico.

Debido a estas propiedades farmacológicas la cetirizina está indicada para el tratamiento sintomático y temporal de procesos alérgicos producidos por el polen de las plantas, animales domésticos, polvo u otros agentes alérgicos, y que cursen con rinitis alérgica estacional y rinitis alérgica perenne. También en conjuntivitis alérgica o urticaria idiopática crónica. No se ha evaluado la utilización de cetirizina para el tratamiento de la conjuntivitis alérgica en niños de 12 años o menores, por lo que no se recomienda su uso (Vademécum, 2014).

1.1.6.3 Propiedades farmacocinéticas

La cetirizina es rápidamente absorbida en el tracto gastrointestinal después de la administración oral. La administración de 10 o 20 mg de cetirizina en adultos sanos, presentó concentraciones plasmáticas máximas de 257-384 o 580 ng/ml, respectivamente, que se alcanzaron dentro de la primera hora. La administración oral de 5 mg de cetirizina en niños de 7 a 12 años mostró una concentración plasmática máxima de 275 ng/ml, mientras que la misma dosis para niños de 2 a 5 años mostró una concentración plasmática máxima de 660 ng/ml. La administración oral de 10 mg de cetirizina en personas mayores dio unas concentraciones plasmáticas de máximas de 460 ng/ml a las de 0,9 horas.

Siguiendo una administración oral de 10 mg de cetirizina en adultos sanos, el efecto antihistamínico del fármaco apareció entre 20 y 60 minutos en el 50 y 95 % de los individuos, respectivamente, y persistente alrededor de 24 h. Además, siguiendo una administración oral de 5 o 10 mg de cetirizina en niños sanos, de 5 a 10 años, el efecto antihistamínico del fármaco apareció entre 20 y 60 minutos y persistió alrededor de 24 horas. El efecto antihistamínico de la cetirizina puede ser prolongado en pacientes con daño hepático (48-72 h).

1. INTRODUCCIÓN

El volumen de distribución de cetirizina está alrededor de 0,39-0,60 L/Kg en adultos sanos; de 0,46 L/Kg en pacientes con daño renal (aclaramiento de creatinina de 42-77 ml/min); 0,54 L/Kg en pacientes con daño renal moderado (aclaramiento de creatinina de 11-31 ml/min); 0,44 L/Kg en pacientes con daño hepático y 0,38-0,56 L/Kg en personas mayores (edad media 77 años).

La fuerte polaridad de cetirizina aparentemente limita su distribución en el SNC. La cetirizina se distribuye tanto en leche en humanos y en animales. El 93% aproximadamente de cetirizina está unida a proteínas plasmáticas.

Después de la administración oral de 10 mg de cetirizina en adultos sanos, el fármaco puede experimentar eliminación bifásica con una vida media de distribución inicial de aproximadamente 3 horas y con una vida media de eliminación terminal de 8,3 horas aproximadamente (rango: 6,5-10 horas). En pacientes pediátricos de 7-12 años, 2-5 años, o de 6-23 meses, la vida media de eliminación de fármaco corregido por peso fue de 33, 33-41, o 63% reducido, respectivamente, que la observada en adultos. Además, la vida media de eliminación del fármaco en personas mayores (edad media 77 años), recibiendo una dosis oral de 10 mg de cetirizina se prolongó alrededor del 50% comparado con adultos jóvenes (edad media: 53 años).

En adultos sanos, alrededor del 70 y 10% de una dosis de cetirizina se elimina en orina y heces, respectivamente (AHFS, 2010).

1.1.6.4 Formulaciones de cetirizina

En el mercado farmacéutico se puede encontrar varias presentaciones de cetirizina para ser administradas por vía oral:

- Comprimidos recubiertos: 10mg 7 comprimidos
10mg 20 comprimidos
- Solución oral: 5mg/5ml 60ml, 200ml
10mg/ml gotas 20ml

- En combinación:

Cetirizina + pseudoefedrina (5 mg/120mg) en comprimidos.

Actualmente no existe ninguna formulación tópica de cetirizina diclorhidrato en el mercado. Sin embargo, algunas bibliografías y patentes describen el uso de geles (Walch y Baden, 2004) y liposomas convencionales como portadores tópicos de cetirizina (Elzainy y cols., 2004).

Yong Sun y cols. (2011) prepararon una microemulsión (A/O) de cetirizina hidrocloreto, utilizando como surfactante: Span 80 y como co-surfactante: etanol. Por otra parte, Goindi y cols. prepararon ethosomas (2014) y partículas elásticas (2013) de cetirizina utilizando Phospholipon 90 G y etanol.

Finalmente, también se ha investigado el uso de cetirizina en administración tópica nasal (Korsgren y col., 2007).

1.2 MICROEMULSIONES Y NANOEMULSIONES

1.2.1 Concepto y denominación

Las microemulsiones fueron descritas por primera vez por Hoar y Schulman en 1943. Inicialmente se denominaron soluciones micelares hinchadas, emulsiones transparentes, micelas solubilizadas, etc. El término microemulsión fue introducido también por Schulman en 1959 y es la denominación que ha prevalecido.

Las microemulsiones se pueden definir como un sistema de agua, solvente lipófilo y tensioactivo que es una solución líquida transparente, isotrópica y termodinámicamente estable (Danielson y Lindman, 1981).

Las nanoemulsiones son dispersiones coloidales translúcidas de dos líquidos inmiscibles estabilizadas por un tensioactivo, con un tamaño de gota comprendido entre los 20 y los 200 nm (Figura 1.4).

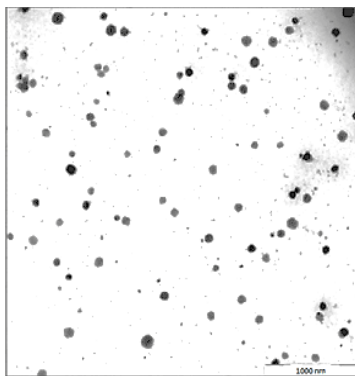


Figura 1.4. Nanoemulsión. Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM) (Guglielmini, 2008)

Este pequeño tamaño de gota hace que la nanoemulsión posea una elevada estabilidad cinética, frente al cremado, sedimentación, floculación y coalescencia (Guglielmini, 2008). A pesar de su elevada estabilidad cinética, son termodinámicamente inestables, es necesaria la aportación de energía para su formación (Solans y cols., 2005).

En función de la fuente utilizada para suministrar esta energía podemos distinguir dos métodos de preparación:

- **Métodos de alta energía:** utiliza homogenización de alta presión, ultrasonidos entre otros, que rompen las gotas de la emulsión. La adición de tensioactivo permite disminuir la energía necesaria para la formación de la microemulsión (Guglielmini, 2008). El tamaño de partícula obtenido dependerá del instrumento empleado, así como del tiempo y temperatura utilizado durante la preparación y de los propios componentes de la fórmula (Rao y McClements, 2011). Este método de preparación permite tener un mayor control sobre el tamaño de gota y una mayor variedad de ingredientes disponibles (Ravi y Padma, 2011).
- **Métodos de baja energía:** también llamados métodos de condensación. Estos aprovechan la energía contenida en el sistema para formar gotas de pequeño tamaño (Solé y cols., 2010). La emulsificación se lleva a cabo cambiando los parámetros que afectan al balance hidrofílico del sistema, como la temperatura y composición, por este motivo la selección de los excipientes a utilizar es un paso crítico (Izquierdo y cols., 2005). Así se pueden distinguir dos procedimientos: a temperatura constante (variando la composición) o bien a composición constante (variando la temperatura). Este último método también es conocido como método

de la temperatura de inversión de fases, siendo el método de baja energía el más utilizado (Solans y cols., 2005).

1.2.2 Selección de los componentes de las microemulsiones y nanoemulsiones

Los ingredientes utilizados tanto para la preparación de las microemulsiones como de las nanoemulsiones deben ser seguros, no tóxicos y no irritantes, según los que aparecen en la lista de componentes generalmente reconocidos como seguros (Generally Regarded As Safe, GRAS) (Wu y cols., 2001). En este sentido es de especial interés la elección del surfactante, ya que suelen ser los compuestos más irritantes, y se encuentran en una relativamente elevada concentración, necesaria para la estabilización del sistema coloidal.

La formulación de las microemulsiones/nanoemulsiones implica normalmente la combinación de cuatro componentes: una fase acuosa, una fase oleosa, un tensioactivo y un co-tensioactivo.

1.2.2.1 Fase acuosa

El componente más utilizado es el agua, pero si es necesario puede sustituirse por una solución salina o una solución glucosa para algunas aplicaciones específicas. Si se quiere preparar una formulación anhidra pueden utilizarse glicoles o alcoholes.

1.2.2.2 Fase oleosa

La fase oleosa es la responsable de la solubilización de fármacos hidrófobos. En este caso es conveniente seleccionar el aceite en el cual el fármaco presente una mayor solubilidad. Así pues, para la selección de esta fase, se realiza un screening de aceites. Para evaluar la solubilidad en estos, se disuelve un exceso de fármaco en un volumen determinado, se agita y se deja en un agitador rotatorio durante 48-72 horas hasta alcanzar el equilibrio. Una vez transcurrido este tiempo las muestras se centrifugan y el sobrenadante es filtrado. Finalmente, la concentración de fármaco solubilizado por el aceite es analizado mediante una técnica analítica apropiada (Shakeel y Ramadan, 2010).

1.2.2.3 Tensioactivo

Tras la selección de la fase oleosa se ha de seleccionar el tensioactivo apropiado. Con el fin de racionalizar el comportamiento de los tensioactivos se determinó su balance hidro-lipofílico (HLB). Este tiene en cuenta la contribución relativa del fragmento hidrófilo e hidrófobo en la molécula del tensioactivo. Los tensioactivos con HLB altos (8-18) se consideran solubles en agua, y favorecen la formación de emulsión de fase externa acuosa. Los tensioactivos de bajo HLB (3-6) se consideran lipófilos y favorecen la formación de emulsiones de fase externa oleosa.

En general, se eligen tensioactivos no iónicos (ésteres de glicerol, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos), por su buena tolerabilidad biológica, así como por su habilidad para formar microemulsiones independientemente del pH y a la concentración de electrolitos en la fórmula (Djordjevic y cols., 2004). También se pueden encontrar tensioactivos aniónicos (ácidos carboxílicos, sulfonatos, etc.) y catiónicos (animas y sales de amonio cuaternario, etc.) (Devarajan y Ravichandran, 2011).

Normalmente las microemulsiones presentan mayores cantidades de tensioactivo en comparación con las nanoemulsiones. Esto hace que posean una muy baja tensión interfacial, facilitando la obtención de tamaños de gota nanométricos que asegura una excelente superficie de contacto entre la piel y el vehículo (Kreilgaard, 2002).

Para seleccionar el tensioactivo específico se pueden seguir dos procedimientos:

- a. Se seleccionan los tensioactivos y co-tensioactivos en los cuales el fármaco sea más soluble (Zhu y cols., 2008).
- b. Selección del tensioactivo que mayor solubilidad tenga en la fase oleosa (Shakeel y Ramadan, 2010). La separación de fases es la forma más común de desestabilización de las emulsiones. Los tensioactivos se utilizan con el fin de estabilizar el sistema. En este sentido el tensioactivo seleccionado tendrá una relación directa con la estabilidad del sistema. Para la selección de un tensioactivo específico se puede proceder de la siguiente forma. Se realiza una solución de varios tensioactivo al 15% en agua. Se va añadiendo la fase oleosa seleccionada poco a poco con el fin de poder titularla. Se agita con vórtex. Se sigue añadiendo aceite hasta que la solución se vuelve turbia. Otros autores realizan la selección utilizando métodos turbimétricos

(Date y Nagarsenker, 2007). En este caso se realiza una mezcla 1:1 en peso del tensioactivo y el aceite previamente seleccionado. De esta mezcla se toma una parte en peso y se le adiciona la misma cantidad de agua. Las emulsiones se dejan reposar 2 horas y se determina la transmitancia (usando agua como blanco). Se selecciona el tensioactivo que mayor transmitancia posea, reflejando la capacidad emulsificante del tensioactivo. Este método también puede utilizarse para la selección del co-tensioactivo. En este caso se realiza una mezcla tensioactivo: co-tensioactivo: aceite (2:1:3). Una parte en peso de esta mezcla se diluye con la misma cantidad de agua. La emulsión se deja en reposo dos horas y se evalúa la transmitancia. Se selecciona el co-tensioactivo que mayor valor tenga, reflejando la mayor capacidad emulsificante del co-tensioactivo.

1.2.2.4 Co-tensioactivos

Los co-tensioactivos, son tensioactivos generalmente alcoholes o ésteres alcohólicos de cadena corta, que se añaden con el fin de reducir aún más la tensión interfacial, facilitando la emulsificación del sistema (Devarajan y Ravichandran, 2011). La adición de un co-tensioactivo, generalmente aumenta la estabilidad del sistema y la solubilidad del compuesto en el mismo (Lu y Gao, 2010).

1.2.3 Estructura y técnicas de caracterización

Como resultado de las investigaciones que se han realizado en los últimos años, se puede afirmar que las microemulsiones/nanoemulsiones no se ajustan a un solo modelo estructural. La estructura está muy influenciada por las propiedades físico-químicas y la proporción de los componentes usados (Kreilgaard, 2002).

Las estructuras más conocidas son las de microgotas esféricas, entre 10 y 200 nm de tamaño, de una de las fases en el seno de la otra, ya sea de tipo directo (O/A), como de tipo inverso (A/O). Además de estas estructuras se han propuesto un gran número de estructuras bicontinuas o en forma de esponja.

1. INTRODUCCIÓN

Las microemulsiones/nanoemulsiones de tipo directo (O/A), normalmente se forman cuando el volumen de la fracción oleosa es bajo. Las moléculas de tensioactivo se sitúan con la cadena hidrófoba hacia el interior, lo cual crea un medio interno apolar que permite la solubilización de compuestos lipófilos. Las de tipo inverso (A/O) se forman cuando el volumen de la fracción acuosa es bajo y las cabezas polares se dirigen hacia el interior de la estructura formándose un medio polar que favorece la solubilización de agua o compuestos hidrófilos en su interior (Figura 1.5).

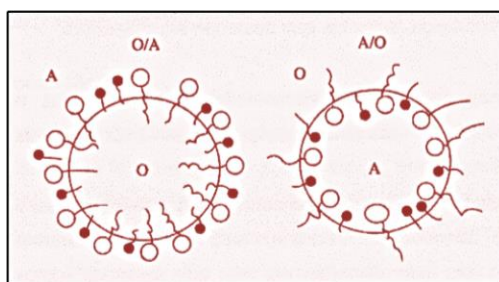


Figura 1.5. Estructura de microemulsiones/nanoemulsiones directas (O/A) e inversas (A/O) (García Celma y cols., 1993)

Se produce una transición de las estructuras inversas (A/O) a directas (O/A), pasando por una serie de estructuras bicontinuas al aumentar la concentración de agua o bien al cambiar la temperatura (Figura 1.6).

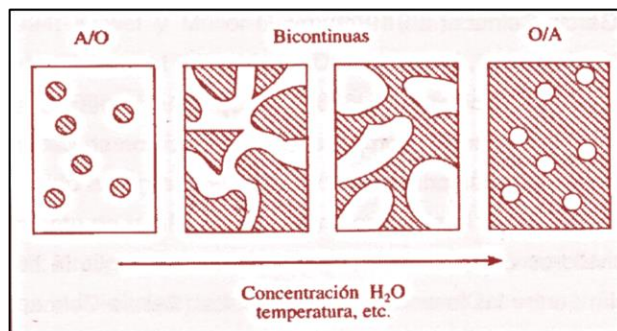


Figura 1.6. Transiciones estructurales desde microemulsiones inversas (A/O) a microemulsiones directas (O/A) a través de microemulsiones bicontinuas (García Celma y col., 1993)

Ya que el tamaño de gota de las microemulsiones/nanoemulsiones está por debajo o muy cerca de la longitud de onda de la luz visible (150 nm), la exanimación directa no es posible. Por eso se han de emplear medidas indirectas para la evaluación de la estructura de la microemulsión. Las gotas de fase interna se mueven de forma aleatoria dentro de la fase externa según la ecuación 1 de Stoke-Einstein (Kreilgaard, 2002):

$$D = \frac{K \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

Siendo D , el coeficiente de difusión; K , la constante de Boltzman; T , la temperatura termodinámica; h , la viscosidad del medio y r , el radio molecular.

La caracterización de la estructura de las microemulsiones se realiza mediante diversas técnicas experimentales, entre las que destacan el diagrama de fases, conductancia, espectroscopia de correlación fotónica y la microscopía de transmisión electrónica.

1.2.3.1 Diagramas de fases

Para determinar con exactitud la composición de la microemulsión se realizan diagramas de fases.

Los diagramas pseudo-ternarios son mezclas de fase hidrófila, oleosa y mezcla de tensioactivo/co-tensioactivo a una ratio fijo y a una temperatura y presión atmosférica determinada. La ratio (Km) tensioactivo:co-tensioactivo puede ser muy variado. Hay autores que prueban Km desde 1:9 a 9:1, en cambio otros de manera práctica prueban tres, uno con una alta cantidad de tensioactivo (6:1, por ejemplo), otro con una alta carga de co-tensioactivo (1:6, por ejemplo) y uno de proporciones iguales (1:1).

Cada vértice del triángulo representa el 100% de uno de los compuestos, mientras que la arista opuesta representa el 0% del mismo (Figura 1.7).

Para determinar la región de formación de microemulsión en primer lugar se seleccionan las mezclas que hayan resultado ser monofásicas y transparentes. A estas se les determina el tamaño de gota y la polidispersión, se dibujan entonces en el triángulo aquella que hayan tenido un tamaño y polidispersión adecuada, generalmente ente 20 y 200 nm y menor a 0,2, respectivamente. Estos puntos se unen y esa área comprende la composición que delimita la región de formación de microemulsión. De todos los triángulos probados, se suele seleccionar aquel que tenga un área de microemulsión mayor.

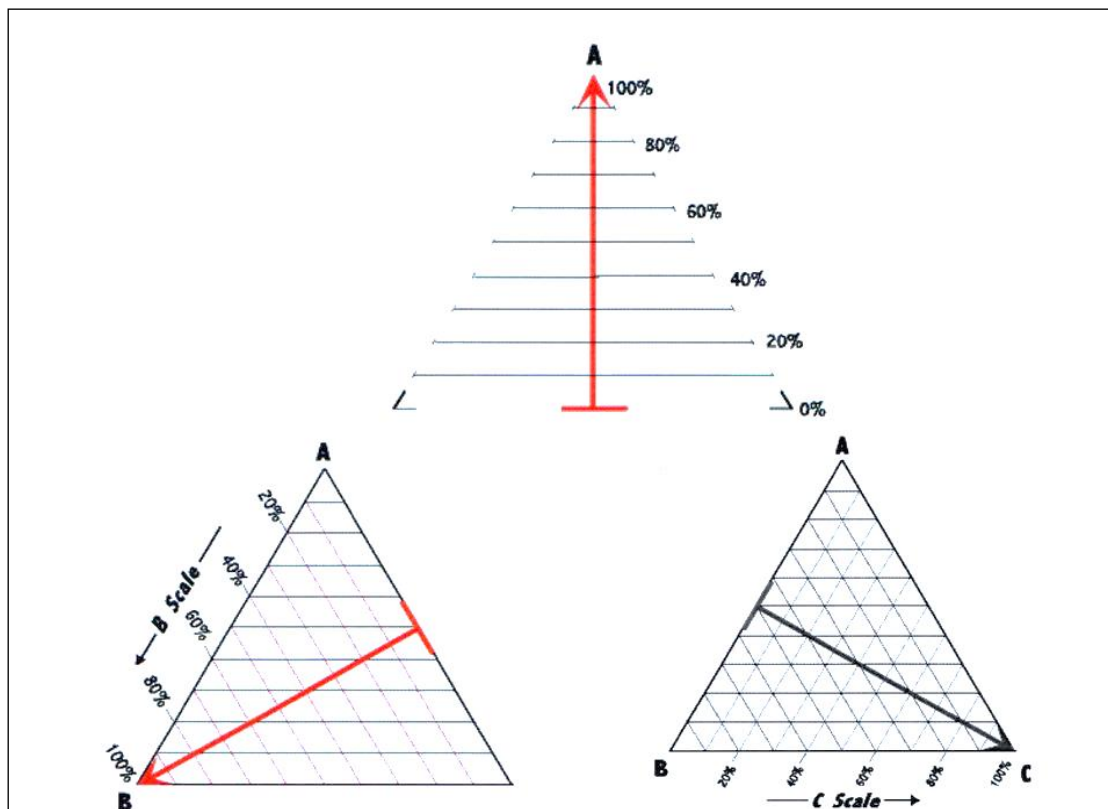


Figura 1.7. Lectura de un diagrama pseudo-ternario

1.2.3.2 Conductancia

Las microemulsiones de fase externa acuosa (O/A) poseen altos valores de conductancia, en contraste con las de fase externa oleosa (A/O). Por lo tanto, esta técnica es útil para la determinación del tipo de emulsión obtenido. La adición de un colorante a la formulación también es útil para determinar cuál es la fase externa de la misma. Los colorantes hidrófilos se solubilizarán en el agua de la fase externa acuosa pero no se observará en las gotas de la fase interna oleosa y viceversa (Devarajan V, Ravichandran, 2011).

1.2.3.3 Dynamic Light-scattering (DLS) o Espectroscopía de correlación fotónica (PCS)

Es la técnica más utilizada para medir el tamaño de gota de la microemulsión. DLS mide las fluctuaciones de la dispersión dinámica de la luz láser a un ángulo constante en función del tiempo. La intensidad de la luz dispersada depende del tamaño de la partícula, el ángulo de dispersión, el índice de refracción y el medio continuo (Haskell y cols.1998). Como resultado se obtiene el diámetro

medio de gota (Z-average) y el índice de polidispersión (PDI). Un índice de polidispersión inferior a 0,2 indica que las gotas o partículas son monodispersas.

1.2.3.4 Microscopía de transmisión electrónica, transmission electron microscopy (TEM)

Esta técnica permite determinar el tamaño de las gotas de la microemulsión, así como su morfología. Para poder observar la muestra se ha de realizar un pre tratamiento de la misma en función de la técnica específica a utilizar. Al utilizar TEM lo que se hace es una tinción negativa con un metal pesado como el acetato de uranilo. Las zonas donde éste se deposita son opacas al haz de electrones por lo que se ven teñidas de oscuro en las imágenes de TEM. El crio-TEM con fractura por otro lado permite la observación directa del sistema. En este caso la muestra se congela rápidamente y se fractura. La superficie de interés se cubre con platino-carbono. La muestra original se elimina por inversión en agua y la réplica de metal se observa en el microscopio. A pesar de que el crio-TEM es una buena técnica para la observación de la microemulsión/nanoemulsión, el TEM con tinción negativa representa una buena alternativa a éste ya que la morfología de la muestra está relativamente bien preservada, a pesar de que se puedan observar artefactos (Klang y cols., 2012).

1.2.4 Propiedades físico-químicas

Las microemulsiones presentan un conjunto de propiedades físico-químicas de gran interés teórico y tecnológico, entre las que destacan las siguientes:

- Son sistemas líquidos con viscosidades similares a las del agua y se comportan como las soluciones simples y presentan un flujo newtoniano.
- Son sustancias transparentes como consecuencia de su microestructura. Debido al pequeño diámetro de los agregados, las microemulsiones permiten ser esterilizadas por microfiltración sin que con esto se rompa la estructura (Févier, 1991).
- La isotropía es una de las propiedades físicas que caracterizan a las microemulsiones: son oscuras a la luz polarizada. Además de presentar homogeneidad macroscópica (transparencia e isotropía óptica), presentan heterogeneidad microscópica debido a la existencia de partículas

interfaciales de moléculas de tensioactivo que separan localmente la fase acuosa de la fase orgánica (García Celma y cols., 1993).

- La formación de las microemulsiones es espontánea debido a la estabilidad termodinámica. Si todos los componentes son líquidos se obtienen por simple agitación de las materias primas.
- Presentan valores de tensión interfacial extraordinariamente bajos, del orden de 10^{-3} mN/m, entre las fases acuosa y orgánica (García Celma y cols., 1993).
- A diferencia de las macroemulsiones, que con el tiempo sufren coalescencia y separación de fases, las microemulsiones son termodinámicamente estables. Después de someterlas a repetidos ciclos de congelación y calentamiento retornan a su estado original tras volver a las condiciones iniciales (Rosano y Clause, 1987; Févier, 1991). Un caso diferente es el de la estabilidad química, ya que las microemulsiones pueden sufrir separación de fases por degradación de alguno de sus componentes durante su almacenaje.
- Tienen una gran capacidad de solubilizar sustancias: permiten la solubilización de principios activos insolubles en agua en un medio lipófilo y compuestos hidrosolubles en medio hidrófilo, así como ambos tipos de compuestos (hidrosolubles y liposolubles) o bien compuestos químicamente incompatibles conjuntamente en una misma formulación sin que se produzca interacción entre ellos (Févier, 1991).

1.2.5 Vías de administración de las microemulsiones y nanoemulsiones

Las microemulsiones han generado un gran interés en los últimos tiempos como sistemas de liberación de fármacos, tanto por vía tópica, oral, parenteral, sublingual y oftálmica (Lawrence y Riss, 2000).

La mayor parte de las microemulsiones han sido utilizadas para su aplicación tópica, ya sea con una finalidad local o sistémica, aunque también se han empleado para su administración intravenosa (Santos-Magalhães y cols., 2000), oral (Nicolaos y cols., 2003), ocular (Tamilvanan y Benita, 2004), intranasal (Kumar y cols., 2009), y pulmonar (Bivas-Benita y cols., 2004).

Las nanoemulsiones han sido ampliamente utilizadas en el sector tecnológico, por ejemplo, como punto de partida para la realización de nanopartículas, tanto poliméricas (Solans y cols., 2005), como lipídicas (González-Mira y cols., 2011). También se han utilizado ampliamente en el sector cosmético (Guglielmini, 2008), tecnología de los alimentos (Acosta, 2009) y por supuesto como sistemas de liberación de fármacos, permitiendo vehiculizar fármacos hidrófilos y lipófilos (Zhou y cols., 2009).

La vía oral sigue siendo la principal ruta de administración de los fármacos en el mercado. Sin embargo, presenta importantes limitaciones tales como, el efecto de primer paso hepático o la degradación por las secreciones gastrointestinales, así como la incapacidad para deglutir que presentan la población pediátrica, geriátrica y pacientes no “cooperantes” (Pinto, 2010). La vía oral ha sido ampliamente utilizada para la administración de nanoemulsiones, especialmente en fármacos con una baja solubilidad acuosa como por ejemplo el saquinavir (Vyas y cols., 2008). La incorporación de este fármaco en una nanoemulsión consiguió aumentar la biodisponibilidad oral y su distribución hacia el cerebro. La incorporación de paclitaxel en una nanoemulsión O/W también consigue aumentar su biodisponibilidad comparada con la administración oral en solución (Tiwari y Amiji, 2006). Recientemente se ha desarrollado una modificación de nanoemulsiones denominado sistema de liberación de fármacos auto-nano-emulsionante (SNEDDS, Self Nano emulsifying Drug Delivery System), siendo éstas, unas bases autoemulgentes, que en contacto con el agua del tracto gastrointestinal forma la nanoemulsión espontáneamente (Rao y cols., 2008). En este tipo de formulaciones han sido exitosamente vehiculizados el ramiprilo (Shafiq y cols., 2007), permitiendo aumentar su absorción y la ciclosporina (Neoral®) (Devarajan y Ravichandran, 2011) disminuyendo la gran variabilidad intra e inter-individual en la absorción que se observaba en Sandimmune®.

La vía parenteral es una ruta de administración común cuando se requiere un rápido inicio de la acción, cuando los fármacos presentan una muy baja biodisponibilidad (como las proteínas) o un margen terapéutico estrecho. La administración de nanoemulsiones por esta vía también ha supuesto una ventaja, debido también a que son capaces de solubilizar compuestos hidrófobos, debido a su pequeño tamaño, a su capacidad de protección del principio activo del medio y capacidad para el control de la liberación del principio activo (Ravi y Padma, 2011). Se ha administrado por vía parenteral una nanoemulsión que contenía talidomida (Araujo y cols., 2011), diversos antitumorales (Ganta y cols., 2010), carbamazepina (Kelman y cols., 2007), entre otros fármacos.

La administración en la mucosa intranasal, se ha realizado en numerosas ocasiones con el fin de liberar el fármaco directamente en el cerebro. Varios autores han realizado aproximaciones en este sentido con el fin de tratar el Alzheimer, migrañas, depresión, esquizofrenia, Parkinson y meningitis entre otras (Kumar y cols., 2008; Mistry y cols., 2009). Otros autores en cambio han administrado antígenos en nanoemulsión a través de la mucosa nasal con el fin de vacunar frente a diversas enfermedades (Challacombe y cols., 1997).

Por otro lado, se ha visto que las microemulsiones también pueden presentar propiedades biocidas frente a bacterias, hongos y virus debido a su estructura (Ramalingam y cols., 2012; Myc y cols., 2002).

La mayor biodisponibilidad de las microemulsiones/nanoemulsiones se atribuye al elevado gradiente de concentración debido a la gran capacidad de solubilizar fármacos de éstas sin que se produzca un aumento de la afinidad del fármaco hacia el vehículo (Dreher y cols., 1997; Trotta y cols., 1997; Kreilgaard y cols., 2000), y/o al efecto promotor de la penetración de los constituyentes individuales de las microemulsiones (Osborne y cols., 1991; Kemken y cols., 1992; Bonina y cols., 1995; Dreher y cols., 1997; Schmalfuss y cols., 1997; Ho y cols., 1998; Baroli y cols., 2000). Sin embargo, se ha demostrado que el máximo grado de absorción de las microemulsiones depende de la movilidad interna del fármaco en el vehículo, que viene determinado por la composición y la estructura interna de la microemulsión (Kreilgaard y cols., 2002).

1.2.6 Ventajas de las microemulsiones y nanoemulsiones

Las ventajas de las microemulsiones y de las nanoemulsiones sobre otras formas de dosificación (Devarajan y Ravichandran, 2011) son:

- Sus propiedades se mantienen a lo largo del tiempo ya que son termodinámicamente estables (microemulsiones).
- Permiten la incorporación de sustancias termolábiles ya que se pueden formular a temperatura ambiente.

- Su reducida viscosidad permite una buena extensibilidad de la microemulsión, facilitando su aplicación y acceso en zonas donde el uso de formas más viscosas no es posible. Su baja viscosidad también permite que se adapten mejor a las cadenas de envasado y que permitan una mejor dosificación.
- Aumento de la absorción y disminución de la variabilidad en el tracto gastrointestinal.
- Solubilización fármacos tanto lipófilos e hidrófilos.
- Aumento de la biodisponibilidad y mejora del perfil fármaco cinético.
- Utilización en diversas rutas de administración.
- Rápida y eficiente penetración del fármaco.
- Enmascaramiento de sabores desagradables.
- Protección frente hidrólisis y oxidación del fármaco.
- Buena aceptación por parte del paciente.
- Requieren comparativamente menos energía para su formación.
- Se pueden esterilizar mediante filtración sin rotura de la microemulsión/nanoemulsión lo que permite que sean utilizadas sin que haya riesgo séptico.

1.3 PIEL

1.3.1 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.

Está formada por tres capas (Figura 1.8) 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 esta 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).

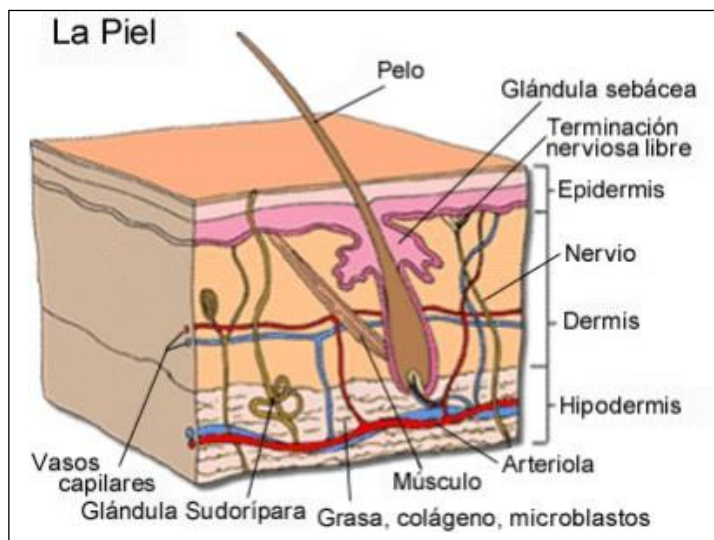


Figura 1.8. Estructura de la piel humana

1.3.1.1 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 (Figura 1.9):

- ***Estrato basal o germinativo*** es una única capa de células casi cúbicas enlazadas entre sí 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 encuentran melanocitos, células de Langerhans (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 córneo*** es la parte más externa de la epidermis y la principal barrera del medio externo, 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., 2011). Está formado por células aplanadas altamente queratinizadas, llamada corneocitos, unidos entre sí por una sustancia cementante de naturaleza lipídica y estratificada en múltiples capas (Elías, 1983). Estos lípidos intercelulares están compuestos por aproximadamente un 70% de lípidos neutros (esteroides libres, 14%; ácidos grasos libres, 19.3%; triglicéridos, 25.2%; ésteres de colesterol y ésteres grasos,

1. INTRODUCCIÓN

5.4%; escualeno, 4.8%; alcanos, 6.1%), en un 18% por esfingolípidos (ceramidas y glucosilceramidas), un 5% de lípidos polares (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, esfingomielinea y lisolecitina) (Lampe y cols., 1983). Esta composición lipídica junto con la constante descamación y renovación el estrato córneo (Tanner T, Marks, 2008) son los principales responsables de la función barrera del estrato córneo.

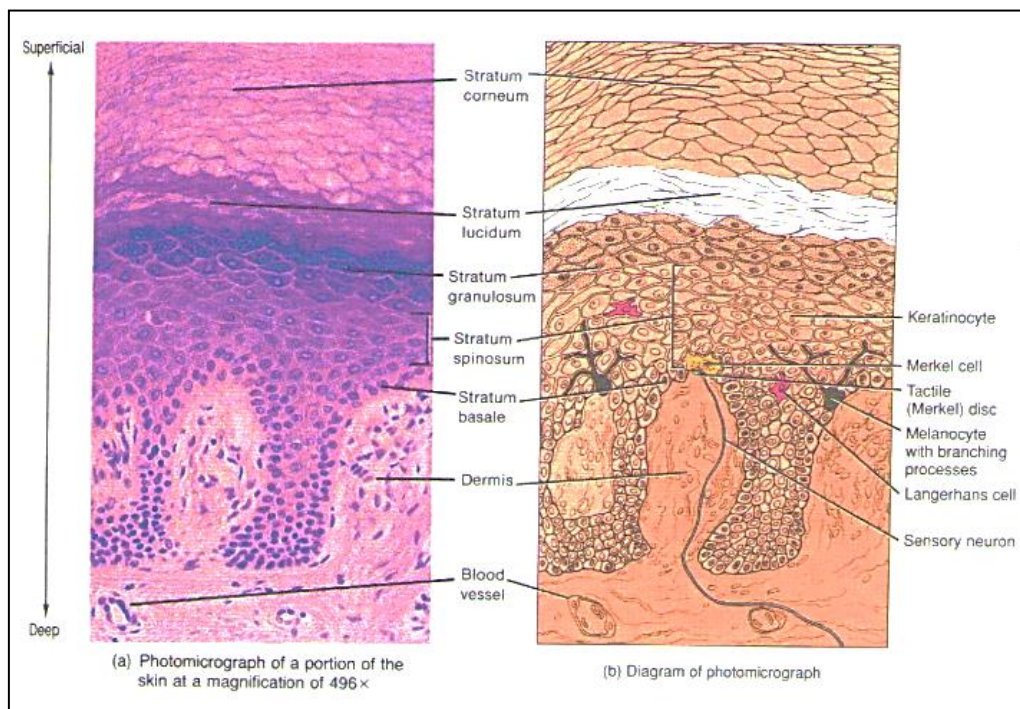


Figura 1.9. Capas y tipos de células de la epidermis en la piel gruesa (Tortora y Grabowski, 1993)

1.3.1.2 La dermis

Tiene un espesor mayor que la epidermis (1-3 mm de grosor). 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 córneo. 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).

1.3.1.3 La hipodermis

El tejido subcutáneo o hipodermis está compuesta 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 importantes en el paso de fármacos a circulación sistémica, ya que en estas zonas el grosor del estrato córneo disminuye, pudiendo llegar a desaparecer (Wilkes y cols., 1973).

1.3.2 La piel como vía de administración de fármacos

En la actualidad, existe mucho interés en la utilización de la piel como vía de administración de fármacos, con el objetivo de obtener una acción sistémica o bien tópica.

La utilización de la vía transdérmica como alternativa a la vía oral presenta numerosas ventajas ya que evita la posible inestabilidad del principio activo en el medio gástrico, evita el efecto de primer paso hepático, evitan las alteraciones de biodisponibilidad por velocidad de vaciado gástrico, motilidad intestinal, interacción fármaco alimento, permiten el uso de fármacos con margen terapéutico estrecho, reducen los posibles efectos secundarios derivados de la administración por vía oral y aumentan el grado de cumplimiento por parte del paciente. Sin embargo, la principal indicación para la administración tópica es cuando la piel es el lugar de acción.

Los avances en tecnología farmacéutica permiten, en la actualidad, modular la permeación transdérmica de fármacos de acuerdo con el objetivo que se pretende alcanzar. Así, en el caso de los sistemas de administración transdérmicos (SAT) el objetivo de la forma de dosificación es maximizar el flujo a través de la piel hacia la circulación sistémica y simultáneamente minimizar la retención y el metabolismo del fármaco en la piel. En contraste, en las formas de aplicación tópica se pretende, en general, minimizar el flujo de fármaco a través de la piel maximizando el tiempo de retención en la misma (Dean, 1994). Sin embargo, tanto en sistemas transdérmicos como en sistemas tópicos el fármaco debe penetrar a través del estrato córneo, la capa más externa de la piel y principal responsable de la función de barrera de ésta.

1.3.3 Vías de penetración a través de la piel

La permeación percutánea de fármacos es un proceso de difusión pasiva que se puede producir a través de la epidermis intacta (vía transepidérmica) o a través de los folículos pilosos con su glándula sebácea asociada y glándulas sudoríparas (vía transapendicular).

La vía transepidérmica es la mayoritaria en la penetración cutánea. Ésta se produce por difusión, bien por vía intercelular siguiendo el camino tortuoso entre los corneocitos, o por vía intracelular pasando a través de los corneocitos y espacios extracelulares (Figura 1.10).

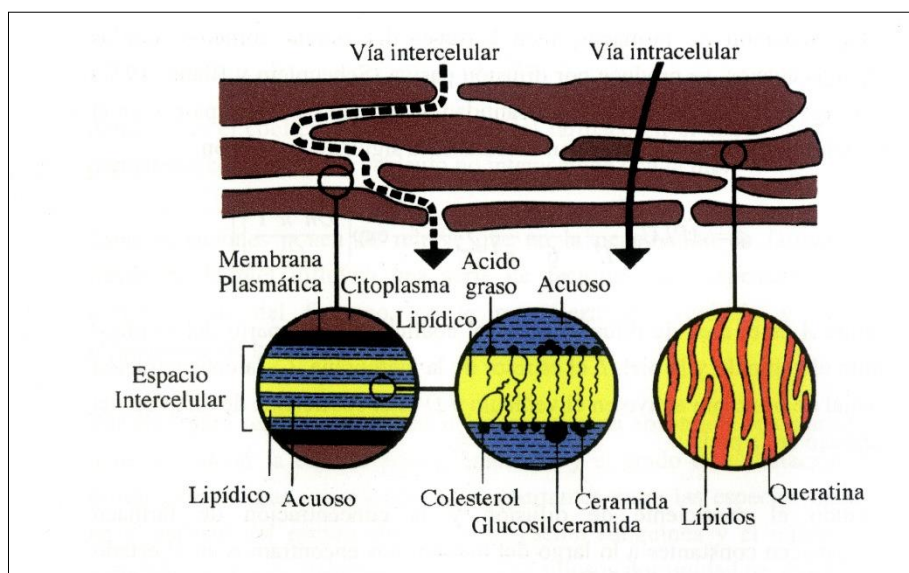


Figura 1.10. Principales vías de penetración transepidérmica (Elías, 1981)

En ambos casos, las sustancias permeantes deben difundir en algún punto a través de la matriz lipídica intercelular, que está considerada como el principal factor determinante de la velocidad de difusión percutánea (Potts y Guy, 1992). En la actualidad la vía intercelular está considerada como la principal vía de penetración del estrato córneo para la mayoría de fármacos (Moghimi y cols., 1999). Diversos estudios han sugerido la presencia de un camino polar y otro no polar en los lípidos extracelulares del estrato córneo a través de los cuales difundirán los diferentes fármacos (Roberts y cols., 2002). A pesar de ello, la vía intracelular debe ser tenida en cuenta ya que la contribución de una vía u otra en la absorción percutánea de los fármacos dependerá de la capacidad de difusión del fármaco a través

de lípidos y proteínas, del coeficiente de partición del fármaco entre estos dos dominios y de la geometría del estrato córneo (Michaels y cols., 1975; Tojo, 1987; Heisig y cols., 1996).

El sistema pilosebáceo y las glándulas sudoríparas ofrecen zonas de menor resistencia para la permeación de las moléculas, pero dado que estos representan sólo entre el 0,1 y el 1% de la superficie cutánea total en humanos (Kligman, 1983) la contribución de esta vía se considera pequeña. Sin embargo, la vía transapendicular puede ser la principal vía de entrada en la piel para los iones (Grimnes, 1984; Cornwell y Barry, 1993) y las moléculas polares grandes (Tregear, 1966; Scheuplein y cols., 1969; Feldmann y Maibach, 1971; Barry, 1983). Pero el papel del folículo piloso en la permeación transdérmica es difícil de elucidar, en parte por las complicaciones de los modelos animales. Barry (2002) ha descrito una nueva técnica (*the skin sandiwch*) para poder diferenciar si el fármaco utiliza la vía transepidérmica o la vía transapendicular.

1.3.4 Proceso de permeación cutánea

El proceso de permeación cutánea puede dividirse en tres etapas: adsorción, permeación y absorción.

Adsorción: Proceso por el cual el fármaco queda retenido en la superficie de la piel, generalmente por uniones físico-químicas a componentes cutáneos de elevado peso molecular (queratina, melanina, etc.). Para que se produzca este paso, en primer lugar, el principio activo tiene que ser liberado del vehículo que lo contiene, por lo que ha de disolverse (si no lo está) y difundir hasta la interfase vehículo-estrato córneo. En esta primera fase, la formulación farmacéutica será muy importante ya que modula el proceso de liberación del principio activo que contiene.

Permeación: Esta etapa está regida por un proceso de difusión pasiva del fármaco a través de las diferentes capas de la piel. La principal barrera que encuentran los fármacos para atravesar la piel es el estrato córneo.

Absorción: Es el paso de la sustancia al sistema circulatorio (vasos sanguíneos o linfáticos). Los procesos que sigue el fármaco en el organismo una vez absorbido son similares a los que encontramos en otras vías de administración.

1.3.5 Factores que influyen en la absorción percutánea

1.3.5.1 Factores biológicos

- **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).
- **Zona corporal:** Existen grandes variaciones intra-individuales 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 córneo 600 μm), seguido de los tobillos y la palma de la mano (grosor estrato córneo 400 μm). 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 córneo 5 μm) (Scheuplein y Blank, 1971).
- **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.
- **Grado de hidratación del estrato córneo:** 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 está deshidratada, se produce descamación del estrato córneo y se altera la absorción.
- **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).

- **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.

1.3.5.2 Factores físico-químicos

1.3.5.2.1 Criterios relacionados con el fármaco:

- **Coefficiente de reparto:** el coeficiente de reparto octanol/agua ($\log P$) 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 $\log P$ y el reparto en la piel mantienen una relación parabólica (Kim y cols., 2000). De tal forma que los compuestos con un bajo $\log P$ 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 $\log P$ 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 córneo (que quedaría retenido en éste). Se acepta que la máxima permeación se consigue con un $\log P$ 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.
- **Coefficiente 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 (Ecuación 1.1), descrita en el apartado 1.2.3. de la Introducción. 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 ácidos 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 1 mg/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).

1.3.5.2.2 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 éste, presentara una mayor actividad

termodinámica. Esta aumentará si se incrementa la concentración del fármaco en la fórmula o manipulando el vehículo para disminuir la solubilidad del fármaco en éste (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 determinará el tiempo de residencia y la exposición local del fármaco en el sitio requerido.
- **Dosis y frecuencia de aplicación:** Con el fin de entender el efecto de los excipientes sobre la penetración transepidérmica, es recomendable la aplicación de dosis infinitas en el compartimento donador (> 100 mg de formulación por cm^2). La aplicación de dosis infinitas da lugar a una relativamente constante fuerza de entrada del fármaco a través de la piel, permitiendo alcanzar estados estacionarios plasmáticos. Sin embargo, en la práctica diaria no se aplican dosis tan elevadas, sino aproximadamente $2-5$ mg/cm^2 , dando lugar a una fina capa de la formulación ($10-30$ μm), que es menos de lo necesario para que se sature de fármaco el estrato córneo. 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 (Lu y Gao, 2010).
- **Promotores de la absorción:** Los promotores de la 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 córneo 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:

- ✓ Interacción con las proteínas celulares, promoviendo la permeación a través de los corneocitos (vía intracelular).
 - ✓ 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:** El efecto promotor de este grupo de sustancias depende en gran medida de sus estructuras. Parece ser que el efecto promotor de éstos 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 lipofilia 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 (Figura 1.11) se dispone de forma heterogénea en las

bicapas lipídicas dando lugar a la formación de canales fluidos dentro del estrato córneo (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 córneo. Por otro lado, cabe destacar que los ácidos 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 córneo son menores (Komata y cols., 1992). De estos el más efectivo es el alcohol láurico (Figura 1.12) que puede ser tan efectivo como el ácido oleico. (Yamada y Uda, 1987)

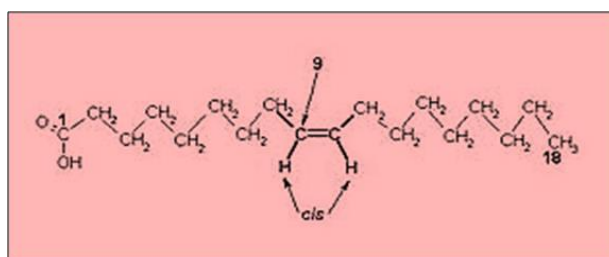


Figura 1.11. Estructura química del ácido oleico

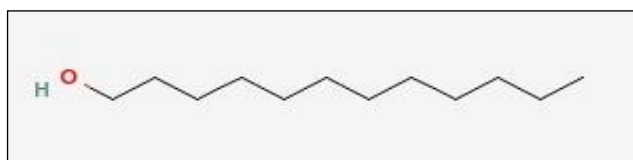


Figura 1.12. Estructura química del alcohol láurico

1. INTRODUCCIÓN

- **Ésteres de alcoholes grasos:** Destaca el miristato de isopropilo (Figura 1.13). Actúa sobre los lípidos extracelulares, fluidificándolos (Leopold y Lippold, 1995a) y disminuyendo la resistencia de los mismos al paso del fármaco (Leopold y Lippold, 1995b) y/o aumentando el coeficiente de reparto entre el fármaco, la formulación y el estrato córneo (Sato y cols., 1988).

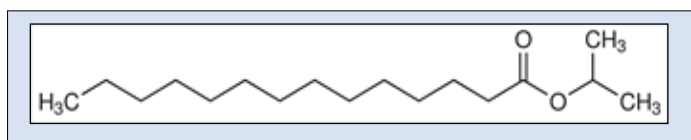


Figura 1.13. Estructura química del miristato de isopropilo.

- **Azona:** (1-dodecilazacicloheptan-2-ona) (Figura 1.14). Actúa rompiendo la organización de lípidos y aumentando el contenido hídrico de las proteínas del estrato córneo (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 lipofilia del fármaco (Diez-Sales y cols., 1996). Se usa normalmente a concentraciones bajas (1-5 %) y su actividad se ve favorecida por el uso de co-solventes como el propilenglicol. En estos casos el papel del co-solvente 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).

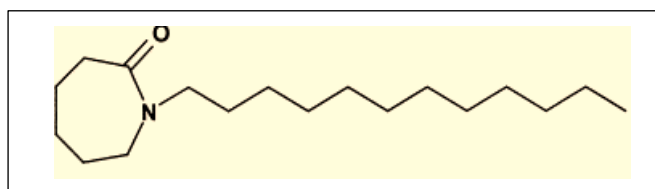


Figura 1.14. Estructura química de la azona

- **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 córneo (Goodman y Barry, 1989). Los tensioactivos catiónicos son los que producen una mayor irritación y daño en la piel, seguido de los tensioactivos aniónicos 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 córneo y de la solubilidad del fármaco en el vehículo.

- **Terpenos** (*Figura 1.15*): son constituyentes de los aceites esenciales constituidos por unidades de isopreno (C₅H₈), pudiendo incluir diversos heteroátomos en su estructura. Se clasifican en función del número de isoprenos que tienen en su estructura en monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅) y biterpenos (C₂₀). Las características fisicoquímicas varían de unos a otros, pero por lo general suelen tener una elevada lipofilia. 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). El mentol se distribuye entre los espacios intercelulares del estrato córneo con la consiguiente desorganización reversible de los lípidos (Kunta y cols., 1997), el timol aumenta la fluidez lipídica del estrato córneo 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 córneo, lo que contribuye a su efecto promotor (Zhao y Singh, 1998).

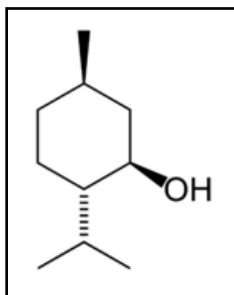


Figura 1.15. Estructura química del mentol

- **Sulfóxidos:** El dimetilsulfóxido (DMSO) (Figura 1.16) 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 córneo 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 ultimo 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 han estudiado derivados del mismo como el tetradecilmetilsulfóxido (TDCMS) y el decilmetilsulfóxido (DCMS).

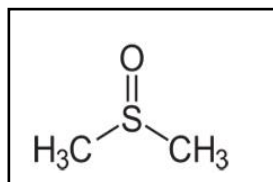


Figura 1.16. Estructura química del DMSO

- **Urea (Figura 1.17):** Es un compuesto higroscópico que aumenta la hidratación del estrato córneo, ya que induce la queratolisis de la piel después de un contacto prolongado, lo que forma canales hidrófilos 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 proteolíticos.

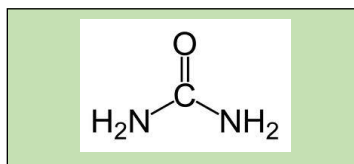


Figura 1.17. Estructura química de la urea

- **Pirrolidonas** (Figura 1.18): 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 córneo. 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 las pirrolidonas como la N-metil-2-pirrolidona entre otros. Esta actúa por extracción parcial de esfingolípidos del estrato córneo (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).

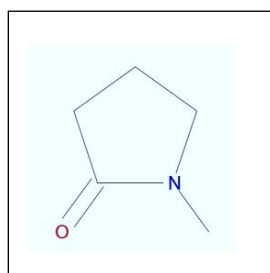


Figura 1.18. Estructura química de n-metil-2-pirrolidona

- **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 las regiones lipídicas fluidas del estrato córneo, 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 córneo. 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 córneo (Yum y cols., 1994), a concentraciones altas el etanol altera la estructura del estrato córneo 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 córneo (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 que también favorece la penetración de fármacos por vía intracelular (Takeuchi y cols., 1993).
- ***Nanoemulsiones y microemulsiones:*** Las nanoemulsiones mejoran el perfil transdérmico, aumentando el flujo de entrada, en parte debido a su elevada capacidad de solubilización de fármacos, aumentando su actividad termodinámica (Devarajan y Ravichandran, 2011). Kreilgaard (2002), aportan un estudio en el que comparan distintas microemulsiones con vehículos tradicionales (geles), observando un mayor flujo transdérmico en el caso de las microemulsiones. Pero cuando se comparan microemulsiones saturadas de fármaco (lidocaína) solo se observa una pequeña variación en los valores de flujo, de esta forma sugiere

que la estructura de la microemulsión no da lugar por si misma a un significativo incremento en la penetración. El aumento del flujo comparado con las formulaciones tradicionales parece pues ser atribuido a la mayor solubilidad de la lidocaína en el vehículo, incrementando el gradiente de concentración a través de la piel. La microemulsiones con un mayor contenido en surfactantes incrementan la penetración del fármaco, indicando que esa potenciación es principalmente debida a la modulación del surfactante sobre la barrera cutánea (Kreilgaard, 2002). Por otro lado, también observó que el coeficiente de permeabilidad del fármaco en la microemulsión no era sustancialmente mayor comparado con otras formulaciones tradicionales como las emulsiones con los mismos constituyentes. El flujo transdérmico global es incrementado debido a los elevados gradientes de concentración por la habilidad de la microemulsión en la solubilización de fármacos hidrófilos y lipófilos. En el caso de las microemulsiones, al contrario que con las nanoemulsiones, son sistemas dinámicos, que fluctúan continua y espontáneamente. Esto hace plausible que monómeros del tensioactivo puedan difundir a la superficie de la piel y actuar como promotor de la permeación, bien por causar una disrupción de la estructura lipídica del estrato córneo, facilitando la difusión a través de ella (provocaría un aumento del paso tanto dérmico como transdérmico) o bien por aumentar la solubilidad del fármaco en la piel, incrementando por ejemplo el coeficiente de partición del fármaco entre la piel y el vehículo (en este caso se aumentara principalmente el paso dérmico) (Kreilgaard, 2002).

La incorporación de colesterol en las nanoemulsiones aumenta la permeación de fármacos hidrófilos ya que incrementa los dominios hidrófilos del estrato córneo. En cambio la incorporación de ácido oleico facilita la difusión de fármacos a través de los dominios lipídicos del estrato córneo (Schmalfuss y cols., 1997).

1.3.6 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 córneo está regido por un proceso de difusión pasiva, regido por la 2ª ley de Fick (Scheuplein y Blank, 1971). La cantidad de fármaco (Q) que aparece en el medio receptor a un tiempo (t) se calcula mediante la siguiente expresión:

$$Q = APLC_0 \left[\frac{Dt}{L^2} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2 t}{L^2}\right) \right] \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

Donde A es el área de difusión, P el coeficiente de reparto entre el vehículo y la piel, L el espesor de la membrana, C_0 la concentración inicial del principio activo en el vehículo y D es 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:

$$\frac{Q}{A} = PLC_0 \left(\frac{D_t}{L^2} - \frac{1}{6} \right) \quad (\text{Ecuación 1.3})$$

A partir de ésta 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 (Barry, 2002):

$$J = \frac{C_0 PD}{L} = C_0 K_p \quad (\text{Ecuación 1.4})$$

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_l :

$$T_l = \frac{L^2}{6D} \quad (\text{Ecuación 1.5})$$

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:

$$J_{\max} = \frac{1,85 D P C_0 \delta}{L^2} \quad (\text{Ecuación 1.6})$$

Donde d 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, α , mediante la expresión:

$$J = \frac{D\alpha}{L\gamma_s} \quad (\text{Ecuación 1.7})$$

Donde γ_s es el coeficiente de actividad del fármaco en el estrato córneo y permanece constante si el vehículo no interacciona con la piel.

1.3.6.1 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 crio micrótopo. El fármaco retenido en cada lámina 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 córneo. 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.

1.4 REDES NEURONALES

En la mitad de los años 50 Frank Roseblatt construyó un modelo computacional para la retina, al cual llamó *Perceptrón*. En 1949 Hebb en su libro “The Organization of Behavior” describió un método por el cual las neuronas podían aprender; cuando la entrada desde la sinapsis a la neurona y la salida de esta eran ambas activas, entonces la fuerza sináptica de la conexión era reforzada. Para entonces, McCulloch (neurofisiólogo) y Pitts (matemático) ya habían publicado en 1943 un artículo donde exponían la creación de un modelo computacional de *actividad nerviosa*. Este modelo era un modelo binario, donde cada neurona tenía un escalón o umbral prefijado, y sirvió de base para los modelos posteriores.

Lo que actualmente se conoce como redes de neuronas artificiales (RNA) corresponde a un modo de computación analógica no lineal, distribuida, organizada por capas y auto programable que utiliza como computación local un modelo muy primitivo de neurona biológica. Este modelo consta esencialmente de un sumador con pesos ajustables seguido de una función de decisión no lineal (Olmeda y Barba-Romero, 1993).

1.4.1 Elementos de proceso que componen las RNA

La función básica de una neurona es sumar sus entradas y producir una salida si la suma es mayor que un umbral determinado. El tipo (excitatorio o inhibitorio) y la efectividad de éstas entradas, es función de la cantidad de señal recibida en la sinapsis, así como del tipo de éstas. La conexión de varias neuronas forma lo que comúnmente se denomina redes de neuronas.

Una red neuronal consiste en varios elementos de proceso conectados de alguna forma, generalmente organizados en grupos denominados *capas*. A partir de su situación dentro de la red, se pueden distinguir tres tipos de capas:

- **Capa de entrada:** es la capa que recibe directamente la información proveniente de las fuentes externas de la red.
- **Capas ocultas:** son internas a la red y no tienen contacto directo con el entorno exterior. El número de niveles ocultos puede estar entre cero y un número elevado. Las neuronas de las capas ocultas pueden estar interconectadas de distintas maneras, lo que determina, junto con su número, las distintas topologías de redes neuronales.
- **Capa de salida:** muestra la respuesta de la red a una entrada dada.

A continuación, se puede ver en la Figura 1.19, un esquema de una red neuronal:

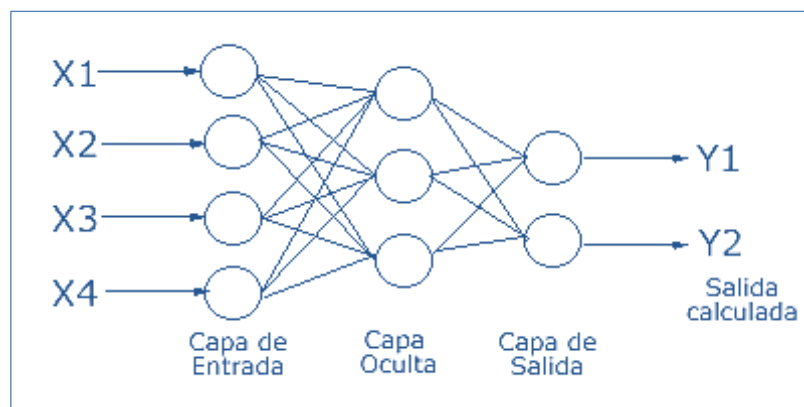


Figura 1.19. Ejemplo de una red neuronal totalmente conectada

1.4.2 Características de las RNA

Las redes neuronales artificiales, al igual que las redes de neuronas biológicas, almacenan la información en los pesos asociados a las conexiones entre elementos de proceso. Podría decirse que una red diseñada para un fin específico, consta de un número determinado de elementos de proceso conectados en una estructura concreta y adecuada a tal fin, de unos pesos generalmente fijos en las conexiones entre estos elementos de proceso, y de una dinámica de funcionamiento que permita a la red obtener la salida deseada a una entrada dada. Esto hace que se pueda estudiar las características principales de una red neuronal:

1. INTRODUCCIÓN

- **Topología.** La forma simplificada de una red no contiene conexiones hacia atrás, de unas capas hacia otras, conexiones dentro de la misma capa, ni de un elemento de proceso a sí mismo. Estas redes son llamadas comúnmente *redes feedforward*. Actualmente, en distintos modelos de redes coexisten distintos tipos de conexiones, llegando en ocasiones a una interconexión total.
- **Aprendizaje.** El proceso para almacenar la información en los pesos de las conexiones viene dado por lo que comúnmente denominamos como *aprendizaje*. Las redes neuronales generan sus propias reglas aprendiendo de ejemplos que le son mostrados. El aprendizaje se consigue a través de reglas que adaptan o cambian los pesos de las conexiones de la red en respuesta a los ejemplos de entrada dados, y opcionalmente a la salida deseada para esas entradas.

Si la salida deseada es suministrada a la red por un entrenador, se llama *aprendizaje supervisado*. Cuando no se le muestra a la red la salida deseada, el aprendizaje se denomina *aprendizaje no supervisado*. Una tercera clase de aprendizaje, es el *aprendizaje reforzado*, en el cual un entrenador externo le pasa información a la red, informando únicamente si la respuesta a una entrada es buena o mala.

- **Dinámica de funcionamiento.** Una red neuronal puede procesar los estímulos presentados a las entradas y crear una respuesta de salida mediante una etapa de aprendizaje.
- **Tolerancia a fallos.** En la mayoría de redes neuronales algunos elementos de proceso son destruidos, dañados o sus conexiones alteradas, por lo tanto, el funcionamiento normal de la red sufre, pero la información no es almacenada en un lugar, sino que es distribuida a través de todo el sistema.
- **Reconocimiento de patrones.** Las redes neuronales se adaptan a muchas tareas de reconocimiento de patrones, más aún que los sistemas expertos, debido a que poseen la habilidad de aprender y construir estructuras específicas para un problema en particular.
- **Síntesis.** Algunas redes neuronales tienen la capacidad de extraer y aprender características de una o más entradas.

1.4.3 Redes neuronales con activación hacia adelante

Las redes neuronales con activación hacia adelante (*Feedforward neural networks* o FNNs, en inglés) son un enfoque popular dentro del área del aprendizaje automático para abordar problemas de clasificación y regresión, con propiedades muy interesantes (Bishop, 1995).

Un tipo específico de FNNs, las redes con activación hacia adelante de una sola capa oculta (*single-hidden-layer feed-forward networks* o SHLFNs, en inglés), juegan un rol importante en las aplicaciones prácticas, debido a que el número óptimo de neuronas en la capa oculta es dependiente del problema y desconocido a priori; los usuarios a menudo eligen el número de neuronas ocultas mediante prueba y error. Una vez fijada la arquitectura de la red, se suele aplicar algún algoritmo iterativo de aprendizaje, tal como el descenso de gradiente por retro-propagación de error (*error back-propagation*), para ajustar los pesos en las capas ocultas y de salida simultáneamente.

La versión más simple de FNN es el perceptrón lineal, una única neurona (o unidad computacional) en la que la variable de salida y es sencillamente una función lineal de las variables de entrada \mathbf{x} , esto es:

$$y = \mathbf{w} \mathbf{x} + b \quad (\text{Ecuación 1.8})$$

Donde \mathbf{w} es un vector de parámetros ajustables (*pesos*) y b es un parámetro libre adicional denominado *bias*. Se pueden considerar varias variables de salida y_i , cada una asociada a sus propios pesos \mathbf{w}_i y bias b_i , formando una capa de salida de neuronas lineales con un vector de entrada \mathbf{x} común.

Cuando se asume que la relación entre las variables de entrada y de salida es no-lineal, además de la capa de salida lineal, se introduce una capa oculta previa de neuronas (o unidades) no-lineales para permitir aproximaciones no-lineales a la función que se trata de aprender. El tipo resultante de FNNs recibe varios nombres en la literatura de ciencias de la computación, tales como perceptrones de dos capas y redes con activación hacia adelante de una sola capa oculta (*single-hidden-layer feed-forward networks* o SHLFNs).

La función de salida de una SHLFN (con una única capa oculta de N_h neuronas y m neuronas lineales de salida) se puede expresar como una combinación lineal de funciones (de base) simples:

$$\mathbf{y}_{N_h}(\mathbf{x}) = \lambda_0 + \sum_{j=1}^{N_h} \lambda_j \phi_j(\mathbf{w}_j, b_j, \mathbf{x}) \quad (\text{Ecuación 1.9})$$

Donde $\mathbf{w}_j \in \mathbb{R}^n$ y $b_j \in \mathbb{R}$ son los parámetros de aprendizaje de las neuronas ocultas, $\lambda_j \in \mathbb{R}^m$ son los pesos de la capa de salida que conectan la neurona oculta j -ésima con las m neuronas de salida, ϕ es la función de activación de las neuronas ocultas, $\phi_j(\mathbf{w}_j, b_j, \mathbf{x})$ es la salida de la neurona oculta j -ésima para la entrada $\mathbf{x} \in \mathbb{R}^n$, y $\lambda_0 \in \mathbb{R}^m$ representa los términos de bias de las neuronas lineales de salida.

Aunque se pueden usar numerosas funciones de activación ϕ (incluso algunas que no tienen nada que ver con los modelos de neuronas biológicas) que tienen asociada una capacidad teórica de aproximación universal de funciones, las opciones más usuales son la función Gaussiana RBF aplicada a la distancia entre un vector de entrada y un centro:

$$\phi_j(\mathbf{w}_j, b_j, \mathbf{x}) = e^{-b_j \|\mathbf{x} - \mathbf{w}_j\|^2 / 2} \quad (\text{Ecuación 1.10})$$

Y la función sigmoïdal (p.ej. la tangente hiperbólica) aplicada al producto escalar de los vectores de entradas y de pesos

$$\phi_j(\mathbf{w}_j, b_j, \mathbf{x}) = \tanh(\mathbf{w}_j \mathbf{x} + b_j) \quad (\text{Ecuación 1.11})$$

Dado un conjunto de L ejemplos de entrenamiento $\{(\mathbf{x}_i, \mathbf{t}_i)\} \subset \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^m$, que son pares de vectores de entradas y sus correspondientes vectores de salidas deseadas, el objetivo de entrenar la red es ajustar todos sus parámetros (pesos y bias) para minimizar una función de error. Normalmente, la función de coste usual en las SHLFNs (y en las FNNs en general) es la suma de error cuadrático (*sum-of-squares error*):

$$E = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^L \|\mathbf{y}_{N_h}(\mathbf{x}_i) - \mathbf{t}_i\|^2 \quad (\text{Ecuación 1.12})$$

1.4.4 Aplicaciones de las Redes Neuronales

Según Matich (2001), las redes neuronales pueden utilizarse en un gran número y variedad de aplicaciones, tanto comerciales como militares.

Se pueden desarrollar redes neuronales en un periodo de tiempo razonable, con la capacidad de realizar tareas concretas mejor que otras tecnologías. Cuando se implementan mediante hardware (redes neuronales en chips VLSI), presentan una alta tolerancia a fallos del sistema y proporcionan un alto grado de paralelismo en el procesamiento de datos. Esto posibilita la inserción de redes neuronales de bajo coste en sistemas existentes y recientemente desarrollados.

Hay muchos tipos diferentes de redes neuronales; cada uno de los cuales tiene una aplicación particular más apropiada. Algunas aplicaciones comerciales son:

- **Biología:**

- Aprender más acerca del cerebro y otros sistemas.
- Obtención de modelos de la retina.

- **Empresa:**

- Evaluación de probabilidad de formaciones geológicas y petrolíferas.
- Identificación de candidatos para posiciones específicas.
- Explotación de bases de datos.
- Optimización de plazas y horarios en líneas de vuelo.
- Optimización del flujo del tránsito controlando convenientemente la temporización de los semáforos.
- Reconocimiento de caracteres escritos.
- Modelado de sistemas para automatización y control.

- **Medio ambiente:**

- Analizar tendencias y patrones.
- Previsión del tiempo.

- **Finanzas:**

- Previsión de la evolución de los precios.

1. INTRODUCCIÓN

- Valoración del riesgo de los créditos.
 - Identificación de falsificaciones.
 - Interpretación de firmas.
- **Manufacturación:**
 - Robots automatizados y sistemas de control (visión artificial y sensores de presión, temperatura, gas, etc.).
 - Control de producción en líneas de procesos.
 - Inspección de la calidad.
- **Medicina:**
 - Analizadores del habla para ayudar en la audición de sordos profundos.
 - Diagnóstico y tratamiento a partir de síntomas y/o de datos analíticos (electrocardiograma, encefalogramas, análisis sanguíneo, etc.).
 - Monitorización en cirugías.
 - Predicción de reacciones adversas en los medicamentos.
 - Entendimiento de la causa de los ataques cardíacos.
- **Militares:**
 - Clasificación de las señales de radar.
 - Creación de armas inteligentes.
 - Optimización del uso de recursos escasos.
 - Reconocimiento y seguimiento en el tiro al blanco.

La mayoría de estas aplicaciones consisten en realizar un reconocimiento de patrones, como ser: buscar un patrón en una serie de ejemplos, clasificar patrones, completar una señal a partir de valores parciales o reconstruir el patrón correcto partiendo de uno distorsionado. Sin embargo, está creciendo el uso de redes neuronales en distintos tipos de sistemas de control.

Desde el punto de vista de los casos de aplicación, la ventaja de las redes neuronales reside en el procesado paralelo, adaptativo y no lineal.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La administración de principios activos sobre la piel con el objetivo de obtener un efecto local, es un procedimiento que se viene realizando desde hace mucho tiempo atrás (aplicación de lociones, cremas, ungüentos, cataplasmas, etc.). Sin embargo, con el transcurso de estos últimos años, se ha puesto de manifiesto que puede utilizarse la piel como vía de administración de fármacos, formulados de tal forma que el principio activo desarrolle una acción sistémica (Scott, 1990). Así pues, el empleo con éxito de la vía tópica y de la transdérmica como alternativa a la vía oral, ha dado lugar a un gran avance en cuanto al conocimiento de la estructura de la piel y en cuanto a los mecanismos de transporte de sustancias a través de ella. Cabe considerar que una de las líneas de investigación aplicada en el campo de la Farmacia es el diseño de nuevos sistemas de liberación de fármacos sobre la piel (parches transdérmicos, liposomas, microemulsiones, nanoemulsiones, etc.) que contienen excipientes novedosos y promotores de la permeación cutánea que permiten alcanzar el objetivo deseado: liberación local, regional o transdérmica del fármaco.

Dentro de la terapéutica utilizada en el tratamiento de patologías relacionadas con procesos alérgicos, los antihistamínicos son muy utilizados en la práctica clínica diaria (Tharp, 2000), tanto para su aplicación sobre la piel como su administración por vía oral. No obstante, a pesar que los antihistamínicos de nuevas generaciones presentan menores efectos anticolinérgicos, la vía transdérmica puede resultar, para este grupo de fármacos, una alternativa a la vía oral, teniendo además la ventaja de poder alargar la pauta de dosificación.

Por este motivo, resulta interesante estudiar las características de permeación cutánea de cetirizina diclorhidrato en piel humana, estudios que permitirán obtener la suficiente información con el objetivo de vehicularla en sistemas de liberación nanoestructuradas destinadas al tratamiento de alteraciones patológicas locales que cursen con procesos alérgicos. Esto también representaría una aportación en la optimización de las actuales formas de dosificación.

En la modulación de la penetración transdérmica de fármacos juega un papel muy importante la propia forma farmacéutica y la utilización de sustancias promotoras del paso del fármaco a través de la piel.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

De acuerdo con las consideraciones anteriormente mencionadas, el objetivo principal de este trabajo consiste en la obtención de distintas microemulsiones y nanoemulsiones de cetirizina con el fin de obtener un efecto antihistamínico local por un lado y un efecto sistémico por el otro.

Por tanto, como objetivos secundarios se pueden destacar:

- a) Estudiar *in vitro* la absorción transdérmica de cetirizina vehiculizada en formulaciones nanoestructuradas con distintos promotores.
- b) Optimizar las formulaciones por medio de redes neuronales con el fin de obtener concentraciones plasmáticas predichas, dentro del intervalo terapéutico.
- c) Desarrollar y evaluar una formulación nanoestructurada de cetirizina para la obtención de un efecto local tópico sobre la piel.

De acuerdo con lo expuesto, el plan de trabajo a seguir será el siguiente:

1. Validar la metodología analítica de cetirizina en las muestras de trabajo.
2. Estudiar la permeación intrínseca *in vitro* de cetirizina a través de piel humana. Determinar los parámetros biofarmacéuticos de permeación. Analizar estadísticamente los resultados obtenidos.
3. Estudiar la permeación transdérmica de cetirizina a partir de las diferentes formulaciones preparadas con los distintos promotores de absorción percutánea. Calcular los principales parámetros de permeación. Analizar estadísticamente los resultados obtenidos.
4. Optimizar la formulación nanoestructurada mediante redes neuronales, con el fin de obtener diferentes proporciones de excipientes y promotores de la absorción percutánea que maximicen el flujo transdérmico, manteniendo las concentraciones plasmáticas predichas dentro del intervalo terapéutico.

5. Elaborar una formulación nanoestructurada y un hidrogel de cetirizina. Estudiar la caracterización físico-química, liberación y penetración transdérmica de la formulación.
6. Evaluar in vivo del efecto antihistamínico de la formulación nanoestructurada y el hidrogel, frente a dos formulaciones comerciales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se detallan los materiales utilizados en el presente trabajo, así como la metodología empleada en cada una de las experiencias realizadas.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Fármacos

Se utilizó diclorhidrato de cetirizina en todas las formulaciones preparadas proveniente del laboratorio Reig Jofre (Madrid, España).

3.1.2 Excipientes

Isostearato de isostearilo

- Aplicación: vehículo oleoso que tiene la propiedad de formar una película de forma que proporciona un tacto agradable y facilita la aplicación de cremas y lociones.
- Aspecto: líquido
- Proveedor: Gattefossé, Saint-Priest, France.

Labrasol® (PEG-8 Caprylic/Capric Glyceridas)

- Aplicación: tensioactivo con marcadas propiedades para solubilizar fármacos en microemulsiones.
- Aspecto: líquido oleoso.
- Proveedor: Gattefossé, Saint-Priest, France.

Plurol oleico® (Polyglyceryl-3 dioleato)

- Aplicación: vehículo oleoso usado como co-tensioactivo en las microemulsiones.
- Aspecto: líquido oleoso.
- Proveedor: Gattefossé, Saint-Priest, France.

Transcutol P® (Highly purified diethylene glycol monoethyl ether)

- Aplicación: potente solubilizador de fármacos y promotor de la absorción.
- Aspecto: líquido transparente.
- Proveedor: Gattefossé, Saint-Priest, France.

Propilenglicol

- Aplicación: Solvente y promotor de la absorción.
- Aspecto: Líquido.
- Proveedor: (Panreac Química SA, Montcada y Reixac, España).

Agua desionizada

Fase acuosa de las formulaciones. Obtenida mediante el equipo Sation 9000.

3.1.3 Promotores de la permeación cutánea

- 1-Decanol (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany).
- 1-Dodecanol (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany).
- 1,8-Cineol (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany).
- Alcohol miristílico (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany).
- Azona (Reig Jofre, Barcelona, España)
- d-limoneno (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany).
- Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany).
- Escualeno (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany).
- N-Dodecilpirrolidona (ISP Farma, S.L., Madrid, España).
- N-Etilpirrolidona (ISP Farma, S.L., Madrid, España).
- N-Metilpirrolidona (ISP Farma, S.L., Madrid, España).
- N-Octilpirrolidona (ISP Farma, S.L., Madrid, España).
- Nonano (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany).
- Octanol (Sigma-Chemical, St. Louis, USA).

3.1.4 Reactivos químicos

Todos los reactivos utilizados han sido suministrados por empresas de reconocida garantía y del máximo grado de pureza disponible.

- Acetonitrilo (Panreac Química SA, Montcada y Reixac, España).
- Acetato de amonio (Panreac Química SA, Montcada y Reixac, España).
- KH_2PO_4 (Panreac Química SA, Montcada y Reixac, España).
- Na_2HPO_4 (Panreac Química SA, Montcada y Reixac, España).
- Etanol calidad CLAE para análisis instrumental (Panreac Química SA, Montcada y Reixac, España).
- Laurilsulfato sódico (Sucesores de José Escuder, S.L., Rubí, España).
- Hidróxido de sodio (Panreac Química, Barcelona, España).
- Solución de cloruro sódico 0,9% (Braun Medical, Rubí, España).
- Hidroxietil celulosa (Natrosol®, Quiminet, Madrid, España).

3.1.5 Reactivos biológicos

- ***Piel humana*** de la zona abdominal procedente de excedentes de lipectomías de cirugía plástica. Para la utilización de la piel en trabajos de experimentación se obtuvo la correspondiente autorización por parte del *Comité Ético del Hospital de Barcelona* que suministraba las muestras.
- ***Conejos albinos machos de Nueva Zelanda*** (2,7-3,5 Kg, St. Feliu de Codines, Barcelona, España). Todas las metodologías que utilizan animales de experimentación están aprobadas por el *Comité Ético de Experimentación Animal* (CEEAA) de la Universidad de Barcelona. Todos los animales se han tratado siguiendo las recomendaciones de la normativa *Ethical Guidelines for Investigation of Experimental Pain in Conscious Animals of the International Association for the Study of Pain* (Zimmerman M, 1983).

3.1.6 Soluciones

Se han preparado las siguientes soluciones:

- *Solución de acetato de amonio y acetonitrilo*

Se prepara una solución tampón de 10mM de acetato de amonio (0,77g y se diluye en un litro de agua desionizada) y acetonitrilo (50:50 v/v). Esta solución es empleada como fase móvil para la valoración de cetirizina por CLAE.

- *Solución reguladora de fosfato pH 7,4*

KH₂PO₄.....9,08 g/l

Na₂HPO₄.....11,88 g/l

Se ajusta el pH a 7,4 con NaOH en caso necesario. Solución utilizada para la preparación de las rectas de calibración y como solución receptora en los estudios de absorción percutánea.

- *Solución de etanol/agua (50:50) y propilenglicol/agua (50:50)*

Soluciones utilizadas para el estudio de permeación intrínseca de cetirizina.

- *Solución de acetonitrilo/agua (50:50)*

Solución utilizada para la extracción del fármaco retenido en la piel.

3.1.7 Formulaciones farmacéuticas

- *Soluciones saturadas de cetirizina*

Se han preparado soluciones saturadas de cetirizina base y cetirizina diclorhidrato en una solución de propilenglicol/agua (50:50 v/v) y también en una solución de etanol/agua (50:50 v/v) para estudiar la permeación intrínseca del fármaco.

- ***Formulaciones farmacéuticas con un 5% (p/p) de cetirizina diclorhidrato y 10% de diferentes pirrolidonas***

Se han preparado cuatro formulaciones farmacéuticas con cetirizina diclorhidrato al 5% (p/p) y con un 10% de los siguientes promotores: metilpirrolidona, etilpirrolidona, octilpirrolidona y dodecilpirrolidona.

- ***Formulaciones farmacéuticas con un 5% (p/p) de cetirizina diclorhidrato y 10% de diferentes alcanoles***

Se han preparado cinco formulaciones farmacéuticas con cetirizina diclorhidrato al 5% (p/p) y con un 10% de los siguientes promotores: octanol, nonano, decanol, dodecanol y alcohol miristílico.

- ***Formulaciones farmacéuticas con un 5% (p/p) de cetirizina diclorhidrato y 10% de diferentes promotores***

Se han preparado seis formulaciones farmacéuticas con cetirizina diclorhidrato al 5% (p/p) y con un 10% de los siguientes promotores: limoneno, escualeno, cineol, nonano, azona y decanol.

- ***Formulaciones farmacéuticas con un 5% (p/p) de cetirizina diclorhidrato y 5% de dimetilsulfóxido y 5% de decanol.***

Se ha preparado una formulación farmacéutica con cetirizina diclorhidrato al 5% (p/p) y con un 5% de dimetilsulfóxido y 5% de decanol como promotores de la permeación.

- ***Hidrogel de cetirizina diclorhidrato al 5% (p/p)***

Se preparó un hidrogel de cetirizina al 5% (p/p) para el estudio del fármaco in vitro y ex vivo en piel humana y su evaluación tópica antihistamínica en conejos.

- *Nanoemulsión de cetirizina diclorhidrato al 5% (p/p)*

Se preparó una nanoemulsión de cetirizina al 5% (p/p) para el estudio del fármaco in vitro y ex vivo en piel humana y su evaluación tópica antihistamínica en conejos.

- *Formulaciones comerciales de referencia:*

- ✓ Fenistil® gel

Composición: Por 1g: Dimetindeno maleato, 1,0 mg.

Laboratorio: Novartis Consumer Health S.A.

- ✓ Polaramine® crema

Composición: Por 1g: Alantoína, 5,0 mg; Dexclorfeniramina maleato, 2,0 mg.

Laboratorio: Merck Sharp & Dohme

3.1.8 Aparatos

A continuación, se indican los aparatos utilizados en las diferentes etapas de la tesis doctoral.

3.1.8.1 . Aparatos básicos

- Balanza de precisión Mettler Toledo, modelo AT261, Delta Range®.
- Balanza granataria Mettler, modelo PJ3000
- Pipetas y micropipetas de volumen variable:
 - 100 µl (SOCOREX)
 - 100–1000 µl (TREFF L)
- Matraces de 50 y 10 ml, clase A.
- Vasos de precipitado Erlenmeyer.
- Tubos de vidrio.
- Viales topacio de 1 ml. Waters
- Agitador magnético/calector Heildolph, modelo MR 2002
- Baño de ultrasonidos Selecta, modelo. 514
- Vórtex/agitador de tubos Heildolph, modelo. REAX 2000

- pH/mV metro digital Crison 501 (Crison, Barcelona, España)
- Congelador Liebher (-20° C)
- Dermatomo con acumulador Aesculap, modelo. GA 630.
- Equipo Sation 9000 para la obtención de agua calidad CLAE.

3.1.8.2 . Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)

Para el análisis cuantitativo de las distintas formulaciones de cetirizina se utilizaron dos equipos, un equipo Waters modelo LC Module I Plus CLAE con detector UV (Waters Cromatografía, S.A., Barcelona, España), y otro, el equipo Waters 515 con detector UV-VIS 2487 (Waters, Milford, MA). La CLAE es una técnica cromatográfica de elución, utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones físico-químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

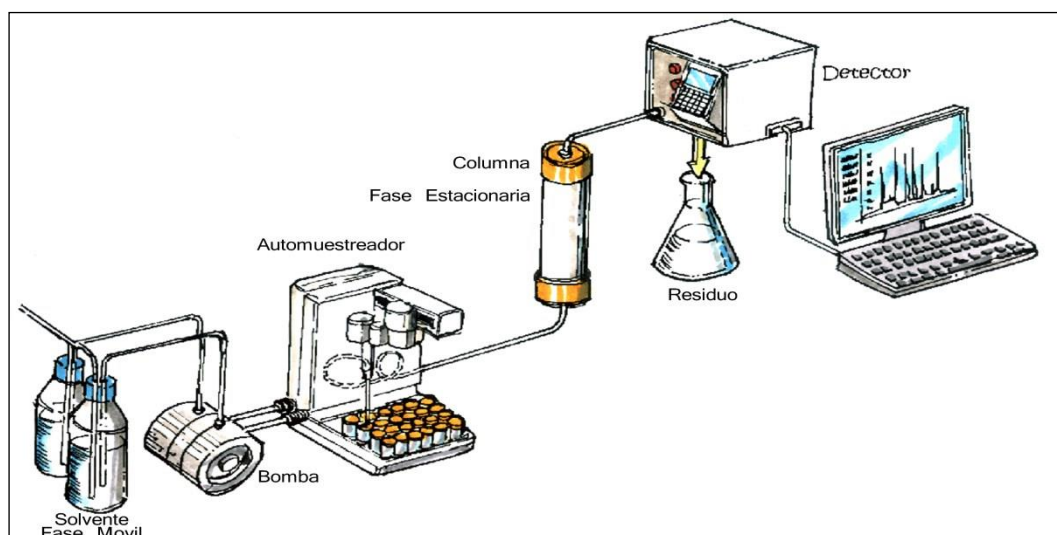


Figura 3.1. Esquema del HPLC. (Analytical Methods. Linde Gases Division

http://hiq.lindegas.com/international/web/lg/spg/like35lgspg.nsf/docbyalias/image_hplc)

En esta técnica (Figura 3.1), la fase móvil (fase acuosa polar, con un modificador orgánico, como el acetonitrilo) se pone en contacto con la muestra a analizar y se bombea a alta presión a través de la columna de cromatografía donde se encuentra la fase estacionaria (normalmente partículas de sílice unidas mediante enlaces silanol a cadenas hidrocarbonadas de distinta longitud, como ocho o dieciocho átomos de carbono, u otro tipo de sustituyentes). A medida que la muestra avanza por la columna, sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de

3. MATERIAL Y MÉTODOS

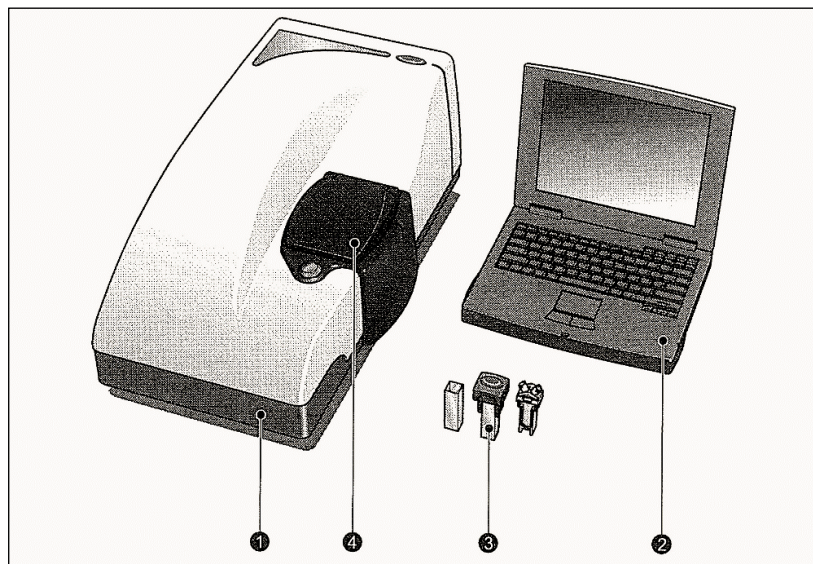
la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil, lo que lleva implícito que, después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas eluirán a un tiempo diferente, y estarán separadas.

El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad de elución de los compuestos y reduce su difusión dentro de la columna, mejorando con ello la resolución de la cromatografía.

3.1.8.3 Equipo para el análisis de la distribución del tamaño de partícula

Se utilizó el equipo Z-sizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) que utiliza la tecnología de la dispersión dinámica de la luz (DLS, Dynamic Light Scattering), para medir el tamaño de gota de todas las formulaciones nanoestructuradas de cetirizina, (Figura 3.2).

Figura 3.2. Equipo Z-sizer (1), ordenador con el software Z-sizer instalado (2), cubeta de cuarzo (3)



y espacio donde se coloca la cubeta (4).

El Potencial Zeta, es una medida de la magnitud de la repulsión o la atracción electrostática entre partículas adyacentes, cargadas de manera similar en una dispersión. Si todas las partículas presentes en el sistema tienen un valor de potencial zeta alto, sea negativo o positivo, tenderán a repelerse entre sí, resistiéndose a la agregación, por lo que el sistema es estable. Sin embargo, si las partículas tienen

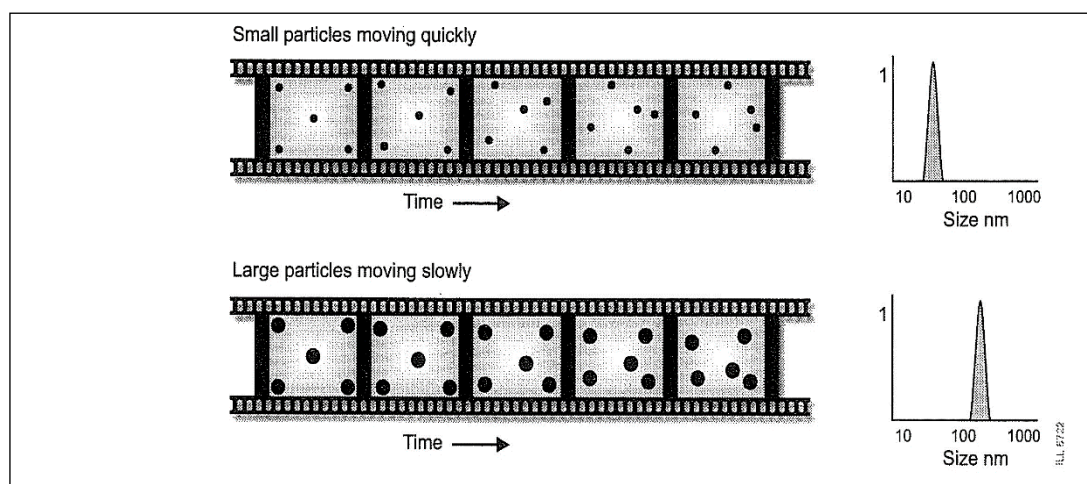
valores de potencial zeta bajo, sea negativo o positivo, las fuerzas de atracción superan a las de repulsión, en consecuencia, las partículas tenderán a unirse y flocular.

Por lo tanto, emulsiones con potencial zeta (negativo o positivo) elevado están eléctricamente estabilizadas, mientras que los coloides con bajos valores de potencial zeta tienden a coagular o flocular. La línea divisoria general entre suspensiones estables e inestables está generalmente entre +30 o -30 mV. Las partículas con potenciales Zeta más positivas que +30 mV o más negativo de -30 mV son normalmente consideradas estables.

El potencial Zeta no es una medición directa; en el presente estudio se determina mediante una celda de inmersión para potencial Z en un aparato Z-sizer Nano ZS. Esta técnica se realiza a través de la aplicación de un campo eléctrico controlado por medio de electrodos inmersos en la muestra; esto provoca que las partículas cargadas se muevan a través del electrodo de polaridad opuesta, a una velocidad determinada. Las fuerzas viscosas que actúan en la partícula en movimiento tienden a oponerse a este movimiento, estableciéndose un equilibrio entre ambas fuerzas de atracción electrostática y la resistencia de viscosidad. Esta velocidad se mide usando una técnica láser interferométrica patentado llamado M3-PALS (análisis de fase de dispersión de luz). Esto permite el cálculo de la movilidad electroforética, y a partir de ella, el potencial Zeta.

Estas técnicas aplican la ecuación de Henry con la aproximación de *Smoluchowski* incluido en el software del sistema (Zeta Potential Using Laser Doppler Electrophoresis. Malvern.com).

Figura 3.3. Esquema del movimiento de partículas pequeñas y partículas grandes en un líquido.



3.1.8.4 . Microscopio de transmisión electrónica (TEM)

Para examinar la morfología de la nanoemulsión, se procedió a la observación con el Microscopio de Transmisión Electrónica Zeiss 902 CEM (Zeiss, Barcelona, España).

Esta microscopia utiliza un haz de electrones para bombardear la muestra. De esta manera se puede superar la limitación de la microscopia óptica, en la cual la resolución de la técnica viene determinada por la longitud de onda de la luz, por lo que no se pueden visualizar estructuras cuyo tamaño sea inferior a dicha longitud.

El aparato está compuesto por una fuente de electrones (filamento de tungsteno, por ejemplo) que son acelerados por la acción de un campo electromagnético. Dicho haz de electrones viaja por el vacío hasta la muestra, atravesándola y llegando a una placa reveladora.

Esta técnica permite determinar el tamaño de las gotas de la nanoemulsión, así como su morfología. Para poder observar la muestra se ha de realizar un pre tratamiento de la misma en función de la técnica específica a utilizar. Al utilizar TEM lo que se hace es una tinción negativa con un metal pesado como el acetato de uranilo. Las zonas donde este se deposita son opacas al haz de electrones por lo que se ven teñidas de oscuro en las imágenes de TEM. El crio-TEM con fractura por otro lado permite la observación directa del sistema. En este caso la muestra se congela rápidamente y se fractura. La superficie de interés se cubre con platino-carbono. La muestra original se elimina por inversión en agua y la réplica de metal se observa en el microscopio. A pesar de que el crio-TEM es una buena técnica para la observación de la nanoemulsión, el TEM con tinción negativa representa una buena alternativa a este ya que la morfología de la muestra está relativamente bien preservada, a pesar de que se puedan observar artefactos (Klang y cols., 2012).

3.1.8.5 Equipo para el estudio de la viscosidad

Para determinar el comportamiento reológico de las formulaciones se utilizó el reómetro HAAKE. Se utilizó un sistema de cilindros coaxiales, uno exterior que permanece fijo y otro interno (spindle) que gira. La resistencia a la deformación de la muestra, al hacer girar los cilindros, es lo que permite determinar el comportamiento reológico y la viscosidad de la formulación. El dispositivo consta de los siguientes elementos (Figura 3.4):

- Viscosímetro *HAAKE* modelo *VT 500* de cilindros coaxiales.
- Juego de cilindros coaxiales y *spindles* (*MV2*, *SV2* y *SV1*).
- Baño termostático a una temperatura prefijada *Haake DC30*.
- Ordenador PC provisto de software *RheoWin Job Manager 2.97* y *RheoWin Data Manager*.
- Impresora.



Figura 3.4. Viscosímetro integrado al ordenador.

Resulta de interés revisar algunos conceptos básicos sobre reología:

La reología describe cómo se deforma un cuerpo sometido a una fuerza externa. Esta fuerza por unidad de superficie se denomina fuerza de deformación o también esfuerzo de cizalla (shear stress), simbolizado por τ (Tau) y se mide en Pascal (Pa). Como respuesta al esfuerzo de cizalla, los cuerpos sólidos sufren una deformación denominada deformación por cizalla (shear strain) designada por γ (Schramm, 2004; Halbaut, 1994).

Los líquidos sometidos a un esfuerzo de cizalla fluyen, deformándose irreversiblemente. Esta respuesta se conoce como gradiente de velocidad de deformación o velocidad de cizalla (shear rate) designado por D (en s^{-1}) (Halbaut, 1994). También designada por $\dot{\gamma}$ (Schramm, 2004).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para líquidos ideales (fluidos newtonianos) la constante de proporcionalidad entre el esfuerzo de cizalla (τ) y el gradiente de velocidad (γ) se define como viscosidad y se designa por η :

$$\eta = \tau / \gamma \text{ (en Pa}\cdot\text{s)} \quad \text{(Ecuación 3.1)}$$

Cabe mencionar que 1 milipascal·segundo, ($1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) equivale a 1 centipoise (cP).

La relación entre el esfuerzo de cizalla y gradiente de velocidad de cizalla que describe el comportamiento de fluidez de un líquido puede representarse gráficamente, (τ en ordenadas y γ en abscisas); la curva obtenida se denomina *curva de fluidez o flujo*. Es también usual la representación de η frente de γ denominada *curva de viscosidad*.

Estas curvas se obtienen mediante viscosímetros que permitan hacer medidas en continuo del estado de cizallamiento (*steady state shearing measurements*), como los viscosímetros clásicos de cilindros coaxiales o de tipo cono-placa. Así, de acuerdo con estas curvas, podemos diferenciar diferentes tipos de comportamiento reológico, newtoniano y no newtoniano (Figura 3.5).

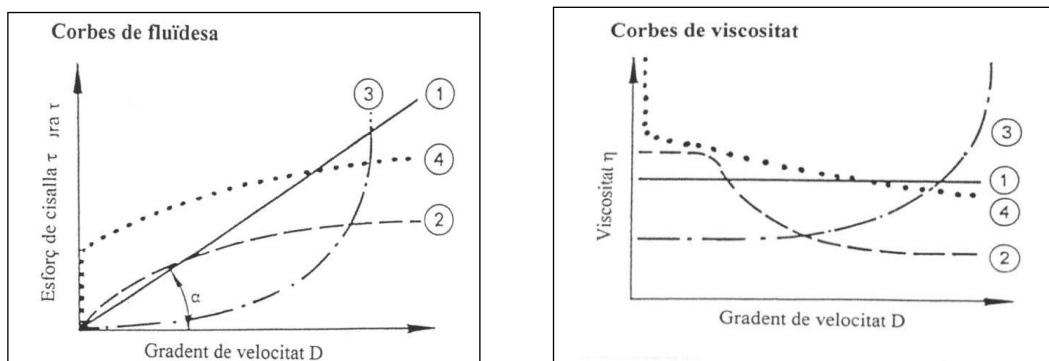


Figura 3.5. Tipos de comportamientos reológicos. 1: Líquido newtoniano. Líquidos no newtonianos: 2: Líquido con viscosidad estructural, 3: Líquido dilatante, 4: Líquido con viscosidad estructural y con límite de fluidez = líquido plástico.

- **Flujo newtoniano**

La representación gráfica de la ecuación de *Newton* ($\tau = \eta \cdot \gamma$) (Correspondiente a recta 1 de la figura 1.24.) es una línea recta de pendiente positiva ($\text{tg } \alpha = \eta$) que pasa por el origen de coordenadas. En este caso, el cociente τ/γ es constante, y por tanto significa que la viscosidad es independiente del gradiente de velocidad ($\eta = \text{cte}$).

- **Flujo no newtoniano**

Todo líquido que no muestra el comportamiento anteriormente descrito se denomina no newtoniano. Se distinguen dos tipos de comportamientos no newtonianos: independientes del tiempo y dependientes del tiempo.

3.1.8.6 Análisis de la textura del hidrogel.

Se procedió a determinar la texturometría del gel mediante un Texturómetro modelo TA-XT2i (Stable Micro Systems, Reino Unido). Este aparato dispone de un tubo cilíndrico que se deja caer sobre la muestra, a una determinada distancia de penetración y a una determinada velocidad. Esta operación se realiza por duplicado tras un periodo de reposo. La representación gráfica de las curvas de fuerzas (Figura 3.6) obtenida permite determinar (Jones y cols., 1997):

- **Dureza.** Definida como la fuerza necesaria para conseguir una deformación, es decir la fuerza necesaria para que el cilindro penetre en la muestra. Gráficamente corresponde al valor máximo del eje de abscisas
- **Compresibilidad.** Es el trabajo requerido para deformar el producto durante el primer ciclo de compresión. Gráficamente corresponde al área bajo la curva del primer momento de la gráfica de fuerzas
- **Adhesividad** o trabajo necesario para superar las fuerzas atractivas entre la superficie del producto y la superficie del cilindro una vez han entrado en contacto. Corresponde al área bajo la curva del segundo momento de la gráfica de fuerza.

- **Cohesividad** o relación que se establece entre el área del primer momento de la gráfica de fuerza (o compresibilidad) del primer y segundo ciclo de compresión.

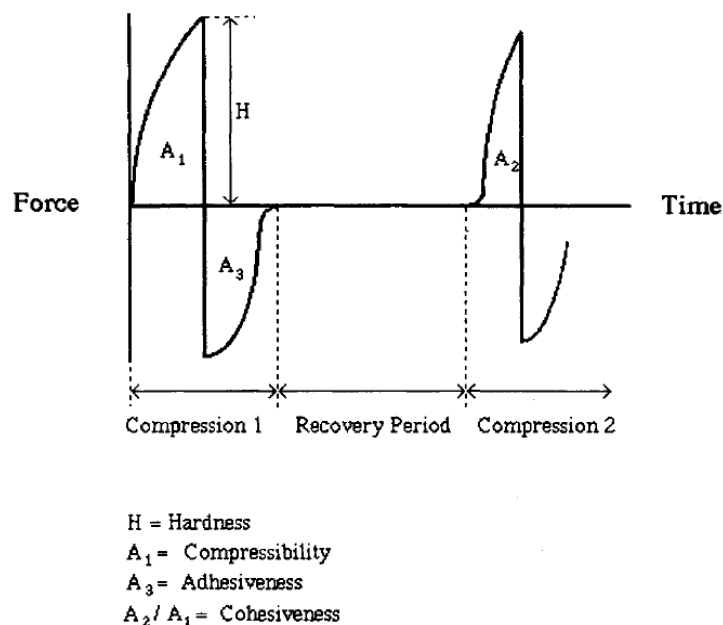


Figura 3.6. Curvas de Fuerzas (Jones y cols., 1997)

La dureza y compresibilidad están relacionadas con la facilidad con la que el producto es extraído del envase y la facilidad de aplicación del mismo. La adhesividad está relacionada con la bioadhesión. La cohesividad nos da idea de las propiedades del sistema cuando se somete a sucesivas deformaciones (Jones y cols., 1997). De tal forma que el análisis textuométrico permite complementar el estudio reológico.

3.1.8.7 . Equipo para el estudio de estabilidad de las formulaciones

La estabilidad física de las formulaciones de hidrogel y nanoemulsión de cetirizina fueron calculadas por medio de análisis óptico basado en la múltiple dispersión de la luz (*Multiple Light Scattering*) (Lui y cols., 2011; Zhang y cols., 2008) usando el TurbiScanLab® (Formulation, L'Union, Francia) (Figura 3.7), conectado a un ordenador provisto del programa *Turbisoft Lab software*.

El principio de TurbiscanLab® se basa en la medición de la retrodispersión (backscattering, BS) y las señales de transmisión (T), debidas a las fluctuaciones del tamaño y el volumen de las partículas, dicho de otro modo, de los fenómenos de migración o de agregación de las partículas, respectivamente. La fuente de luz es, una fuente de luz pulsada muy cercana al espectro infrarrojo (longitud de onda de 880 nm). Dos sensores ópticos sincronizados reciben respectivamente la luz transmitida a través de la muestra (0° de la radiación incidente, sensor de transmisión), y la luz retrodispersada por la muestra (135° de la radiación incidente, detector backscattering). De esta manera se pueden obtener gráficos que representen T y/o BS a lo largo del tiempo, pudiendo observar así posibles fenómenos de inestabilidad física de la formulación (sedimentación, cremado, etc.) antes de que puedan ser observados a simple vista.



Figura 3.7. TurbiscanLAB®

3.1.8.8 Equipos para los estudios de absorción percutánea de cetirizina

3.1.8.8.1 Célula de difusión

Para los estudios de cesión y permeación de fármacos formulados en formas semisólidas o líquidas, una de las metodologías más utilizadas es la célula de difusión vertical de *Franz* (Franz, 1975).

En los ensayos realizados en el presente trabajo se han utilizado células modelos FDC-400, suministradas por la firma Crown Glass Co. Inc. (Somerville, N.Y., USA).

Las células de difusión tipo Franz (Figura 3.8) consta de un compartimento superior (compartimento donador) y de una cámara inferior que constituye el cuerpo de la célula (compartimento receptor), ambos de vidrio neutro de color topacio, entre los cuales se coloca la membrana de difusión, la cual

3. MATERIAL Y MÉTODOS

ha de estar fijada durante todo el ensayo mediante unas mordazas y unas pinzas de acero inoxidable que garantizan la estanqueidad del sistema. La superficie útil para la difusión entre los dos compartimentos es de 2,54 cm². El compartimento inferior o receptor se llena con la solución receptora y en el compartimento superior o donador se coloca la formulación a ensayar. El volumen útil aproximado del compartimento receptor es de 13 ml. La temperatura se mantiene en el interior de la célula a 32°C ± 0,5 mediante una camisa de agua circulante, que entra por la rama inferior de la camisa calefactora del cuerpo receptor de las células y sale por la parte superior.

La perfecta homogenización de la concentración de fármaco en la solución receptora se consigue mediante la agitación de la misma por una barra magnética cubierta de teflón introducida en el compartimento receptor y que es movida por un agitador externo.

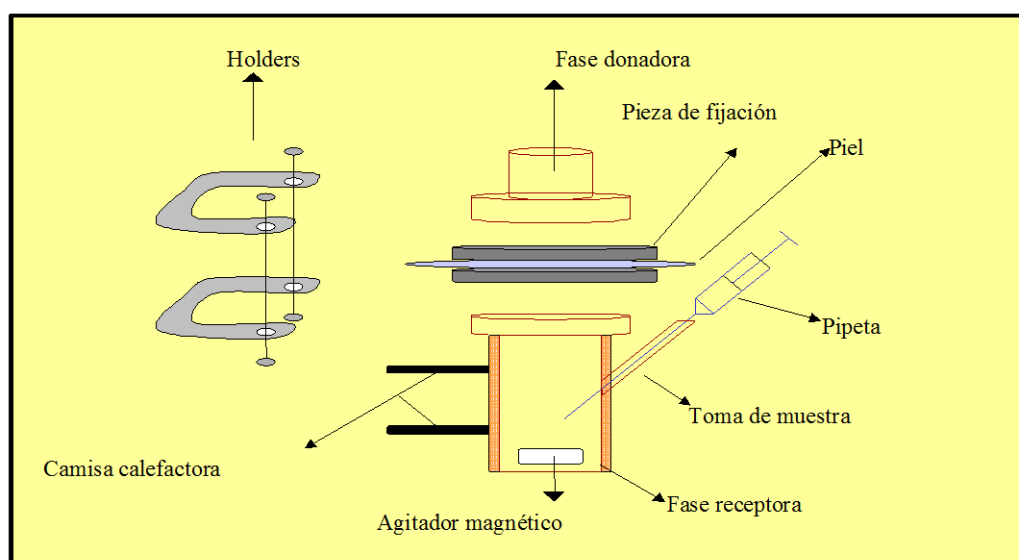


Figura 3.8. Esquema de una célula de difusión de Franz.

3.1.8.8.2 Membrana de difusión

En el presente estudio como membrana de permeación se ha utilizado piel humana de mujeres, de la zona abdominal procedente de excedente de cirugía plástica (Figura 3.9).



Figura 3.9. Trozo de piel humana antes de ser cortada

Para realizar una experiencia *in vitro* de difusión percutánea de un fármaco se pueden utilizar membranas naturales o membranas artificiales, aunque siempre es preferible utilizar las primeras.

La piel procedente de animales de experimentación es más fácil de obtener que la piel humana, puede controlarse la edad, el sexo, y se puede obtener un mayor número de muestras. Sin embargo, existen grandes diferencias entre las estructuras histológicas de la piel de diferentes mamíferos, siendo en general, la piel humana la de menor permeabilidad (Bartek y cols., 1972; Bronaugh y cols., 1982; Bronaugh y Maibach, 1985; Scott y cols., 1987). Por estos motivos, la piel humana es la membrana más adecuada para los estudios de permeación *in vitro*, cuyos resultados deben tener aplicabilidad *in vivo*. Las muestras de piel humana pueden obtenerse por necropsia, o bien a partir de excedentes de ciertas cirugías, en especial de cirugía plástica.

Posteriormente a la intervención quirúrgica y antes de las 8 horas siguientes se coloca el trozo de piel en un recipiente isotérmico sumergido en solución salina fisiológica y se transporta al laboratorio de la Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética. Una vez en el laboratorio, se retira el tejido adiposo y la muestra obtenida se corta en tiras de 4 a 5 cm aproximadamente. Después de limpiar las tiras de piel con solución salina fisiológica, se colocan sobre placas de acero inoxidable protegidas con un film de plástico y se congelan a una temperatura de -20°C .

Para la obtención de la membrana de difusión de espesor constante apta para el estudio de permeación, se ha de descongelar parcialmente las piezas de piel hasta obtener una consistencia adecuada, seguidamente se corta la cara dérmica de la piel en láminas de un grosor de 0,4 mm utilizando un dermatomo eléctrico (Figura 3.10), de acuerdo con la FDA y el ECVAM (Centro Europeo para la Validación de Métodos alternativos) que aconsejan utilizar piel cortada a menos de 0,5 mm de grosor, de forma que las tres partes que constituyen la barrera dérmica (estrato córneo, epidermis y dermis)

3. MATERIAL Y MÉTODOS

queden representadas. Una vez cortadas las tiras de piel se vuelven a congelar en placas de vidrio, protegidas con film de plástico, a una temperatura de -20°C , hasta el inicio de la experiencia. Harrison et al. (1984) demostraron que la permeabilidad de la piel humana en agua tritiada no se veía alterada por el efecto de la congelación y descongelación, incluso después de estar congelada 466 días.

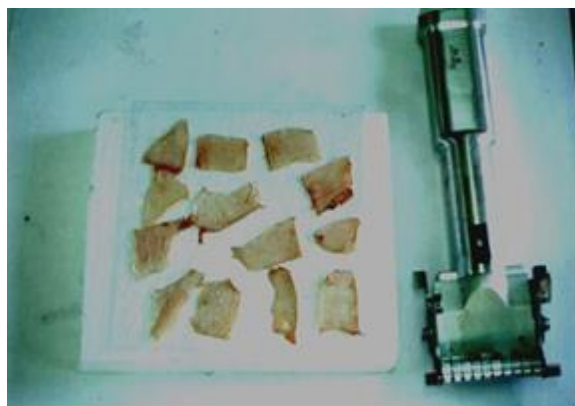


Figura 3.10. Dermatomo AESCULAP y piel cortada a 0,4 mm de grosor.

3.1.8.8.3 Equipos de muestreo

El muestreo para los estudios de absorción percutánea de fármacos o sustancias a partir de soluciones, suspensiones o sistemas de administración transdérmica se pueden realizar de forma manual o bien de forma automatizada:

Equipo de muestreo manual:

Compuesto por (Figura 3.11):

- Células de Franz
- Consola de agitación modelo FDC-400 (Hanson Research)
- Baño termostático Tectron S-473.100

Equipo de muestreo automático:

Compuesto por:

- Células de Franz
- Consola de agitación modelo 57 CD (Hanson Research)
- Baño termostatzado Tamson T1000



Figura 3.11. Equipo de muestreo manual de células de Franz

3.1.8.8.4 Equipo para la determinación de TEWL (Transepidermal water loss)

Este aparato mide la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) y se utiliza para determinar la integridad de la piel, de tal forma que cualquier incremento en los valores de medida son indicativos de cambios en la función barrera de la piel. En el presente trabajo se utilizó el modelo Dermalab® (Cortex Technology, Hadsund, Denmark).

3.1.8.9 Equipo para el estudio de la liberación del fármaco in vitro

Los estudios de liberación de cetirizina en el hidrogel y en la nanoemulsión fueron desarrollados utilizando células de difusión vertical de Franz (descritas en el apartado 3.1.8.8.1.), como membrana de difusión se usaron membranas de celulosa (MWCO 12-14 kDa, Iberlabo, Madrid, España). Esta membrana de diálisis posee un tamaño de poro equivalente a 2,4 nm (Venkateswarlu y Manjunath, 2004), de tal forma que permite el paso del fármaco liberado, pero impide el paso de las gotas de la nanoemulsión.

3.1.8.10 Material para la búsqueda y selección de formulaciones transdérmicas de cetirizina con ayuda de Redes Neuronales

Para la búsqueda y selección de formulaciones transdérmicas de cetirizina con ayuda de Redes neuronales, se utilizó el Software MATLAB y como librería, se utilizó el módulo NEURAL NETWORK TOOLBOX.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Metódica analítica

Para la determinación de las concentraciones de cetirizina en las distintas formulaciones que se han desarrollado en el presente estudio se ha utilizado cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), utilizando los equipos descritos en el apartado 3.1.8.2. El sistema de detección ha sido por espectrofotometría ultravioleta.

Las condiciones de trabajo utilizadas se detallan a continuación:

- Fase móvil: 10mM acetato de amonio/acetronitrilo (50:50 v/v)
- Fase estacionaria: Columna Kromasil 100 C8 250x4,6mm, 5 μ m de tamaño de partícula (Teknokroma, Barcelona, España)
- Flujo eluyente: 0,7ml/min
- Volumen de inyección: 100 μ l de muestra
- Longitud de onda (λ): 232 nm
- Tiempo de retención: 6-7 min.

3.2.2 Validación de las metódicas analíticas

Se define validación como la obtención de pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un método analítico es suficientemente fiable como para obtener resultados realistas de concentraciones de fármaco en las muestras de trabajo dentro de intervalos definidos (AEFI, 2001). Como principales criterios de validación de la metódica analítica se han utilizados los siguientes parámetros: linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación y límite de detección. No existe un modelo único de validación y un mismo parámetro puede ser estimado mediante diferentes métodos de cálculo. Además, los parámetros a considerar en una validación cambian según los

requerimientos legales de diferentes organizaciones (CE, OMS, USP) o según la metodología analítica escogida (Camacho, 1983). Existe un consenso internacional de las propuestas realizadas por la International Conference on Harmonization (ICH) que han sido aceptadas por la Agencia Europea para la evaluación de Productos Medicinales que establece los criterios a seguir ICH Q2B (CPMP/ICH/381/95):

Linealidad

Se define como la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras de trabajo dentro de un rango establecido (AEFI, 2001). Este rango se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

Para comprobar la linealidad de las metodologías analíticas se inyectan en el cromatógrafo las rectas preparadas y se representan las áreas de los picos cromatográficos frente a las concentraciones en una recta de regresión por mínimos cuadrados de ecuación:

$$y = bx + a \quad \text{(Ecuación 3.2)}$$

Donde x es la concentración, y el área de los picos cromatográficos, b el valor de la pendiente y a el término independiente. Para cada recta se ha determinado el coeficiente de correlación (r) que nos indica el grado de relación entre la variable x y la variable y . El valor recomendable para el coeficiente de correlación es $\geq 0,999$ (AEFI, 2001). También se ha determinado el coeficiente de determinación r^2 ya que la información obtenida mediante el cálculo de r es limitada y no justifica por sí sola la linealidad mientras que r^2 aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total de y explicada por el modelo.

Para determinar la linealidad de la metodología analítica realizada en el presente estudio se aplica un test de comparación de medias (ANOVA). Este test compara las medias obtenidas del factor de respuesta (relación entre área cromatográfica y concentración teórica correspondiente), y determina en qué rango de concentraciones es lineal. Se trabaja a un nivel de significación de 0,05.

Precisión

Es el grado de dispersión entre los valores obtenidos al determinar un analito en un ensayo de varios replicados. Es una medida del grado de reproducibilidad de un método analítico cuando se trabaja en condiciones normales y se expresa como la desviación estándar relativa (coeficiente de variación, CV).

La precisión analítica indica, por tanto, la distribución de los resultados alrededor de su media, pero no da idea de la proximidad al valor real. Éste es uno de los criterios más importantes, junto con la exactitud, a tener en cuenta a fin de comprobar la validez de una metodología analítica. La precisión se evalúa en un mismo ensayo (precisión intra-día) y en diferentes ensayos (precisión inter-día), considerándose la precisión del método en condiciones “ideales” y “reales”, respectivamente.

Para comprobar la precisión de la metodología analítica utilizada se mide el coeficiente de variación porcentual, mediante la siguiente ecuación:

$$CV(\%) = \frac{D.E.}{C_{\text{exp}}} \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

Donde C_{exp} es la media de los valores interpolados obtenida para los diferentes replicados de cada nivel de concentración y DE es la desviación estándar de los valores interpolados de cada concentración. La precisión se calcula para cada nivel de concentración utilizado en las rectas de calibración.

El valor máximo del coeficiente de variación admitido para considerar que el método analítico es preciso debe ser inferior al 13%.

Exactitud

Representa el grado de concordancia entre el valor experimental obtenido y el valor real. Indica, por tanto, la capacidad del método analítico para dar resultados lo más cerca posible al valor real. Las diferencias entre los valores obtenidos (C_{exp}) y los valores teóricos o de referencia (C_{teor}) constituyen

una estima absoluta de la cuantificación a cada concentración, y se expresa como el valor relativo porcentual ($Er\%$):

$$Er (\%) = \frac{C_{\text{exp}} - C_{\text{teor}}}{C_{\text{teor}}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

Donde C_{exp} es la media de la concentración interpolada en cada nivel de concentración y C_{teor} es la concentración teórica de cada punto de la recta utilizada.

Se considera que una metódica es exacta, si los errores relativos individuales y medios son inferiores al 7%.

Límite de cuantificación

Se define como la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud.

El límite de cuantificación (LC) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10S}{P} \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

Donde S es la desviación estándar de la ordenada en el origen de la recta de calibración de menor rango de concentraciones, y P la pendiente de dicha recta.

Límite de detección

Se define como la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar, aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales (ICH, Q2A).

El límite de detección se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3,3S}{P} \quad \text{(Ecuación 3.6)}$$

Donde S es la desviación estándar de la ordenada en el origen de la recta de calibración de menor rango de concentraciones, y P la pendiente de dicha recta.

3.2.2.1 Validación de la metodología analítica por CLAE para los estudios de absorción percutánea.

La validación de la metodología analítica para el estudio de permeación intrínseca de cetirizina se ha realizado mediante la preparación de cinco rectas de calibración en diferentes días (validación inter-día).

En un matraz aforado de 10 ml se pesan 10 mg de cetirizina, se disuelve y se lleva a volumen con una solución reguladora de fosfatos pH 7,4. A partir de esta solución se realizan diluciones con el mismo medio hasta conseguir un rango de concentraciones de 100 - 50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,13 - 1,56 µg/ml.

3.2.3 Preparación de las formulaciones farmacéuticas

3.2.3.1 Soluciones saturadas de antihistamínico

Se han preparado soluciones saturadas de cetirizina base y cetirizina diclorhidrato disolviéndolos en unos 5 ml de solución de propilenglicol/agua (50:50) y también en 5 ml de solución etanol/agua (50:50) en agitación hasta precipitación. Estas soluciones se sonicaron en baño de ultrasonidos durante treinta minutos y se dejaron en reposo alrededor de 10 horas a temperatura ambiente. Antes de comenzar la experiencia las soluciones se filtraron a través de un filtro de nylon de 0,45 µm.

El interés por ensayar adicionalmente la cetirizina base es debido a su mayor potencial de penetración en la piel.

La obtención de cetirizina base tuvo lugar por precipitación y cambio de disolventes con posterior eliminación de los mismos. La sustancia así obtenida era de consistencia plástica, viscosa y de difícil manejo, por lo que las experiencias posteriores se realizaron con cetirizina diclorhidrato.

3.2.3.2 Formulaciones farmacéuticas con un 5% (p/p) de cetirizina diclorhidrato y 10% de diferentes promotores (Screening de promotores)

Se prepararon dieciséis formulaciones nanoestructuradas conteniendo cetirizina diclorhidrato y excipientes como: propilenglicol, transcutool, labrasol, plurol oleico, isostearato de isostearilo, agua de calidad HPLC, solución reguladora de fosfatos pH 7,4 (SRF), diferentes promotores (Metil, etil, octil y dodecil pirrolidonas octanol, nonano, decanol, dodecanol y alcohol miristílico; limoneno, escualeno, cineol, nonano, azona y decanol; dimetilsulfóxido/decanol). Estas formulaciones se utilizaron para el estudio de permeación transdérmica de cetirizina diclorhidrato.

La composición porcentual de las formulaciones conteniendo una serie de pirrolidonas y alcoholes como promotores fue la siguiente:

Cetirizina	5%
Propilenglicol	5%
Transcutool	20%
Labrasol	19%
Plurol oleico	19%
Isostearato de isostearilo	5%
Agua calidad HPLC	17%
Promotor	10%

La composición porcentual de las formulaciones conteniendo limoneno, escualeno, cineol, nonano, azona y decanol fue la siguiente:

Cetirizina	5%
Propilenglicol	5%
Transcutool	15%
Labrasol	19%

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Plurol oleico	19%
Isostearato de isostearilo	9%
SRF pH 7,4	18%
Promotor	10%

La composición porcentual de la formulación conteniendo dimetilsulfóxido y decanol fue la siguiente:

Cetirizina	5%
Propilenglicol	5%
Transcutol	20%
Labrasol	19%
Plurol oleico	19%
Isostearato de isostearilo	5%
Agua calidad HPLC	17%
Dimetilsulfóxido	5%
Decanol	5%

Todas las formulaciones se prepararon disolviendo la cetirizina diclorhidrato en el agua de calidad HPLC o en SRF pH 7,4 según sea el caso, se agrega el propilenglicol, luego el transcutol y una vez disuelta se van añadiendo el resto de los componentes. Se deja en agitación constante durante 10 minutos en baño de ultrasonidos hasta obtener una mezcla homogénea.

La formulación utilizada como referencia (sin promotor) para realizar el estudio comparativo de la permeación transdérmica de cetirizina diclorhidrato con los diferentes promotores se preparó siguiendo la metódica descrita anteriormente.

Los datos obtenidos a través de estas formulaciones se utilizaron para el entrenamiento de la red neuronal, con el fin de poder obtener proporciones teóricas de excipientes que permitan obtener niveles sistémicos extrapolados de manera in vitro.

3.2.3.3 Hidrogel de cetirizina diclorhidrato al 5% (p/v)

Se ha preparado un hidrogel de cetirizina al 5% (p/v) de aplicación tópica para realizar la prueba de la actividad antihistamínica en conejos. Se disolvió el fármaco en agua y se añadió hidroxietil celulosa al 3% (p/v) gradualmente bajo agitación constante, finalmente la solución obtenida fue neutralizada con hidróxido de sodio hasta conseguir un pH eudermico y se conservó protegido de la luz por 24 h.

3.2.3.4 Nanoemulsión de cetirizina diclorhidrato al 5% (p/p)

Esta formulación se preparó para con el fin de obtener un efecto local tras su aplicación tópica.

La composición porcentual de la nanoemulsión fue la siguiente:

Cetirizina	5%
Propilenglicol	5%
Transcutol	15%
Labrasol	19%
Plurol oleico	19%
Isostearato de isostearilo	9%
Agua calidad HPLC	18%
d-limoneno	10%

La formulación se preparó mezclando la fase oleosa con el surfactante/co-surfactante, para luego añadir la fase acuosa con cetirizina bajo agitación magnética.

3.2.4 Caracterización fisicoquímica de las formulaciones

3.2.4.1 Determinación de tamaño de gota de las nanoemulsiones

Se determinó el tamaño de gota de las nanoemulsiones preparadas y ensayadas en el presente estudio de acuerdo con los parámetros Z-average o Z-ave (nm) y su polidispersión (PdI), mediante el equipo Z-sizer Nano ZS descrito en el apartado 3.1.8.3 de Material y Métodos (ver figura 3.2), de la siguiente manera: se conecta el Zeta-sizer y el ordenador asociado al equipo, en el software se selecciona el modo “size” para la determinación del tamaño de gota, se coloca la muestra (1 ml aproximadamente, lectura directa, sin dispersarla) en la celda de cuarzo tipo 101-QS, se introduce la celda en el cubículo

3. MATERIAL Y MÉTODOS

indicado para ello, se rotula la muestra en el software con el nombre, número de análisis, así como las condiciones de temperatura (25°C) y el tipo de celda utilizado, y se procede a la lectura de la muestra por triplicado y se registra el resultado de la lectura. El programa informático procesa los datos obtenidos, y entre otra información nos proporciona gráficas de intensidad (Intensity %) versus tamaño de gota (diameter-nm) de las muestras analizadas. Esta información es útil para tener una idea clara de las características de las microemulsiones. La técnica PCS analiza el tamaño de gotícula (Zave en nm) y calcula el PI de la muestra, parámetro utilizado para determinar si el tamaño de las gotículas sigue o no una distribución monomodal; cuyos valores se hallan acotados entre 0 para un tamaño de gota homogéneo y 1 para un sistema completamente disperso (Estelrich y Pons, 1991).

La lectura proporcionada por el equipo es una medida aparente ya que corresponde realmente al diámetro hidrodinámico, es decir, tiene en cuenta también la doble capa eléctrica que se forma alrededor de la superficie de la gota, por lo que la lectura a través del Z-sizer puede variar en función del medio dispersante (Vincent y cols, 2011). Por lo que es conveniente realizar la medida mediante técnicas confirmatorias como es el caso del TEM. Esta consideración cobra mayor relevancia en el caso de nanopartículas que tengan que ser resuspendidas y no tanto en el caso de las nanoemulsiones, al no ser necesaria la redispersión, ya que el medio dispersante es la propia fase externa de la emulsión. Independientemente se procedió a la observación de la nanoemulsión a través de TEM, con el doble fin de corroborar el tamaño de gota, así como examinar su morfología.

3.2.4.2 Observación de la nanoemulsión por TEM

La observación de la nanoemulsión se realizó mediante el microscopio TEM Zeis 902 CEM, descrito en el apartado 3.1.8.4 de Material y Métodos. Para ello se depositó una gota de muestra sobre una gradilla de cobre recubierta por una fina capa de resina durante 4 minutos. Posteriormente las gradillas se lavan dos veces con agua destilada y finalmente se le añade una gota de una solución de acetato de uranilo al 2% durante 5 minutos hasta sequedad y se procede a la observación por el microscopio.

3.2.4.3 Determinación de pH

Se procedió a la lectura de pH directa de las formulaciones preparadas mediante inversión del electrodo en las mimas. La lectura se realizó con el pHmetro digital Crison 501 (Crison, Barcelona, España) a temperatura ambiente.

3.2.4.4 Determinación de la viscosidad

Se realizó a 20°C con el reómetro Haake VT500 tal y como se describió en el apartado 3.1.8.5 de Material y Métodos. Se depositaron 0.4 mL de cada formulación en el reómetro equipado con 2 cilindros coaxiales (MV2). Se realizó un gradiente de fuerza según el siguiente esquema:

- **Equilibrado:** no se aplica fuerza de cizalla durante 300 s.
- **Segmento ascendente:** incremento lineal de la velocidad de cizalla de 0 a 100.0 s⁻¹ durante 180 s.
- **Segmento constante:** velocidad de cizalla constante de 100.0 s⁻¹ durante 60 s.
- **Segmento descendente:** descenso lineal de la velocidad de cizalla desde 100.0 s⁻¹ durante 180 s.

Los resultados obtenidos fueron graficados y se realizaron una serie de ajustados matemáticos a los modelos de Newton, Bingham, Ostwalde-Waele, Herschel-Bulkley y Casson para determinar así el comportamiento reológico de las formulaciones. El software administrador de datos RheoWin® fue utilizado para realizar los cálculos. Se realizaron tres replicados de cada formulación ensayada.

3.2.4.5 Determinación de la texturometría

El análisis de la textura del hidrogel se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.1.8.6 de Material y Métodos. Lamentablemente el equipo (Stable Micro Systems Texturometer TA-XT2i, UK) no disponía de la columna necesaria para la determinación de formulaciones poco viscosas, por lo que únicamente se pudo realizar el estudio de la textura del hidrogel.

Se realizaron dos test de penetración con un cilindro de 13 mm de diámetro que se introdujo en la formulación a una profundidad de 10 mm a una velocidad de 3 mm/s. Después del primer ciclo de

3. MATERIAL Y MÉTODOS

penetración el cilindro volvió a la posición inicial a la misma velocidad. Se realizó un segundo ciclo de penetración tras 5 minutos de reposo con las mismas características que el primero. La medida se realizó por triplicado.

Los datos fueron analizados mediante una hoja de cálculo Excel (Microsoft Office, 2010).

3.2.5 Estudios de estabilidad de las formulaciones

El análisis de la estabilidad de las formulaciones de hidrogel y la nanoemulsión de cetirizina diclorhidrato se realizó mediante el análisis óptico basado en la múltiple dispersión de la luz usando el equipo TurbiScanLab® descrito en el apartado 3.1.8.7 de Material y Métodos, de la siguiente manera:

Se conecta el aparato y se esperan 30 minutos hasta que se estabilice, se selecciona la temperatura (25°C) y el tiempo de trabajo (5 min), así como el intervalo de lecturas BS cada 40µm. Las lecturas se realizan por triplicado. Se sitúa la muestra en el vial cilíndrico y se introduce el conjunto en la zona correspondiente del aparato, para su lectura. Los datos obtenidos se representan en forma de gráficas, procesadas por el software del aparato, que permiten caracterizar los diferentes fenómenos de desestabilización que la muestra puede experimentar en las condiciones de trabajo y conservación de las muestras previamente establecidas.

Para la prueba de estabilidad química, cantidades conocidas de las formulaciones fueron almacenadas en recipientes herméticamente cerrados a temperatura ambiente hasta un máximo de 3 meses y ensayadas para determinar las concentraciones de cetirizina diclorhidrato en cada una de ellas. Las muestras se disolvieron en fase móvil y se agitaron con un mezclador de vórtex.

3.2.6 Estudios de permeación transdérmica de cetirizina en piel humana

La solubilidad de la cetirizina diclorhidrato en solución reguladora de fosfatos a pH 7,4 se determina a fin de conocer la concentración a saturación del antihistamínico en la fase receptora en las células de Franz y poder trabajar en los estudios de permeación con un modelo de dosis infinitas.

Para determinar la solubilidad se prepara una suspensión de cetirizina diclorhidrato, se agita y se filtra. De esta solución resultante se realiza una dilución 1/100 en solución reguladora de fosfatos pH 7,4. La solución final se valora por HPLC, de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 3.1.8.2 de Material y Métodos.

Todos los estudios de absorción transdérmica de fármacos se llevaron a cabo de la misma manera, utilizando las células de difusión de Franz descritas en el apartado 3.1.8.8.1 de Material y Métodos.

Se llenaron los compartimentos receptores con una solución receptora, se introdujo el núcleo de agitación magnético y se colocó la membrana de difusión, piel humana cortada a un espesor de 0.4 mm. Se completó el volumen con la solución receptora, asegurándose de que no quede burbujas de aire entre el compartimento receptor y la membrana de difusión, para así asegurar que durante toda la experiencia la superficie de permeación se mantiene constante. Para garantizar que todo el principio activo que atraviesa la membrana de difusión quede disuelto en la solución receptora se deben cumplir las condiciones *sink* durante todo el tiempo que dure la experiencia, es decir, que no se debe alcanzar en el medio receptor una concentración de fármaco superior al 20% de la concentración de saturación. Una vez atemperadas las células a $32^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ a través de la camisa calefactora y eliminadas las burbujas de aire, se procede a comprobar la integridad de la piel mediante la determinación de la pérdida transdérmica de agua (Tewl) con el aparato Dermalab®. Se considera que valores superiores a $12 \text{ g/m}^2/\text{h}$ son indicativos de una alteración de la piel, y por tanto estas muestras de piel son retiradas y sustituidas por otras, debido a que se podrían obtener valores de permeación incorrectos. En el compartimento donador de las células se dispensó el volumen correspondiente a las formulaciones (Tabla 3.1). Durante las experiencias se cubrieron este compartimento con una lámina de Parafilm® para conseguir el aislamiento del medio ambiente y evitar su evaporación.

La toma de muestra se realizó manualmente a través de la tubuladura lateral del compartimento receptor a intervalos prefijados de análisis, introduciendo una aguja intrarraquídea con la ayuda de una pipeta automática y extrayendo un volumen de muestra de 0,5 ml. Inmediatamente se repuso el volumen extraído con el medio receptor. Las muestras extraídas se colocaron en viales topacio previamente rotulados y se mantuvieron a -20°C hasta su posterior valoración por CLAE.

Tabla 3.1. Screening de formulaciones de cetirizina con diferentes promotores

	Formulación	Concentración de CTZ	Volumen sembrado	Medio receptor	n	Tiempo análisis	Volumen extraído
Intrínseca	Agua:Propilenglicol (50:50) CTZ HCl Agua:Propilenglicol (50:50) CTZ base	Saturación	300 µL	Agua:Propilenglicol (50:50)	3	28h	500 µL
	Agua:etanol (50:50) CTZ HCl Agua:etanol (50:50) CTZ base			3	31h		
Referencia	Hidrogel	5%	500 µL	Tampon fosfato pH 7,4	5	24h	
	Nanoemulsión sin promotor						
Promotores	Pirrolidonas 10%	5%	500 µL	Tampon fosfato pH 7,4	6	24h	
	Alcoholes 10%				7	28h	
	Limoneno 10%				6	36h	
	Escualeno 10%						
	Cineol 10%						
	Azona 10%				6	36h	
Nonano 10%							
Decanol 10%	6	36h					
DMSO 5% + decanol 5%							

3.2.6.1 Tratamiento de los datos experimentales

El objetivo central de los estudios de permeación de un fármaco a partir de la forma farmacéutica que lo contiene, es obtener información sobre la permeación intrínseca del mismo y la influencia de la formulación y de la tecnología utilizada en su perfil de permeación.

Con la finalidad de obtener la máxima información posible, el tratamiento de los datos experimentales (cantidades permeadas acumuladas del principio activo en función del tiempo Q/t) permite:

- Ajustar la ecuación matemática a los datos experimentales (Q/t).
- Estimar los principales parámetros de permeación transdérmica que define las características de penetración de la sustancia a través de la piel.

La morfología de las curvas que relacionan la cantidad de fármaco acumulado respecto al tiempo se representa en la figura 3.12.

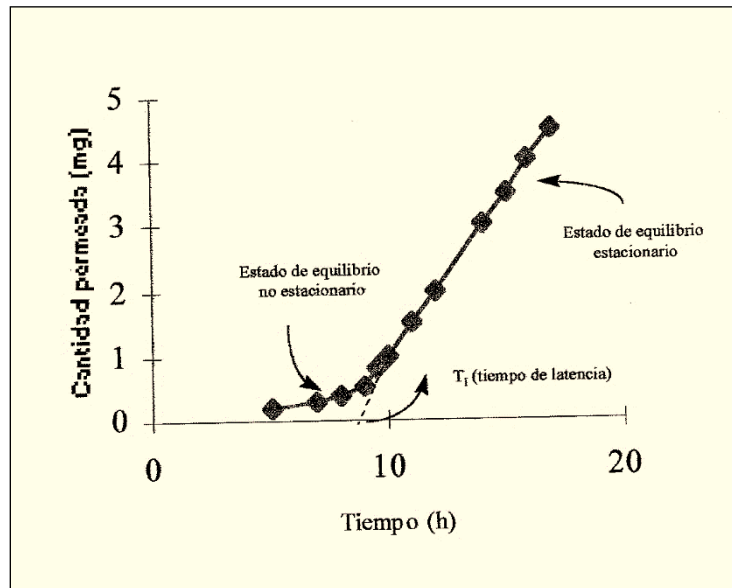


Figura 3.12. Representación de la función de permeación. Cantidades permeadas acumuladas en función del tiempo, Q_t (Viayna, 2000).

A partir de los datos experimentales se estima el flujo y el tiempo de latencia por regresión lineal de los puntos de los últimos tiempos. Como se observa en el gráfico 3.12, los últimos puntos (correspondientes a los últimos tiempos) configuran en una recta, hecho que sucede cuando se alcanza el estado de equilibrio estacionario. La regresión lineal de estos puntos nos permite estimar inicialmente el flujo J (pendiente) y el tiempo de latencia T_l (punto de intersección de la recta con el eje de las abscisas). Cuando la concentración de fármaco de la fase receptora es constante durante toda la experiencia, el valor de C es igual a C_o . Entonces, el flujo se determina por la ecuación 1.4, tal como se expone en el apartado 1.3.6 del capítulo de Introducción. Donde C_o es la concentración de fármaco en el compartimento donador. A partir de esta ecuación hacemos también una estimación de la constante de permeabilidad del fármaco, K_p , considerando el valor del flujo, J , y el área de la membrana de difusión (en este caso $2,54 \text{ cm}^2$).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez estimados los parámetros J , Tl y Kp para cada célula de cada formulación, podemos obtener las estimaciones iniciales de P_1 y P_2 según la ecuación 3.7 y según la ecuación 3.8:

$$Kp = P_1 \times P_2 \quad (\text{Ecuación 3.7})$$

$$Tl = \frac{1}{6P_2} \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

Con P_1 y P_2 estimados para cada célula ya se puede iniciar el tratamiento experimental del conjunto de todos los datos mediante el programa de LAPLACE® (Micromath Scientific Software, 1991), que incluye la aplicación de un algoritmo de inversión numérica de transformadas de Laplace y posteriormente la optimización de los resultados mediante la aplicación de técnicas de monitorización de la suma de cuadrados residuales. De este modo, se han obtenido las estimaciones definitivas de Kp , J y Tl . La finalidad de obtener estas estimaciones es poder hacer una predicción de las concentraciones reales de fármaco en un individuo, en estado de equilibrio estacionario, C_{ee} , para cada producto solo o formulación farmacéutica.

El paso del fármaco a través de la piel viene dado por la velocidad de entrada del fármaco al organismo, K_0 y por el aclaramiento plasmático, Cl_p , del mismo. Al estar saturado el estrato córneo de fármaco, se lleva a término de acuerdo con un proceso de orden cero y el estrato córneo se asume como un compartimento, por este motivo se puede prever la C_{ee} utilizando la ecuación farmacocinética del modelo monocompartmental:

$$C_{ee} = \frac{K_0}{Cl_p} \quad (\text{Ecuación 3.9})$$

En este caso, independientemente del modelo farmacocinético se utilizan los valores de flujo transdérmico obtenidos experimentalmente como indicativos de la velocidad de entrada del fármaco al organismo.

La comparación entre los valores del tiempo de latencia (Tl), el flujo (J), la constante de permeabilidad (kp), los parámetros P_1 y P_2 , así como la concentración en estado de equilibrio

estacionario (C_{ee}) se ha realizado de acuerdo con Williams y col. (1992), mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis, con un nivel de significación de $\alpha=0,05$.

3.2.7 Estudios de liberación del hidrogel y la nanoemulsión de cetirizina diclorhidrato in vitro.

Para los estudios de liberación del fármaco se realizaron 6 replicados utilizando los equipos descritos en el apartado 3.1.8.9 de Material y Métodos. Como membrana de difusión se usaron membranas de diálisis de celulosa. Se llena el compartimento receptor de cada célula con solución reguladora de fosfatos pH 7,4. La metodología a seguir es la misma que en el apartado 3.1.8.8 de Material y Métodos, conservando las condiciones *sink* en todo el experimento. La cantidad de siembra en el compartimento donador de cada célula fue de 300 μL de la formulación (Nanoemulsión, hidrogel y solución de CTZ libre al 5%), el volumen de extracción y reposición fue de 500 μL y los tiempos de muestreo fueron a intervalos prefijados durante 6 horas. Las muestras extraídas se colocaron en viales topacio de cromatografía líquida de alta eficacia, previamente rotulados y se mantuvieron a -20°C hasta su posterior valoración por CLAE.

Una vez obtenidos los porcentajes de fármaco liberados, se procedió a su ajustado matemático utilizando 5 modelos cinéticos que típicamente describen el mecanismo de liberación de los fármacos a partir de sus formulaciones:

$$\%R_t/\%R_{\infty} = k \times t \quad \text{Orden cero} \quad (\text{Ecuación 3.10})$$

$$\%R_t/\%R_{\infty} = 1 - e^{-k \times t} \quad \text{Primer orden} \quad (\text{Ecuación 3.11})$$

$$\%R_t/\%R_{\infty} = k \times t^{1/2} \quad \text{Ecuación de Higuchi} \quad (\text{Ecuación 3.12})$$

$$\%R_t/\%R_{\infty} = 1 - e^{-(t/t_d)^{\alpha}} \quad \text{Ecuación de Weibul} \quad (\text{Ecuación 3.13})$$

$$\%R_t/\%R_{\infty} = k \times t^n \quad \text{Ecuación de Korsmeyer-Peppas} \quad (\text{Ecuación 3.14})$$

Donde $\%R_t$ corresponde al porcentaje de fármaco liberado al t , $\%R_{\infty}$ es la cantidad total de fármaco liberado, $\%R_t/\%R_{\infty}$ es la fracción de fármaco liberado a cada tiempo experimental, k es la constante de velocidad de liberación, n es el exponente de difusión, que puede ser usado para caracterizar los

diferentes mecanismos de liberación, siendo $n \leq 0,43$ (difusión Fickiana), $0,43 < n < 0,85$ (transporte anómalo), y $n \geq 0,85$ (transporte caso II, por ejemplo orden cero), t_d es el tiempo al cual se libera el 63,2% del fármaco y e es el parámetro de forma de la curva sigmoidea (Fernández y cols., 2012).

El ajustado a estos modelos se realizó mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados por medio del programa WinNonlin® (WinNonlin® Professional edition version 3.3; Pharsight Corporation, Sunnyvale, California). El Criterio de Información de Akaike (AIC) se determinó para cada modelo con el fin de determinar la bondad del ajustado. Se considera que el menor valor de AIC obtenido representa un mejor ajuste del modelo a los datos experimentales. Para seleccionar el modelo final también se tuvieron en cuenta los gráficos de distribución de los residuales (mejor cuando se distribuyen aleatoriamente alrededor de cero, sin seguir ninguna tendencia) y la precisión en la estimación del parámetro expresado como Coeficiente de Variación (CV%)

3.2.8 Estudio de retención de cetirizina en las formulaciones nanoestructuradas: hidrogel y nanoemulsión.

Al finalizar las pruebas de permeación transdérmica de cetirizina, se eliminaron los restos de las formulaciones en los trozos de piel, limpiándolos con una gasa empapada en 0,05 % de una solución de lauril sulfato de sodio y lavados con agua destilada. Luego, se pesaron los trozos de piel y se cortaron en trozos más pequeños, y se sonicaron por 15 min con acetonitrilo:agua (50:50, v/v) para extraer su contenido en cetirizina diclorhidrato. Las soluciones resultantes se centrifugaron y su contenido en fármaco ($\mu\text{g}/\text{mg}$) se determinaron por HPLC; para lo cual se utilizó el equipo Waters 515 con UV-VIS 2487 detector (Waters, Milford, USA) a una longitud de onda de 232 nm. Se utilizó una columna de fase reversible, C8 Kromasil ($5 \mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$, Teknokroma, Barcelona, España), una velocidad de flujo de 0,7 ml/min. La fase móvil consistió en una mezcla de 10 mM de acetato de amonio: acetonitrilo (50:50 v/v). El volumen de inyección fue 100 μl y el tiempo total de retención fue de 12 min. Se calcularon todos los valores de los 6 experimentos en paralelo.

Las curvas de calibración se prepararon en solución reguladora de fosfato pH 7,4 con un rango de concentraciones de 100 - 1,56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con el fin de medir la concentración de cetirizina en las muestras y validar la metodología analítica.

3.2.9 Prueba de la actividad antihistamínica de hidrogeles y nanoemulsiones de cetirizina en conejos albinos.

Para la prueba de la actividad antihistamínica de cetirizina diclorhidrato se utilizaron 6 conejos albinos machos de Nueva Zelanda (2,7-3,5 kg), se colocaron en jaulas de plástico con un ciclo de 12h día/noche. Se les proporcionó comida y agua *ad libitum*. Se aclimataron a la temperatura y humedad en instalaciones controladas durante 8 días antes del experimento. Todos los animales se acostumbraron a la manipulación (30 min de manipulación por día durante 3 días) y a los equipos de ensayos antes de los experimentos.

Dos días antes de realizar la experiencia, se cortó el pelo de la parte posterior de cada conejo usando un cortador de pelo. El día anterior al estudio se aplicó una crema depilatoria y luego se lavó a fondo para asegurar la eliminación completa del pelo, después de secar los conejos con una toalla se llevaron a un ambiente cálido hasta estar completamente secos. Antes de realizar la experiencia, los conejos fueron inspeccionados y no se observaron signos visuales de tener la piel irritada. Las respectivas áreas a ensayar de los animales se dividieron en 8 secciones con un rotulador, 4 secciones a cada lado. Las secciones de la derecha se escogieron para realizar las pruebas y las de la izquierda para realizar el control del estudio.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Animales de Experimentación de la Universidad de Barcelona, de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975, revisado y desarrollado en 1983 bajo supervisión veterinaria.

Se inyectó 0,05ml por vía intradérmica una solución acuosa estéril de fosfato de histamina (5mg/ml) en las 8 secciones rotuladas de los conejos albinos. El área inicial de la pápula fue observada al cabo de 10 min de la inyección de la histamina. Se aplicaron luego 500 mg de cada formulación (hidrogel y nanoemulsión de cetirizina) en las 4 secciones de la derecha y como fármacos de referencia se aplicaron 500mg de Fenistil® y 500 mg de Polaramine® en las 4 secciones de la izquierda. El diámetro de la pápula fue medida por medio de un compás después de 10, 20 y 30 min de la aplicación de las formulaciones. Se determinó el porcentaje de extinción de la pápula como el área bajo la curva (área de pápula versus el tiempo de 0 a 30 min) (AUC0-30).

3.2.10 Búsqueda y selección de formulaciones transdérmicas de cetirizina con la ayuda de Redes Neuronales.

Los datos de entrenamiento para los modelos de redes neuronales se obtuvieron a partir de 18 formulaciones nanoestructuradas: una con sólo agua y propilenglicol al 50%, y 17 formulaciones conteniendo diferentes proporciones de agua, propilenglicol, transcutool, isostearato de isostearilo y catorce posibles promotores (Metilpirrolidona, Etilpirrolidona, Octilpirrolidona, Dodecilpirrolidona, Octanol, Nonano, Decanol, Dodecanol, alcohol Miristílico, Limoneno, Cineol, Escualeno, Azona y DMSO). En 15 de estas formulaciones, se usó un solo promotor; en otra, no se usó ningún promotor; y en la última, se combinaron dos promotores (Decanol y DMSO).

Cada formulación se repitió un cierto número de veces entre 3 y 7, dando lugar a un número total de 94 experimentos. En cada uno de ellos, se midieron cuatro características: J ($\mu\text{g/h}$), Tl (h), Kp (cm/h) y Cee ($\mu\text{g/mL}$), que permiten valorar la calidad de la formulación.

Luego, se creó un conjunto de 94 ejemplos de entrenamiento $\{(x_i, t_i)\} \subset \mathbb{R}^{18} \times \mathbb{R}^4$, donde cada x_i es un vector de entradas que representa la composición de la formulación en términos de 18 constituyentes (agua, propilenglicol, transcutool, isostearato y los 14 promotores antes mencionados) (Tabla 3.2) y t_i es su vector de salidas correspondiente, formado por los valores de las cuatro características medidas (Tabla 3.3). Nótese que, en realidad, hay sólo 18 vectores diferentes de entradas en el conjunto de entrenamiento (uno para cada formulación), pero diferentes vectores de salida para el mismo vector de entradas (tantos como el número de experimentos repetidos para la formulación asociada). La proporción de cetirizina no se incluyó como variable de entrada, debido a que su valor queda completamente determinado por la suma de las proporciones de los otros componentes. Tampoco se introdujo como variables la concentración de tensioactivo y co-tensioactivo, ya que este era un parámetro constante en todas las formulaciones ensayadas.

Tabla 3.2. Datos de 94 experimentos de entrenamiento con sus 18 vectores de entradas

Variables independientes																		
Promotores																		
Fórmula	Propilenglicol	Transcutol	Isostear. Isostearil	Agua	Metilpirrolidona	Etilpirrolidona	Octilpirrolidona	Dodecilpirrolidona	Octanol	Nonano	Decanol	Dodeca-nol	Alcohol Miristílico	Limoneno	Cineol	Escualeno	Azona	DMSO
0	50	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	50	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	50	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	5	20	5	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	5	20	5	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	5	20	5	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	20	5	17	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	20	5	17	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	20	5	17	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	20	5	17	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	20	5	17	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	20	5	17	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	20	5	17	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	20	5	17	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5	20	5	17	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5	20	5	17	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5	20	5	17	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5	20	5	17	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5	20	5	17	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5	20	5	17	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5	20	5	17	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5	20	5	17	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5	20	5	17	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5	20	5	17	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5	20	5	17	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5	20	5	17	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5	20	5	17	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5	20	5	17	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	5	20	5	17	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	5	20	5	17	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	5	20	5	17	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	5	20	5	17	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	5	20	5	17	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	5	20	5	17	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	5	20	5	17	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	5	20	5	17	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	5	20	5	17	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	5	20	5	17	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	5	20	5	17	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	5	20	5	17	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	5	20	5	17	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	5	20	5	17	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	5	20	5	17	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
7	5	20	5	17	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
7	5	20	5	17	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
7	5	20	5	17	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
8	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
8	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
8	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
8	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
9	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
9	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
9	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Variables independientes																		
Fórmula	Promotores																	
	Propilenglicol	Transcutol	Isostear. Isostearil	Agua	Metilpirrolidona	Etilpirrolidona	Octilpirrolidona	Dodecylpirrolidona	Octanol	Nonano	Decanol	Dodeca-nol	Alcohol Miristílico	Limoneno	Cineol	Escualeno	Azona	DMSO
9	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
9	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
9	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
10	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
10	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
10	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
10	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
10	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
10	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
11	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
11	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
11	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
11	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
11	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
12	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
12	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
12	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
12	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
12	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
13	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
13	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
13	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
13	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
13	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
13	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
13	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
13	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
14	5	15	9	18	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
14	5	15	9	18	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
14	5	15	9	18	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
14	5	15	9	18	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
14	5	15	9	18	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
15	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
15	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
15	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
15	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
15	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
15	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
15	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
16	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
16	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
16	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
16	5	15	9	18	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
17	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5
17	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5
17	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5
17	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5
17	5	20	5	17	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5

Tabla 3.3. Datos de las cuatro características medidas de los 94 experimentos de entrenamiento.

Datos	Fórmula	Variables dependientes			
		Parámetros permeación			
		J ($\mu\text{g/h}$)	TI (h)	Kp (cm/h)	Cee ($\mu\text{g/ml}$)
1	0	0,2025	2,3110	0,0000	0,0003
2	0	0,9200	1,7430	0,0001	0,0012
3	0	0,6252	33,6800	0,0000	0,0008
4	1	2,1090	0,9018	0,0000	0,0026
5	1	3,5790	5,4240	0,0000	0,0045
6	1	0,1690	6,6040	0,0000	0,0002
7	2	1,6240	8,7030	0,0000	0,0020
8	2	0,2028	0,7687	0,0000	0,0003
9	2	1,6370	0,8338	0,0000	0,0020
10	2	2,7730	0,0370	0,0000	0,0035
11	2	0,8723	6,2190	0,0000	0,0011
12	2	0,8298	8,7880	0,0000	0,0010
13	3	5,5150	11,0800	0,0000	0,0069
14	3	0,4804	5,0380	0,0000	0,0006
15	3	2,9410	11,0690	0,0000	0,0037
16	3	2,8400	0,6362	0,0000	0,0035
17	3	1,7160	3,8040	0,0000	0,0021
18	3	0,9524	11,3600	0,0000	0,0012
19	4	4,6540	18,5100	0,0000	0,0058
20	4	11,7200	16,6000	0,0001	0,0147
21	4	2,0350	16,1700	0,0000	0,0025
22	4	4,1040	0,9742	0,0000	0,0051
23	4	0,9149	12,9000	0,0000	0,0011
24	4	5,8250	28,3200	0,0001	0,0073
25	5	0,7570	10,2800	0,0000	0,0009
26	5	0,6975	8,2700	0,0000	0,0009
27	5	3,2780	12,1100	0,0000	0,0041
28	5	1,4870	17,3700	0,0000	0,0019
29	5	8,1380	23,2300	0,0001	0,0102
30	6	3,3800	15,8500	0,0000	0,0042
31	6	2,0600	12,8400	0,0000	0,0026
32	6	5,0510	17,3700	0,0000	0,0063
33	6	1,4000	6,4380	0,0000	0,0018
34	6	17,9000	8,8920	0,0001	0,0224
35	6	21,5000	6,0960	0,0002	0,0269
36	6	16,0300	28,6100	0,0014	0,0200
37	7	39,0000	34,5600	0,0004	0,0488
38	7	0,7440	4,0470	0,0000	0,0009
39	7	4,3900	1,9620	0,0000	0,0055
40	7	10,4000	16,2900	0,0001	0,0130
41	8	24,0200	21,8200	0,0002	0,0300
42	8	18,0100	20,8300	0,0001	0,0225
43	8	26,6000	13,0400	0,0002	0,0333
44	8	37,4300	5,0130	0,0003	0,0468
45	9	3,7070	7,2780	0,0000	0,0046
46	9	0,7344	0,1270	0,0000	0,0009
47	9	4,8600	12,5900	0,0000	0,0061

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Datos	Fórmula	Variables dependientes			
		Parámetros permeación			
		J (µg/h)	TI (h)	Kp (cm/h)	Cee (µg/ml)
48	9	6,0120	10,2000	0,0000	0,0075
49	9	10,9300	12,6200	0,0001	0,0137
50	9	6,9100	15,8700	0,0001	0,0086
51	10	2,6650	0,0212	0,0000	0,0033
52	10	0,9336	0,0773	0,0000	0,0012
53	10	2,2590	0,0504	0,0000	0,0028
54	10	1,0200	3,1900	0,0000	0,0013
55	10	2,9780	5,0540	0,0000	0,0037
56	10	2,5140	0,0186	0,0000	0,0031
57	11	3,7000	12,9200	0,0000	0,0046
58	11	1,8000	14,5300	0,0000	0,0023
59	11	4,3000	13,5100	0,0000	0,0054
60	11	24,9000	14,8300	0,0002	0,0311
61	11	9,9000	17,3500	0,0001	0,0124
62	11	5,8000	15,4700	0,0000	0,0072
63	12	0,2694	8,2000	0,0000	0,0003
64	12	6,1970	15,7700	0,0000	0,0077
65	12	2,8990	29,7100	0,0000	0,0036
66	12	6,5970	10,6100	0,0001	0,0082
67	12	16,9800	14,8000	0,0001	0,0212
68	13	1,8000	13,7700	0,0000	0,0023
69	13	2,5000	25,3400	0,0000	0,0031
70	13	29,0500	36,8300	0,0002	0,0363
71	13	33,0400	24,5900	0,0003	0,0413
72	13	9,9100	48,1300	0,0001	0,0124
73	13	57,0700	40,1800	0,0005	0,0713
74	14	1,1800	10,7900	0,0000	0,0015
75	14	0,4700	0,1090	0,0000	0,0006
76	14	4,1000	9,9700	0,0000	0,0051
77	14	1,2000	16,7400	0,0000	0,0015
78	14	4,1100	15,0800	0,0000	0,0051
79	15	4,4000	15,0900	0,0000	0,0055
80	15	1,1000	3,3010	0,0000	0,0014
81	15	4,9000	7,9770	0,0000	0,0061
82	15	23,0400	45,4000	0,0002	0,0288
83	15	2,4000	23,4000	0,0000	0,0030
84	15	3,7000	7,0620	0,0000	0,0046
85	16	9,0500	3,0330	0,0001	0,0113
86	16	8,3400	2,8240	0,0001	0,0104
87	16	15,0000	2,5360	0,0001	0,0188
88	16	12,5700	34,8200	0,0001	0,0157
89	16	16,8100	10,9300	0,0001	0,0210
90	17	17,0900	7,4240	0,0001	0,0214
91	17	7,6240	5,8510	0,0001	0,0095
92	17	8,3240	7,2710	0,0001	0,0104
93	17	15,0600	8,8850	0,0001	0,0188
94	17	10,5300	8,3370	0,0001	0,0132

Los datos de entrenamiento (Tabla 3.3) para los modelos de redes neuronales se obtuvieron a partir de 18 formulaciones según lo descrito en el apartado 3.1.8.10 de Material y Métodos.

Veintiuna redes neuronales diferentes se entrenaron para minimizar la suma de error cuadrático (Ecuación 1.12) a partir del conjunto de datos de entrenamiento, usando el algoritmo de Levenberg-Marquardt. Éstas se corresponden con veintiún modelos diferentes de regresión. El más simple es una capa de cuatro neuronas lineales (Ecuación 1.8) que realizan una regresión lineal de cada variable de salida en el espacio de entradas 18-dimensional. Los otros veinte modelos son modelos de regresión no-lineal de complejidad creciente, dados por SHLFNs (Ecuación 1.9) de cuatro neuronas lineales de salida y un número N_h de neuronas no-lineales ocultas que se varió entre 1 y 20, con función de activación sigmoideal (Ecuación 1.11) en la capa oculta.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 VALIDACIÓN DE LA METÓDICA ANALÍTICA

4.1.1 Validación de la metodología analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) para los estudios de absorción percutánea.

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en la validación intradía de la metodología analítica empleada para la cuantificación de cetirizina diclorhidrato en los distintos estudios realizados en la presente tesis doctoral, de acuerdo con lo expuesto en el apartado 3.2.2 de Material y Métodos.

4.1.1.1 Linealidad

En la Tabla 4.1. se detallan los valores de las relaciones entre el área cromatográfica y la concentración de cetirizina diclorhidrato correspondientes a cada nivel de concentración de las cinco rectas de calibración, acompañadas de los valores medios (X) y la desviación estándar (DE), para la validación interdía de la metodología analítica.

Tabla 4.1. Relación área/concentración de cetirizina diclorhidrato correspondiente a las cinco rectas de calibración obtenidas en la validación interdía de la metodología analítica.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Relación área/Concentración					
	1	2	3	4	5	X \pm DE
100	166892,50	173909,90	198428,90	198956,20	207866,70	189210,84 \pm 17749,74
50	188255,72	167681,44	198387,82	206665,80	215140,20	195226,20 \pm 18335,27
25	151977,88	161874,96	151980,28	191767,56	211462,32	173812,60 \pm 26626,09
12,5	160112,24	161225,92	204088,16	173752,08	193050,72	178445,82 \pm 19528,88
6,25	135099,36	157768,32	160301,28	157205,60	175704,00	157215,71 \pm 14498,07
3,125	132301,44	127733,76	130866,88	134094,72	153166,40	135632,64 \pm 10074,72
1,5625	102698,88	105112,96	101490,56	110908,16	154592,00	114960,51 \pm 22449,04

De acuerdo con estos resultados se puede decir que la metodología analítica es lineal en los distintos márgenes de concentraciones estudiados, dado que el estudio estadístico realizado a partir del test

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANOVA entre valores medios de las relaciones áreas cromatográficas/concentraciones, ha puesto de manifiesto que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

4.1.1.2 Precisión y exactitud

En las Tablas 4.2 y 4.3 se detallan las concentraciones experimentales correspondientes a cada nivel de concentración de las cinco rectas de calibración utilizadas para la validación inter día de la metodología analítica de cetirizina diclorhidrato, junto con los valores medios (X), desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y error relativo porcentual (Er%), realizado en los dos rangos de concentraciones (100 – 6,25 $\mu\text{g/ml}$ y 6,25 – 1,5625 $\mu\text{g/ml}$).

Tabla 4.2. Concentraciones experimentales de cetirizina diclorhidrato en el margen de concentraciones de 100 – 6,25 $\mu\text{g/ml}$.

Replicados	Concentraciones experimentales ($\mu\text{g/ml}$)				
	100	50	25	12,5	6,25
R1	102,068	45,410	25,062	13,433	7,778
R2	100,426	48,695	26,113	11,906	6,610
R3	99,179	51,994	24,706	11,737	6,134
R4	99,139	52,306	24,103	11,958	6,244
R5	100,244	49,368	25,255	12,497	6,386
X	100,211	49,555	25,048	12,306	6,630
DE	1,194	2,805	0,739	0,691	0,666
Er%	-0,211	0,891	-0,191	1,551	-6,085
CV%	1,191	5,660	2,951	5,617	10,041

Tabla 4.3. Concentraciones experimentales de cetirizina diclorhidrato en el margen de concentraciones de 6,25 – 1,5625 $\mu\text{g/ml}$.

Replicados	Concentraciones experimentales ($\mu\text{g/ml}$)		
	6,25	3,125	1,5625
R1	6,283	3,027	1,628
R2	6,276	3,046	1,616
R3	6,301	2,973	1,664
R4	6,287	3,014	1,637
R5	6,283	3,027	1,628
X	6,286	3,017	1,635
DE	0,009	0,027	0,018
Er%	-0,573	3,442	-4,621
CV%	0,145	0,903	1,112

A juzgar por los valores obtenidos de los coeficientes de variación (CV%) y error relativo (E%) (comprendidos entre 0,14% y 10,04%, y entre -6,085% y 3,442% respectivamente), la metodología analítica para la cetirizina ha resultado ser precisa y exacta en el ámbito de concentraciones de 100 - 6,25 $\mu\text{g/ml}$ y 6,25 – 1,5625 $\mu\text{g/ml}$.

En las figuras 4.1 y 4.2 se representan gráficamente cromatogramas de una muestra de cetirizina diclorhidrato y de una muestra patrón, respectivamente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

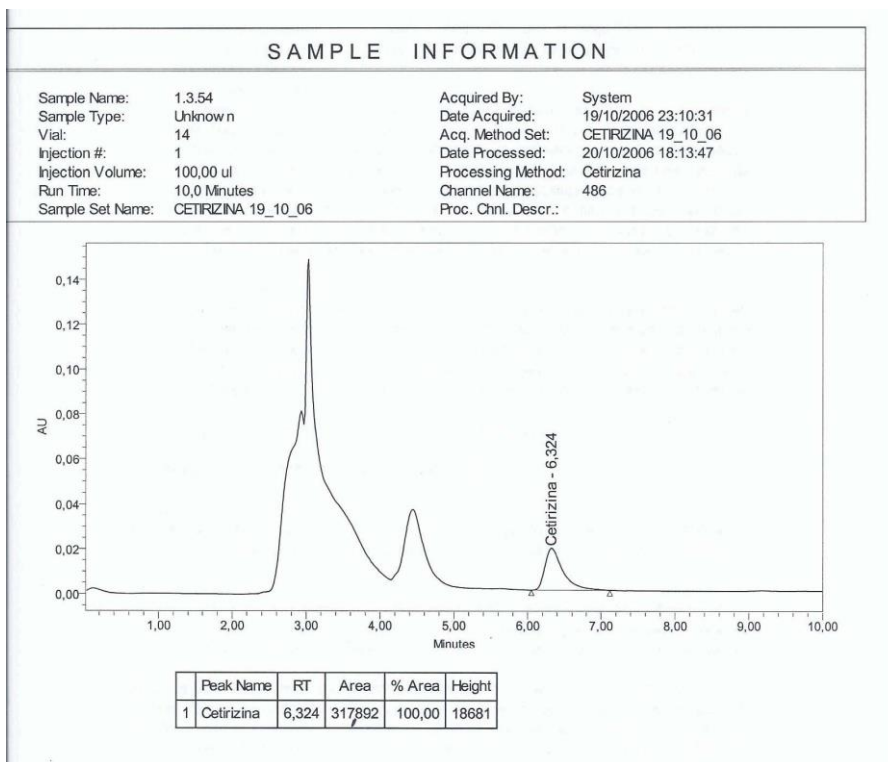


Figura 4.1. Representación gráfica de un cromatograma de una muestra de cetirizina diclorhidrato.

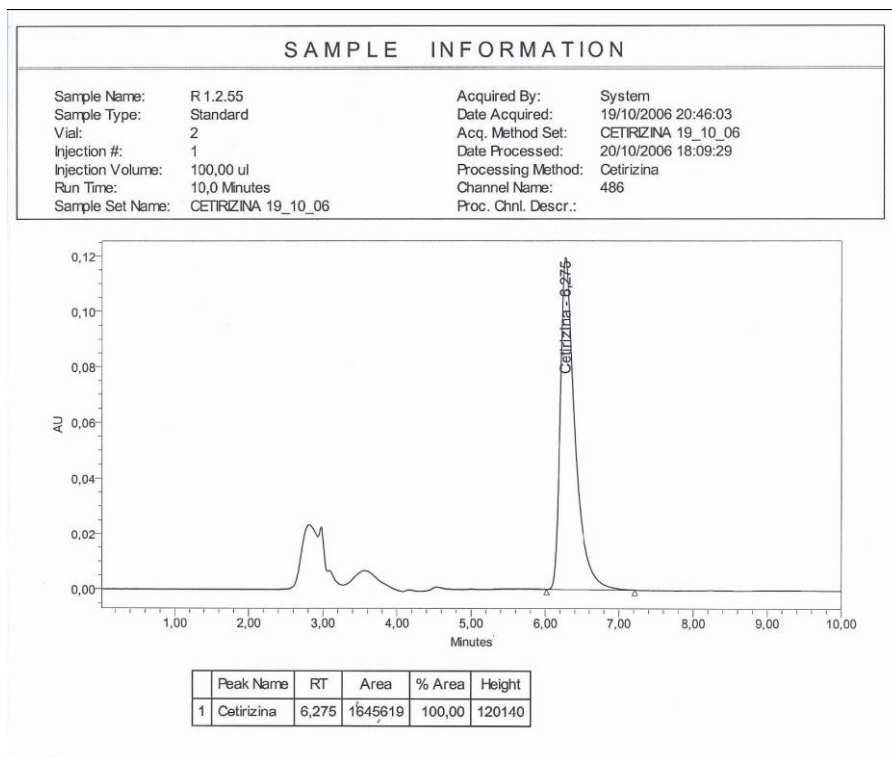


Figura 4.2. Representación gráfica de un cromatograma de una muestra patrón de cetirizina.

En las gráficas 4.1 y 4.2 podemos observar que el pico de cetirizina diclorhidrato sale entre 6 y 7 minutos, este tiempo es adecuado considerando que en las muestras de permeación ningún residuo procedente de la piel se solapa con el fármaco considerando dicho método específico y selectivo.

4.1.1.3 Límite de cuantificación y límite de detección

En la Tabla 4.4 se detallan los valores correspondientes al límite de cuantificación y al límite de detección para las cinco rectas de calibración en el rango de concentraciones de 6,25 - 1,5625 $\mu\text{g/ml}$ de cetirizina diclorhidrato para la metodología analítica utilizada en los distintos estudios realizados.

Tabla 4.4. Límites de cuantificación y límites de detección correspondientes a cada replicado con sus respectivas medias (X) y desviación estándar (DE) obtenidos en la validación de la metodología analítica.

Replicados	Límites de cuantificación	Límites de detección
R1	1,499	0,495
R2	1,203	0,397
R3	2,318	0,765
R4	1,698	0,560
R5	1,497	0,494
$X \pm DE$	$1,604 \pm 0,416$	$0,529 \pm 0,137$

Los límites de detección ($0,529 \pm 0,137$) y de cuantificación ($1,604 \pm 0,416$) de la metodología analítica para la cetirizina diclorhidrato quedan dentro de los rangos de concentraciones establecidos (100 - 1,5625 $\mu\text{g/ml}$).

4.2 CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LAS NANOEMULSIONES

Las nanoemulsiones tienen propiedades típicas de todas las emulsiones pero con algunos detalles específicos. Su tamaño de gota sub-micrométrico las hace transparentes o por lo menos translúcidas dependiendo de la distribución de tamaño de gota y del contenido de fase interna. Ya que la interacción con la luz es muy sensible al tamaño de gota, es muy probable que se produzcan cambios en su aspecto según evolucione el tamaño de gota, es decir, se produzca alguna desestabilización.

Las nanoemulsiones no son sistemas particularmente viscosos cuando poseen poca proporción de fase interna. Sin embargo, es bien conocido que la viscosidad de las emulsiones aumenta a medida que el tamaño de gota disminuye, así, y contrariamente a las macroemulsiones, las nanoemulsiones podrían ser viscosas a un porcentaje de fase interna entre 40-50% especialmente si son poco polidispersas, en cuyo caso frecuentemente son denominadas emulsiones-gel (Pons y col., 1994) (Kunieda y col., 1996).

4.2.1 Determinación del tamaño de gota

De acuerdo con lo descrito en el apartado 3.2.4 de Material y Métodos, para caracterizar las diferentes formulaciones de cetirizina diclorhidrato se ha determinado el tamaño de gota de las mismas.

En la Tabla 4.5 se muestran los valores del tamaño de gota de las distintas formulaciones ensayadas de cetirizina diclorhidrato con diferentes promotores (sin promotor, octanol, nonano, decanol, dodecanol, alcohol miristilo, metilpirrolidona, etilpirrolidona, octilpirrolidona, dodecilpirrolidona, azona, cineol, limoneno, escualeno, dimetilsulfóxido + decanol, y limoneno ensayada en conejos).

Tabla 4.5. Resumen de los valores del tamaño medio de gota de las formulaciones de cetirizina diclorhidrato con diferentes promotores y su polidispersión (PdI). SRpH: Solución Reguladora pH 7,4.

Promotor	Tamaño medio de gota (d.nm)	Polidispersión (PdI)
Sin promotor	96,8	0,433
Octanol (agua)	79,2	0,541
Nonano (agua)	208,1	0,480
Decanol (agua)	111,3	0,519
Dodecanol (agua)	92,1	0,333
Alcohol miristilo (agua)	135,2	0,408
Metilpirrolidona (agua)	332,0	0,145
Etilpirrolidona (agua)	799,1	0,146
Octilpirrolidona (agua)	136,0	0,378
Dodecilpirrolidona (agua)	85,9	0,431
Azona (SRpH)	443,2	0,859
Cineol (SRpH)	436,1	0,639
Limoneno (SRpH)	431,0	1,000
Escualeno (SRpH)	8110,3	0,648
DMSO + Decanol (agua)	208,4	0,156
Limoneno (agua)	99,9	0,15

Como se puede observar en la Tabla 4.5 hay una fuerte variación en los tamaños de gotas entre las distintas formulaciones de cetirizina, esto puede ser debido a las características físicoquímicas de los diferentes promotores utilizados en el presente estudio.

4.2.2 Observación de la nanoemulsión por Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

La nanoemulsión que fue seleccionada para su ensayo en conejos (descrita en el apartado 3.2.3.4 del capítulo de Métodos), fue observada a través de TEM para corroborar las características observadas durante el análisis por DLS.

El z-ave de esta nanoemulsión ensayada en conejos fue de 99,95 nm con un índice de polidispersión de 0,15 (Tabla 4.5), por lo que fue seleccionada para ser ensayada en conejos (menor tamaño medio

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de gota y baja polidispersión). Estos resultados se confirmaron por observación TEM (Figura 4.3), se pudo observar que las gotitas de la nanoemulsión de cetirizina eran pequeñas, esféricas y uniformes y de un tamaño aproximadamente similar al obtenido por DLS. Estos resultados se mantuvieron prácticamente constante durante tres meses (Figura 4.3 b).

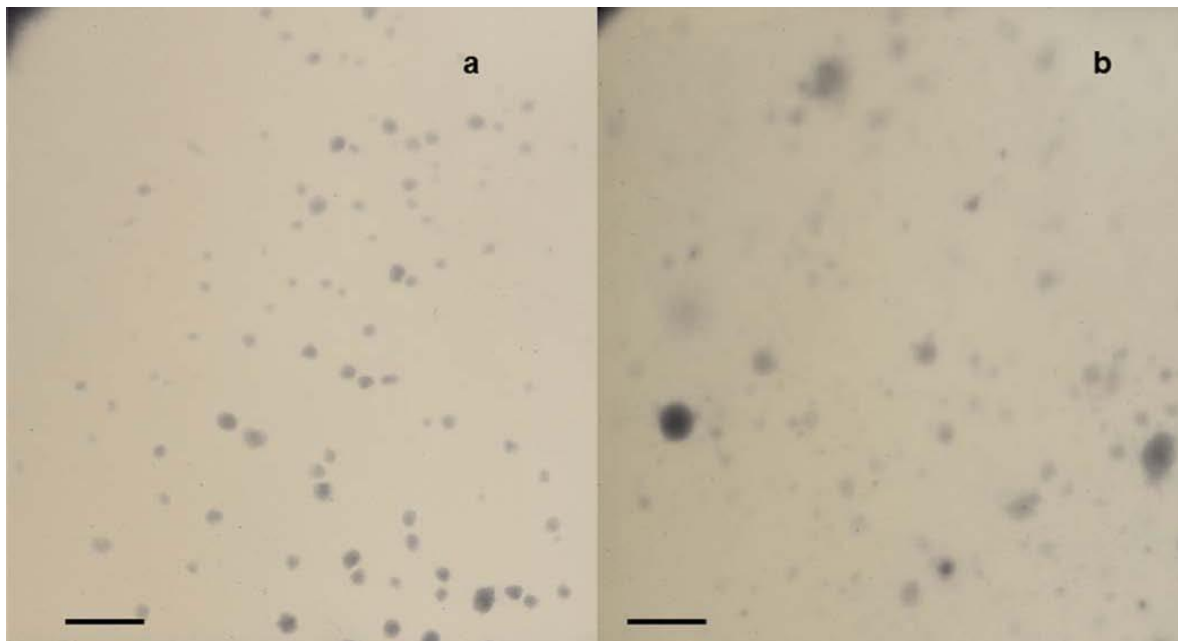


Figura 4.3. Microfotografías electrónicas de transmisión de la nanoemulsión de cetirizina (50,000 aumentos); (a) Después de 24 h; (b) Después de 3 meses. Longitud de onda 500 nm.

4.2.3 Determinación del pH

El pH de la nanoemulsión de cetirizina ensayada en conejos fue ligeramente ácida: 6,31. Esto es debido a que el tensioactivo hace que el pH de la formulación sea ácido. Todas las formulaciones preparadas y ensayadas de cetirizina se encontraban en un rango de pH de 4 - 6,5.

El pH de la piel se encuentra entre 4 y 6 dependiendo del área de la piel y de la edad del individuo; por lo tanto, según los pH obtenidos para esta formulación serían adecuadas para la aplicación tópica (Basketter, 2008). Además, el pH de las formulaciones tópicas es un factor importante para evitar la irritación de la piel o evitar que la piel sea susceptible de una infección bacteriana.

4.2.4 Determinación de la viscosidad

La curva de flujos (esfuerzo cortante versus velocidad de deformación) para la nanoemulsión de cetirizina ensayada en conejos se muestra en la figura 4.4. Las propiedades de flujo de las

formulaciones determinan algunas características esenciales directamente relacionadas con sus aplicaciones, incluyendo estabilidad de almacenamiento, propiedades sensoriales, etc.

La nanoemulsión de cetirizina presentó una viscosidad aparente de $85,23 \pm 1,31$ mPa a 25°C . La curva obtenida se reflejó en el fluido no-Newtoniano, como viscosidad dependiente de la velocidad. Aumentando la velocidad se rompe la estructura coloidal, por lo tanto, se reduce la viscosidad.

La presencia de una fuerza para ceder en las nanoemulsiones es indicativa de la formación de una estructura tridimensional bajo condiciones de no fluido (Wulff-Pérez y col., 2013). El modelo que mejor se fijó para ambos datos de intervalos, ascendentes y descendentes, fue la ecuación de Bingham con un r^2 0,9895 y 0,9939, respectivamente. La ecuación de Bingham es la siguiente:

$$\sigma = \sigma_0 + \eta\gamma \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

Donde σ_0 es el umbral de fluencia, η es la viscosidad plástica y γ es una magnitud vectorial.

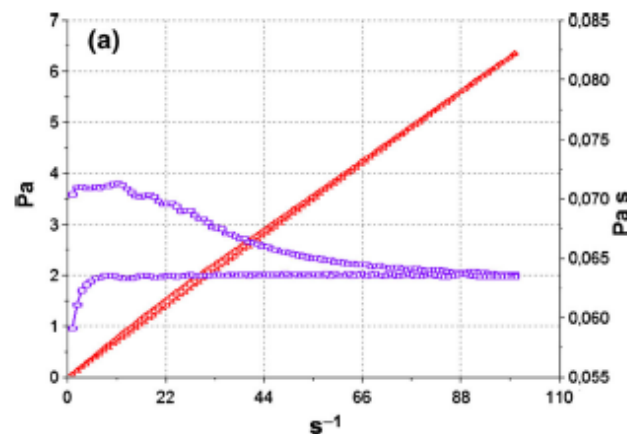


Figura 4.4. Curvas de flujos y curvas de viscosidad de la nanoemulsión de cetirizina. Esfuerzo cortante (Pa) versus velocidad de deformación (s^{-1}), y viscosidad (Pa s) versus velocidad de deformación (s^{-1}).

4.3 CARACTERIZACION DEL HIDROGEL DE CETIRIZINA

Según Chang y Zhang (2011) los hidrogeles se definen como redes de polímeros tradicionales conteniendo grandes cantidades de solvente y han sido utilizadas clásicamente como sistemas de liberación de fármacos. Además, los hidrogeles tienen un aspecto cosmético agradable y aportan una sensación de frescor, muy útiles en ciertas enfermedades dermatológicas (Vermeulen y cols., 1999). Usualmente aumentan el tiempo de permanencia en el sitio de acción, aumentando la liberación del fármaco.

4.3.1 Determinación del pH

El pH obtenido para el hidrogel fue de 6,77 y se mantiene a lo largo del tiempo. El pH de esta formulación se neutralizó con hidróxido de sodio para que la cetirizina se encuentre mayoritariamente en forma no ionizada, y así conseguir favorecer su paso y penetración en la piel. El pH se mantiene a lo largo del tiempo. La desviación estándar de esta formulación fue de $\pm 0,04$.

4.3.2 Determinación de la viscosidad

Aulton, (2004) menciona que la definición cuantitativa de viscosidad corresponde a Newton, que fue el primero que comprendió que la velocidad de flujo era directamente proporcional a la tensión aplicada, así se denomina fluidos newtonianos a los fluidos simples que cumplen la relación y no newtonianos a los que no la cumplen.

Si se representa la curva de flujos (esfuerzo cortante frente velocidad de deformación) se define a la viscosidad dinámica o absoluta también como la pendiente en cada punto de dicha curva; así lo indica Ramirez, (2006).

Por otro lado, el área de tixotropía, característica de los fluidos pseudoplásticos, se observó en el reograma obtenido del gel de hidroxietil celulosa (hidrogel de cetirizina) (Figura 4.5). Este comportamiento reológico es deseable para las formulaciones tópicas, porque al aplicarse sobre la piel se rompe la estructura tridimensional para facilitar la difusión, y al dejarlo en reposo tras su aplicación recupera la estructura y por tanto la viscosidad (Pader, 1993). Esta formulación presentó una viscosidad de $6,31 \pm 0,01 \text{ Pa s}$ a 25°C (100 s^{-1}).

Como era de esperar, la viscosidad aparente del hidrogel fue mucho más alta que la nanoemulsión de cetirizina. El modelo que ofrece el mejor ajuste de los datos experimentales fue la ecuación de Herschel-Bulkley con un r^2 de 0,9763 y 0,9999 para los tramos ascendente y descendente respectivamente (Moller y col., 2009).

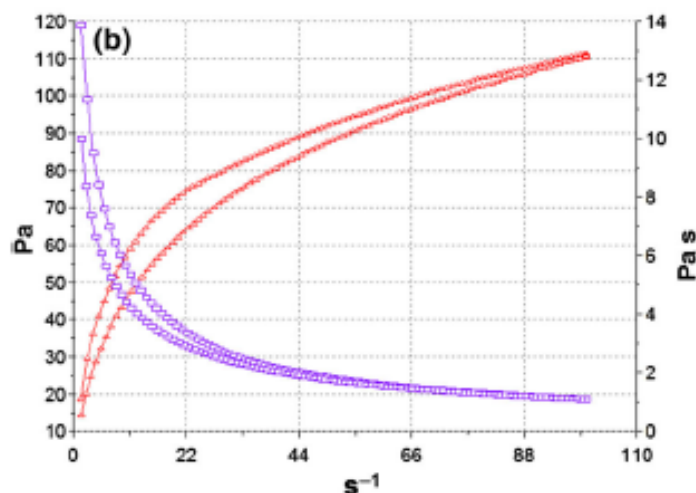


Figura 4.5. Curvas de flujos y curvas de viscosidad del hidrogel de cetirizina. Esfuerzo cortante (Pa) versus velocidad de deformación (s^{-1}), y viscosidad (Pa s) versus velocidad de deformación (s^{-1}).

4.4 ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL HIDROGEL Y DE LA NANOEMULSIÓN DE CETIRIZINA DICLORHIDRATO

La velocidad de sedimentación de las dos formulaciones de cetirizina ensayadas en conejos (hidrogel y nanoemulsión) se midieron utilizando el equipo Turbiscan Lab®, descrito en el apartado 3.2.5 de Material y Métodos. Este equipo es capaz de predecir la estabilidad de las formulaciones a largo plazo mediante el análisis de dispersión múltiple de la luz (DLS). De acuerdo con Liu y col., 2011, esta medición se basa en la variación de la migración de partículas y la coalescencia, que resultó en señales de retrodispersión y de transmisión. Esta técnica nos permite detectar cambios en la formulación durante un período de tiempo determinado. Además, las muestras de formulación se analizan para los fenómenos de desestabilización sin la necesidad de diluir o modificar la medición (Celia y col., 2009).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estabilidad óptica se midió a intervalos de 24 horas, que fueron pre-programados en el Turbiscan Lab®. La estabilidad de las dos formulaciones también se evaluó mediante la observación de su homogeneidad y de su turbidez en un periodo de tiempo.

4.4.1 Análisis de la retrodispersión de la luz del hidrogel de cetirizina

Los perfiles de estabilidad óptica de las dispersiones de cetirizina diclorhidrato (Figura 4.6), mostraron que el hidrogel presentó valores de transmisión y retrodispersión que permanecieron estables en todos los análisis a lo largo de 24 horas, con una fluctuación futura típica para esta clase de formulaciones debido a su alta viscosidad. Sin embargo, no se observó desestabilización del hidrogel ni exudado.

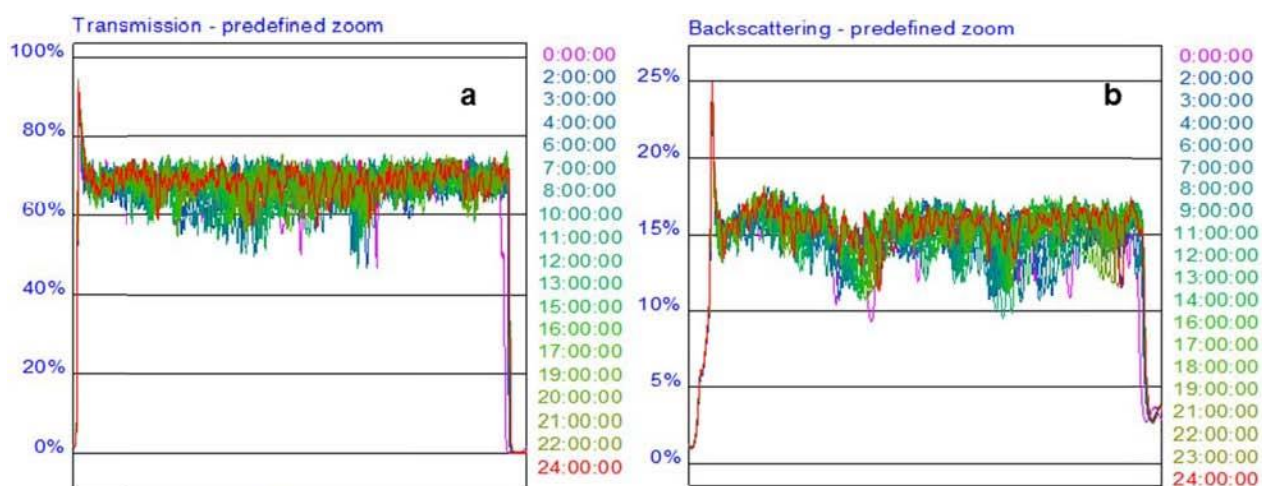


Figura 4.6. Perfiles de transmisión (a) y perfiles de retrodispersión (b) del hidrogel de cetirizina. Producidos por el Turbiscan Lab®.

4.4.2 Análisis de la retrodispersión de la luz de la nanoemulsión

Los perfiles de estabilidad óptica de las dispersiones de cetirizina diclorhidrato (Figura 4.7), mostraron que la nanoemulsión de cetirizina mostró variaciones $< 1,5\%$, por lo tanto, no se observó coalescencia, formación de cremado o sedimentación.

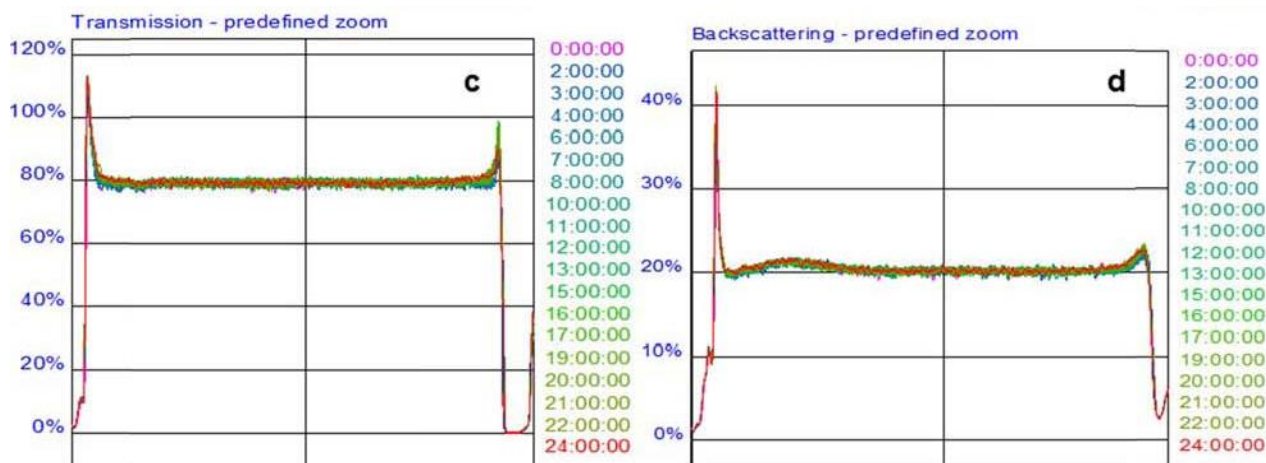


Figura 4.7. Perfiles de transmisión (c) y perfiles de retrodispersión (d) de la nanoemulsión de cetirizina. Producidos por el Turbiscan Lab®.

Tal como se puede observar en la figura 4.7, hay un porcentaje uniforme de la luz retrodispersada a lo largo de toda la formulación. Los cambios en la señal son bajos y permanece en el rango de 20% a 25% sobre la totalidad de las 24 horas, lo que sugiere que las gotitas de la formulación eran homogéneas de tamaño. Estos resultados mostraron también que los cambios en la formulación estaban por debajo del 10% a las 24 horas; por lo tanto, podemos decir que la nanoemulsión de cetirizina presenta una buena estabilidad, y permanecerá estable y homogénea durante un período de tiempo prolongado. La formulación después de ser congelada para evaluar su estabilidad termodinámica, no presentó separación de fases, demostrando ser termodinámicamente estable.

4.5 ESTUDIOS DE PERMEACIÓN TRANSDÉRMICA DE CETIRIZINA EN PIEL HUMANA

El valor de la concentración a saturación en solución reguladora de fosfatos pH 7,4 obtenido para cetirizina de acuerdo con lo descrito en el apartado 3.2.6 de Material y Métodos es de 538 $\mu\text{g/ml}$. Este valor es necesario, para determinar que se cumple condiciones sink y por tanto no se producirá una precipitación del fármaco por problemas de solubilidad que impida la correcta cuantificación de los valores permeados y de esta manera obtener datos fiables de los valores de flujo y de otros parámetros transdérmicos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El experimento se llevó a cabo bajo condiciones de dosis infinitas. Esto es, que la concentración de fármaco en el compartimento donador de las células de Franz no supera el 5% de la depositada, por lo que se asume que la concentración de fármaco en este compartimento es constante.

4.5.1 Permeación intrínseca de cetirizina base y cetirizina diclorhidrato en propilenglicol/agua (50:50) y en etanol/agua (50:50)

Con el objetivo de estudiar la capacidad intrínseca de cetirizina para atravesar la piel se ha realizado un estudio comparativo de permeación transdérmica de cetirizina en solución empleando como vehículo propilenglicol/agua (50:50) y etanol/agua (50:50), utilizando piel humana procedente del mismo donante, según lo descrito en el apartado 3.2.6 de Material y Métodos. En esta experiencia se utilizó cetirizina base y cetirizina diclorhidrato.

4.5.1.1 Cantidades permeadas acumuladas en función del tiempo

Las cantidades permeadas acumuladas (μg) obtenidas en el estudio de permeación intrínseca de cetirizina base y cetirizina diclorhidrato respecto al tiempo de muestreo para cada replicado (Q1, Q2 y Q3) se muestran en las tablas 4.6 y 4.7.

Tabla 4.6. Cantidades permeadas acumuladas (μg) para cada replicado de cetirizina base y cetirizina diclorhidrato en propilenglicol/agua (50:50), obtenidos para cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación intrínseca.

Tiempos (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg) Cetirizina base			Cantidades permeadas acumuladas (μg) Cetirizina diclorhidrato		
	Q1	Q2	Q3	Q1	Q2	Q3
	4	*	*	*	*	3,54
20	*	*	*	3,59	17,06	*
22	1,30	*	2,92	3,89	18,52	1,75
24	2,69	4,10	3,05	4,52	19,80	2,02
26	4,07	4,80	*	4,80	22,96	2,92
28	*	4,93	4,00	5,16	24,04	*

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

Tabla 4.7. Cantidades permeadas acumuladas (μg) para cada replicado de cetirizina base y cetirizina diclorhidrato en etanol/agua (50:50), obtenidos para cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación intrínseca.

Tiempos (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg) Cetirizina base			Cantidades permeadas acumuladas (μg) Cetirizina diclorhidrato		
	Q1	Q2	Q3	Q1	Q2	Q3
	3	*	*	*	*	*
20	17,92	*	19,85	*	*	276,63
22	20,41	15,98	22,57	4,23	95,44	319,61
24	24,53	20,11	26,04	*	107,37	345,08
26	29,40	21,10	27,43	4,99	117,30	374,95
28	33,15	23,32	30,76	5,66	127,18	394,49
31	37,00	24,77	*	7,52	*	*

*Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

4.5.1.2 Parámetros de permeación

En las tablas 4.8 a 4.11 se muestran los diferentes parámetros de permeación: parámetros P1 y P2, coeficiente de permeabilidad (K_p), tiempo de latencia (TI), flujo (J), entre otros, obtenidas en el estudio de permeación intrínseca de cetirizina base y cetirizina diclorhidrato, respectivamente.

- Cetirizina Base en propilenglicol/agua (50:50)

Tabla 4.8. Valores individuales, mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación estimados mediante el programa LAPLACE de cetirizina base en propilenglicol/agua (50:50).

Parámetros LAPLACE	Q1	Q2	Q3	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,02617	0,00046	0,0008	0,0008	0,02617	0,00046
P2 (1/h)	0,00447	0,04409	0,02301	0,02301	0,04409	0,00447
$K_p=P1 \times P2$ (cm/h)	0,00012	0,00002	0,00002	0,00002	0,00012	0,00002
TI (h)	37,31	3,78	7,244	7,244	37,31	3,78
J ($\mu\text{g}/\text{h}$)	0,4757	0,08168	0,07493	0,08168	0,4757	0,07493
J Laplace ($\mu\text{g}/\text{h}$)	0,942	0,2074	0,19	0,2074	0,942	0,19
Cee ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0,00118	0,00026	0,00024	0,00026	0,00118	0,00024
Co ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	4069					
Sup.piel (cm ²)	2,54					
Cl/F (ml/min)	84					

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Cetirizina diclorhidrato en propilenglicol/agua (50:50)

Tabla 4.9. Valores individuales, mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación estimados mediante el programa LAPLACE de cetirizina diclorhidrato en propilenglicol/agua (50:50).

Parámetros LAPLACE	Q1	Q2	Q3	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,00017	0,00059	0,00939	0,00059	0,00939	0,00017
P2 (1/h)	0,07212	0,09559	0,00495	0,07212	0,09559	0,00495
Kp= P1 x P2 (cm/h)	0,00001	0,00006	0,00005	0,00005	0,00006	0,00001
Tl (h)	2,31100	1,74300	33,68000	2,31100	33,68000	1,74300
J (µg/h)	0,07972	0,36220	0,29800	0,29800	0,36220	0,07972
J Laplace (µg/h)	0,20250	0,92000	0,62520	0,62520	0,92000	0,20250
Cee (µg/ml)	0,00025	0,00115	0,00078	0,00078	0,00115	0,00025
Co (µg/ml)	6413					
Sup.piel (cm ²)	2,54					
Cl/F (ml/min)	84					

- Cetirizina Base en etanol/agua (50:50)

Tabla 4.10. Valores individuales, mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación estimados mediante el programa LAPLACE de cetirizina base en etanol/agua (50:50).

Parámetros LAPLACE	Q1	Q2	Q3	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,01746	0,00235	0,00524	0,00524	0,01746	0,00235
P2 (1/h)	0,01400	0,04893	0,03199	0,03199	0,04893	0,01400
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,00024	0,00012	0,00017	0,00017	0,00024	0,00012
Tl (h)	11,91000	3,40600	5,21000	5,21000	11,91000	3,40600
J (µg/h)	0,77140	0,36310	0,52890	0,52890	0,77140	0,36310
J Laplace (µg/h)	14,63000	0,92200	1,34000	1,34000	14,63000	0,92200
Cee (µg/ml)	0,01829	0,00115	0,00168	0,00168	0,01829	0,00115
Co (µg/ml)	3156					
Sup.piel (cm ²)	2,54					
Cl/F (ml/min)	84					

- Cetirizina diclorhidrato en etanol/agua (50:50)

Tabla 4.11. Valores individuales, mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación estimados mediante el programa LAPLACE de cetirizina diclorhidrato en etanol/agua (50:50).

Parámetros LAPLACE	Q1	Q2	Q3	Mediana	Máximo	Mínimo
P1(cm)	0,00170	0,00597	0,00324	0,00324	0,00597	0,00170
P2(1/h)	0,01261	0,04740	0,24620	0,04740	0,24620	0,01261
Kp=P1 x P2(cm/h)	0,00002	0,00028	0,00080	0,00028	0,00080	0,00002
Tl (h)	13,22000	3,51600	0,67690	3,51600	13,22000	0,67690
J (µg/h)	0,15510	2,04600	5,76100	2,04600	5,76100	0,15510
J Laplace(µg/h)	0,39200	5,19000	14,63000	5,19000	14,63000	0,39200
Cee(µg/ml)	0,00049	0,00649	0,01829	0,00649	0,01829	0,00049
Co (µg/ml)	7230					
Sup.piel (cm ²)	2,54					
Cl/F (ml/min)	84					

4.5.1.3 Tratamiento estadístico

Se han comparado los parámetros de permeación de cetirizina base y cetirizina diclorhidrato en propilenglicol/agua (50:50) y en etanol/agua (50:50), donde se ha realizado el test no paramétrico de Kruskal-Wallis que proporciona el programa SPSS (Tablas 4.12 y 4.13).

Tabla 4.12. Tratamiento estadístico de los parámetros LAPLACE entre cetirizina base y cetirizina diclorhidrato en propilenglicol/agua (50:50).

	P1	P2	Kp	Tl	J	Cee
Chi-cuadrado	1,190	1,190	0,048	1,190	0,048	0,048
gl	1	1	1	1	1	1
Sig. asintót.	0,513	0,275	0,827	0,275	0,827	0,827

Estadísticas de contraste (a, b)

- Prueba de Kruskal-Wallis
- Variable de agrupación: formulación

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal como se puede ver en la tabla 4.12 no hay diferencias significativas en todos los parámetros de permeación.

Tabla 4.13. Tratamiento estadístico de los parámetros LAPLACE entre cetirizina base y cetirizina diclorhidrato en etanol/agua (50:50).

	P1	P2	Kp	Tl	J	Cee
Chi-cuadrado	0,429	0,048	0,429	0,048	0,048	0,000
gl	1	1	1	1	1	1
Sig. Asintót.	0,513	0,827	0,513	0,827	0,827	1,000

Estadísticas de contraste (a, b)

- Prueba de Kruskal-Wallis
- Variable de agrupación: formulación

Tabla 4.14. Tabla resumen de las medianas de los parámetros de permeación LAPLACE de cetirizina base y cetirizina diclorhidrato en propilenglicol/agua (50:50) y en etanol/agua (50:50).

FORMULACIÓN	Parámetros (Mediana)						Co (µg/ml)
	P1 (cm)	P2 (1/h)	Kp (cm/h)	Tl (h)	J (µg/h)	Cee (µg/ml)	
Cetirizina base (Propilenglicol/agua 50:50)	0,00080043	0,0230066	0,000020074	7,24	0,207404	0,000259223	4069
Cetirizina diclorhidrato (Propilenglicol/agua 50:50)	0,000590827	0,07211538	0,000046462	2,31	0,6252478	0,000781462	6413
Cetirizina base (etanol/agua 50:50)	0,005238322	0,0319926	0,000167588	5,21	1,340148	0,001674976	3156
Cetirizina diclorhidrato (etanol/agua 50:50)	0,0032359	0,0474023	0,000282996	3,52	5,19048	0,006487289	7230
Sig. asintót. Cetirizina base y cetirizina diclorhidrato							
(Propilenglicol/agua 50:50)	0,513	0,275	0,827	0,275	0,827	0,827	
(etanol/agua 50:50)	0,513	0,827	0,513	0,827	0,827	1,000	
Cee terapéutico = 0,257 - 0,384 µg/ml							

A partir de las soluciones libre de fármaco, el mayor flujo para la cetirizina se obtiene cuando se formula el antihistamínico en forma de diclorhidrato en el solvente etanol/agua (50:50), $J = 5,1904 \mu\text{g/h}$ (Tabla 4.14). Este resultado seguramente es debido a que en este vehículo la solubilidad de la

cetirizina es más alta ($C_0 = 7230 \mu\text{g/ml}$), y también, al hecho de que el alcohol desarrolla una disrupción reversible de los lípidos del estrato córneo y una retención de agua en el mismo, que facilitaría el paso de la cetirizina diclorhidrato a través de la estructura cutánea; el valor de P_2 correspondiente a esta formulación ($P_2 = 0,0474/\text{h}$) es superior al de P_1 ($P_1 = 0,00323 \text{ cm}$), valores que justifican la acción del vehículo en la difusión del fármaco a través de la piel, dado que P_2 está relacionado con la difusión del fármaco a través de la piel y P_1 con el coeficiente de reparto del fármaco entre el vehículo y los lípidos del estrato córneo. Los resultados de la tabla 4.14 también muestran que para alcanzar concentraciones en estado de equilibrio estacionario (C_{ee}) de cetirizina diclorhidrato se necesita menor tiempo de latencia (T_l) que para cetirizina base.

Cabe destacar que la cetirizina base obtenida a partir de la cetirizina diclorhidrato no es un polvo, sino una masa pegajosa con la que es bastante difícil elaborar formulaciones, por este motivo todos los estudios realizados en este trabajo se han llevado a cabo utilizando cetirizina diclorhidrato. Y también porque los valores de flujos eran inferiores a los de la cetirizina diclorhidrato, al contrario de lo que en un primer momento cabría esperar.

4.5.2 Estudios de permeación transdérmica en piel humana de diferentes formulaciones al 5% de cetirizina diclorhidrato con 10% de distintos promotores (Screening de promotores)

En el presente trabajo se van elaborar formulaciones con diferentes series de promotores para averiguar con cuál se consigue potenciar el flujo de la cetirizina diclorhidrato con el objetivo de vehiculizarlas en formulaciones nanoestructuradas para conseguir niveles terapéuticos mayores.

A continuación, se muestran los resultados de los estudios de permeación transdérmica de las diferentes formulaciones de cetirizina diclorhidrato a través de piel humana con diferentes promotores, realizados según lo descrito en el apartado 3.2.6 de Material y Métodos.

4.5.2.1 Permeación transdérmica de formulaciones al 5% de cetirizina diclorhidrato con diferentes pirrolidonas al 10%

4.5.2.1.1 Cantidades permeadas de cetirizina diclorhidrato

Las tablas 4.15 a 4.19 muestran las cantidades permeadas acumuladas (μg) en cada tiempo de muestreo (h) para los distintos replicados (Q) de las formulaciones de cetirizina diclorhidrato con diferentes pirrolidonas como promotores (**metilpirrolidona, etilpirrolidona, octilpirrolidona y**

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

dodecylpirrolidona), obtenidos en el estudio de permeación a través de piel humana. Se acompaña además, la media, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana, mínimo y máximo, obtenidos para cada tiempo de toma de muestra.

En las figuras 4.8 a 4.12 se representan las cantidades permeadas acumuladas (μg) en función del tiempo (h) para cada replicado en cada una de las formulaciones.

Tabla 4.15. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación de referencia (**sin promotor**). Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	
15	29,89	*	*	*	*	
17	33,71	*	*	*	1,87	
19	38,18	47,48	8,27	*	2,04	
21	42,46	52,67	9,14	*	2,38	
24	*	69,46	11,27	*	3,01	
Tiempo (h)	Media (μg)	DE	CV%	Mediana	Máximo	Mínimo
15	29,89	*	*	29,89	29,89	29,89
17	17,79	22,52	126,56	17,79	33,71	1,87
19	23,99	22,23	92,64	23,23	47,48	2,04
21	26,66	24,65	92,44	25,80	52,67	2,38
24	27,91	36,22	129,74	11,27	69,46	3,01

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

Tabla 4.16. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **metilpirrolidona** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estandar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
13	7,88	*	19,90	*	7,31	5,09
15	10,15	3,05	22,05	*	7,98	6,14
17	15,60	3,26	25,99	47,08	8,85	6,37
19	17,41	3,45	32,51	52,91	10,29	8,06
21	20,97	*	*	57,79	11,77	9,96
24	24,19	4,83	36,80	*	16,95	13,45
Tiempo (h)	Media (μg)	DE	CV%	Mediana	Máximo	Mínimo
13	10,04	6,68	66,50	7,59	19,90	5,09
15	9,87	7,29	73,81	7,98	22,05	3,05
17	17,86	16,44	92,05	12,23	47,08	3,26
19	20,77	18,73	90,15	13,85	52,91	3,45
21	25,12	22,31	88,79	16,37	57,79	9,96
24	19,24	12,04	62,55	16,95	36,80	4,83

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.17. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **etilpirrolidona** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estandar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cda tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
13	21,13	3,39	10,96	*	16,05	4,19
15	30,08	5,68	16,44	41,76	18,95	5,53
17	38,46	5,83	22,37	44,54	22,48	6,46
19	*	6,19	27,50	53,12	26,27	7,24
21	*	7,47	30,80	*	*	8,8
24	*	9,36	*	*	*	13,48
Tiempo (h)	Media (μg)	DE	CV%	Mediana	Máximo	Mínimo
13	11,14	7,62	68,39	10,96	21,13	3,39
15	19,74	14,16	71,75	17,69	41,76	5,53
17	23,36	15,94	68,27	22,43	44,54	5,83
19	24,06	19,13	79,48	26,27	53,12	6,19
21	15,69	13,10	83,51	8,80	30,80	7,47
24	11,42	2,91	25,51	11,42	13,48	9,36

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

Tabla 4.18. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **octilpirrolidona** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estandar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
13	8,95	23,71	4,71	50,17	3,91	5,18
15	12,20	34,49	7,22	58,94	4,36	6,56
17	16,76	48,44	8,45	64,68	4,94	9,02
19	20,12	68,74	10,53	68,69	6,04	12,10
21	27,00	78,17	14,86	86,33	7,86	15,59
24	40,40	111,50	20,08	*	11,68	29,04
Tiempo (h)	Media (μg)	DE	CV%	Mediana	Máximo	Mínimo
13	16,11	18,26	113,38	7,07	50,17	3,91
15	20,63	21,79	105,62	9,71	58,94	4,36
17	25,38	24,99	98,45	12,89	64,68	4,94
19	31,04	29,54	95,17	16,11	68,74	6,04
21	38,30	34,69	90,56	21,30	86,33	7,86
24	42,54	40,00	94,03	29,04	111,50	11,68

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.19. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **docecilpirrolidona** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
13	3,62	4,10	11,12	3,60	7,70	*
15	4,57	4,80	17,19	3,73	14,17	*
17	5,62	6,73	20,90	6,26	17,85	*
19	6,90	7,21	26,15	7,08	24,64	*
21	7,73	8,73	29,43	9,27	37,16	*
24	11,15	11,32	42,47	13,89	*	*
Tiempo (h)	Media (μg)	DE	CV%	Mediana	Máximo	Mínimo
13	6,03	3,32	55,09	4,10	11,12	3,60
15	8,89	6,30	70,85	4,80	17,19	3,73
17	11,47	7,30	63,68	6,73	20,90	5,62
19	14,40	10,06	69,87	7,21	26,15	6,90
21	18,46	13,82	74,88	9,27	37,16	7,73
24	19,71	15,23	77,27	12,60	42,47	11,15

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

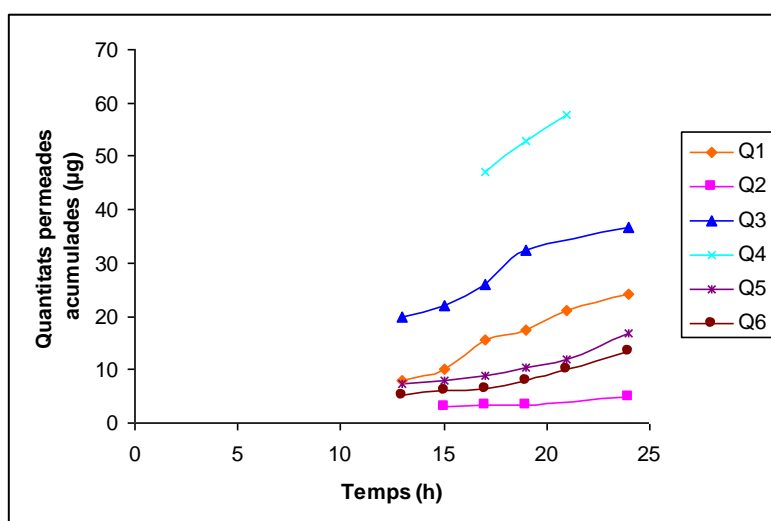


Figura 4.8. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de referencia (sin promotor) en función del tiempo para cada uno de los replicados.

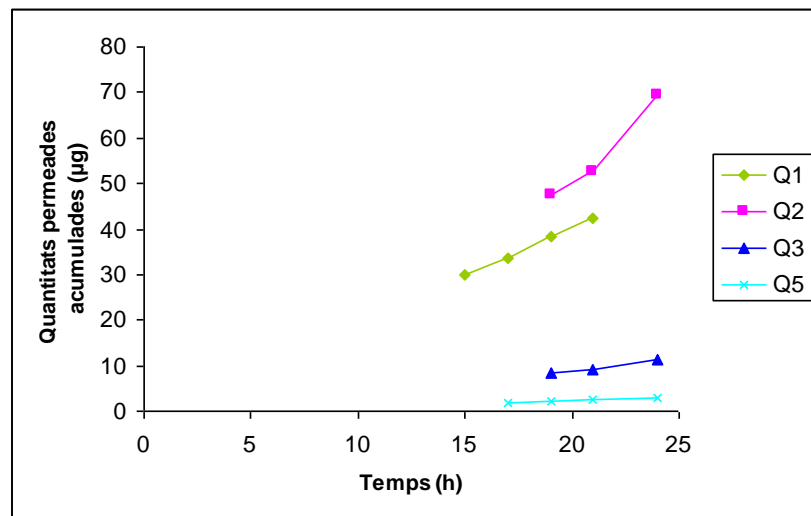


Figura 4.9. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **metilpirrolidona** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

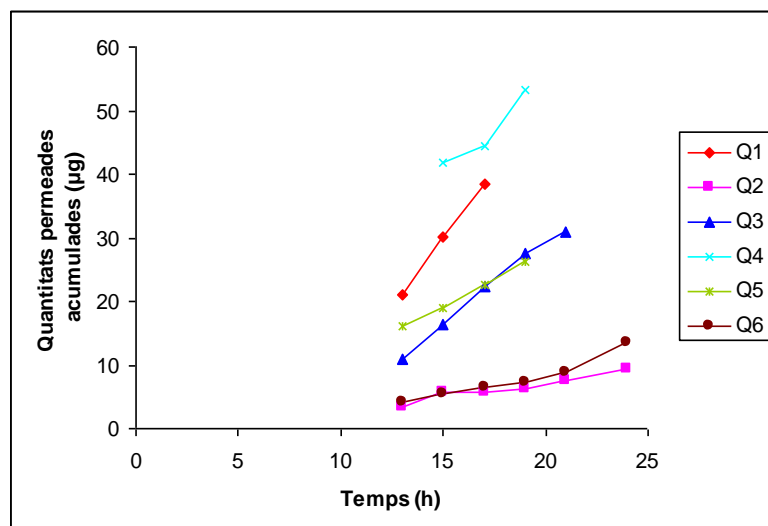


Figura 4.10. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **etilpirrolidona** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

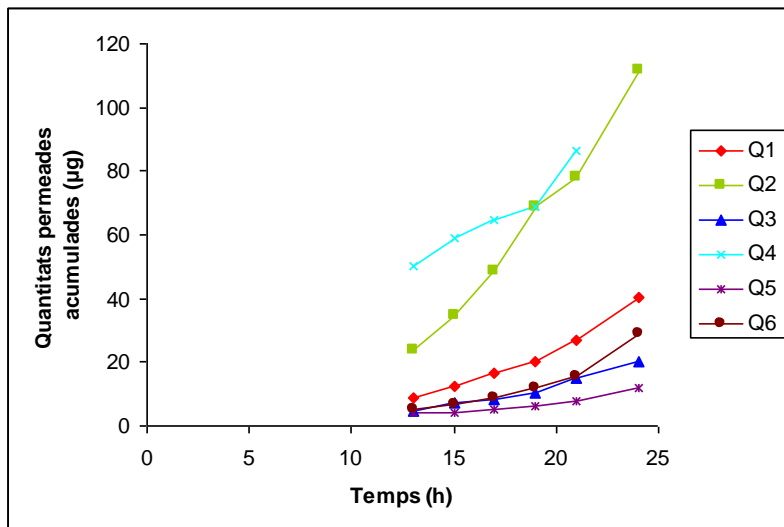


Figura 4.11. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **octilpirrolidona** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

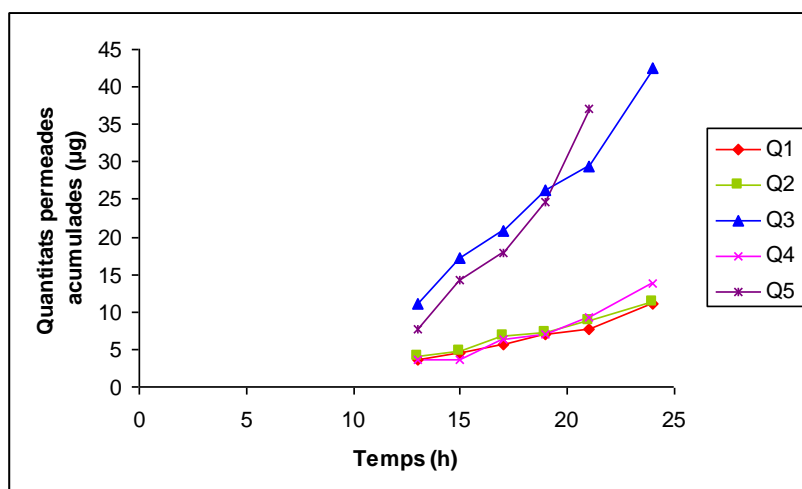


Figura 4.12. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **dodecylpirrolidona** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

4.5.2.1.2 Parámetros de permeación

En las tablas 4.20 a 4.24 se exponen los valores individuales, mediana, mínimo y máximo, de los diferentes parámetros de permeación: P1, P2, coeficiente de permeabilidad (Kp), flujo (J), período de latencia (TI), entre otros, obtenidos para cada emulsión de cetirizina diclorhidrato formuladas con cada uno de los promotores ensayados.

Tabla 4.20. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina **sin promotor**.

Parámetros	Q1	Q2	Q3	Q5	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,000090	0,000917	0,000917	0,000053	0,000504	0,000917	0,000053
P2 (1/h)	0,184800	0,030730	0,030730	0,025240	0,030730	0,184800	0,025240
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000017	0,000028	0,000028	0,000001	0,000022	0,000028	0,000001
TI (h)	0,901800	5,424000	5,424000	6,604000	5,424000	6,604000	0,901800
J (µg/h)	0,830300	1,409000	1,409000	0,066760	1,120000	1,409000	0,066760
J Laplace (µg/h)	2,109000	3,579000	3,579000	0,169000	2,844000	3,579000	0,169000
Cee (µg/ml)	0,002636	0,004473	0,004473	0,000211	0,003555	0,004473	0,000211

* Valores de Q4 no considerados por aberrante o pérdida de muestra

Tabla 4.21. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **metilpirrolidona** como promotor.

Parámetros	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,000668	0,000007	0,000064	0,000005	0,000256	0,000345	0,000160	0,000668	0,000005
P2 (1/h)	0,019150	0,216800	0,199900	4,504000	0,026800	0,018960	0,113300	4,504000	0,018960
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000013	0,000002	0,000013	0,000022	0,000007	0,000007	0,000010	0,000022	0,000002
TI (h)	8,703000	0,768700	0,833800	0,037000	6,219000	8,788000	3,527000	8,788000	0,037000
J (µg/h)	0,639300	0,079860	0,644600	1,092000	0,343500	0,326800	0,491400	1,092000	0,079860
J Laplace (µg/h)	1,624000	0,202800	1,637000	2,773000	0,872300	0,829800	1,248000	2,773000	0,202800
Cee (µg/ml)	0,002029	0,000254	0,002046	0,003465	0,001090	0,001037	0,001560	0,003465	0,000254

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.22. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **etilpirrolidona** como promotor.

Parámetros	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,002891	0,000114	0,001487	0,000085	0,000308	0,000512	0,000410	0,002891	0,000085
P2 (1/h)	0,015040	0,033080	0,015590	0,262000	0,043820	0,014680	0,024340	0,262000	0,014680
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000043	0,000004	0,000023	0,000022	0,000014	0,000008	0,000018	0,000043	0,000004
Tl (h)	11,080000	5,038000	10,690000	0,636200	3,804000	11,360000	7,863000	11,360000	0,636200
J (µg/h)	2,174000	0,189100	1,159000	1,118000	0,675500	0,375500	0,896700	2,174000	0,189100
J Laplace (µg/h)	5,515000	0,480400	2,941000	2,840000	1,716000	0,952400	2,278000	5,515000	0,480400
Cee (µg/ml)	0,006893	0,000600	0,003676	0,003549	0,002144	0,001190	0,002847	0,006893	0,000600

Tabla 4.23. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **octilpirrolidona** como promotor.

Parámetros	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,004168	0,009327	0,001574	0,000189	0,000559	0,008755	0,002871	0,009327	0,000189
P2 (1/h)	0,009005	0,010040	0,010310	0,171100	0,012920	0,005884	0,010170	0,171100	0,005884
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000038	0,000094	0,000016	0,000032	0,000007	0,000052	0,000035	0,000094	0,000007
Tl (h)	18,510000	16,600000	16,170000	0,974200	12,900000	28,320000	16,390000	28,320000	0,974200
J (µg/h)	1,877000	4,682000	0,811300	1,616000	0,361400	2,576000	1,746000	4,682000	0,361400
J Laplace (µg/h)	4,654000	11,720000	2,035000	4,104000	0,914900	5,825000	4,379000	11,720000	0,914900
Cee (µg/ml)	0,005817	0,014650	0,002544	0,005129	0,001144	0,007280	0,005473	0,014650	0,001144

Tabla 4.24. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **dodecilpirrolidona** como promotor.

Parámetros	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,000368	0,000273	0,001880	0,001242	0,009478	0,001242	0,009478	0,000273
P2 (1/h)	0,016210	0,020140	0,013760	0,009594	0,007176	0,013760	0,020140	0,007176
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000006	0,000005	0,000026	0,000012	0,000068	0,000012	0,000068	0,000005
Tl (h)	10,280000	8,275000	12,110000	17,370000	23,230000	12,110000	23,230000	8,275000
J (µg/h)	0,298200	0,274600	1,293000	0,595900	3,401000	0,595900	3,401000	0,274600
J Laplace (µg/h)	0,757000	0,697500	3,278000	1,487000	8,138000	1,487000	8,138000	0,697500
Cee (µg/ml)	0,000946	0,000872	0,004097	0,001858	0,010170	0,001858	0,010170	0,000872

* Valores de Q6 no considerados por aberrante o pérdida de muestra

4.5.2.1.3 Tratamiento estadístico

Se han comparado estadísticamente los parámetros de permeación, obtenidos tras el estudio de permeación a través de piel humana, de las formulaciones con cetirizina diclorhidrato al 5% con diferentes pirrolodonas como promotores, mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis que proporciona el programa SPSS, según lo expuesto en el apartado 3.2.6.1 de Material y Métodos. En la tabla 4.25 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.25. Tratamiento estadístico de los parámetros LAPLACE entre las diferentes formulaciones de cetirizina con la serie de pirrolidonas.

	P1	P2	Kp	Tl	J	Cee
Chi-Cuadrado	8,236	10,305	4,966	10,305	5,424	5,424
gl	3	3	3	3	3	3
Sig. asintót.	0,041	0,016	0,174	0,016	0,143	0,143

Estadísticas de contraste (a, b)

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Formulación

Mediante este análisis estadístico se han puesto de manifiesto diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), excepto para P1, P2 y Tl.

En la tabla 4.26 se puede observar que las formulaciones realizadas con distintas pirrolidonas como promotores de la permeación, no permiten obtener flujos elevados de cetirizina, por lo que se puede afirmar que estos penetrantes no son los más apropiados para elaborar formulaciones destinadas a ser administradas por vía transdérmica. Los valores de P1 de la octil y dodecil pirrolidonas son mayores a los que no tienen promotor, por lo que favorecen el reparto, quizás por aumentar el grado de lipofilia de la formulación para atravesar el estrato córneo de la piel. En general las pirrolidonas disminuyen el coeficiente de reparto del fármaco entre el vehículo y la piel si se juzga por los valores de P1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

También se puede observar que el valor de P2 es mayor para la metilpirrolidona, es decir que aumenta la difusión de la cetirizina a través de la piel.

Tabla 4.26. Tabla resumen de la mediana de los parámetros de permeación LAPLACE de las formulaciones de cetirizina diclorhidrato con una serie de pirrolidonas.

Formulación de cetirizina con diferentes promotores	Parámetros (Mediana)					
	P1 (cm)	P2 (1/h)	Kp (cm/h)	TI (h)	J (µg/h)	Cee (µg/ml)
Sin promotor	0,000503577	0,030729607	0,000022397	5,42	2,844028085	0,003554591
Metilpirrolidona	0,00016041	0,113347223	0,000009827	3,53	1,247913073	0,001559696
Etilpirrolidona	0,000410033	0,024337783	0,000017934	7,86	2,277782	0,002846872
Octilpirrolidona	0,00287106	0,0101735	0,000034921	16,38	4,378950075	0,005473003
Dodecilpirrolidona	0,001242219	0,01375951	0,000011918	12,11	1,48698353	0,001858497
Sig. Asintót.	0,041	0,016	0,174	0,016	0,143	0,143
Co = 50000 µg/ml						
Cee terapéutico = 0,257 - 0,384 µg/ml						

4.5.2.2 Permeación transdérmica de formulaciones al 5% de cetirizina diclorhidrato con diferentes alcoholes al 10%

4.5.2.2.1 Cantidades permeadas de cetirizina diclorhidrato

Las tablas 4.27 a 4.31 muestran las cantidades permeadas acumuladas (µg) en cada tiempo de muestreo (h) para los distintos replicados (Q) de las formulaciones de cetirizina diclorhidrato con diferentes alcoholes como promotores (**octanol, nonano, decanol, dodecanol y alcohol miristilo**), obtenidos en el estudio de permeación a través de piel humana. Se acompaña, además, la media, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana, mínimo y máximo, obtenidos para cada tiempo de toma de muestra.

En las figuras 4.13 a 4.17 se representan las cantidades permeadas acumuladas (µg) en función del tiempo (h) para cada replicado en cada una de las formulaciones.

Tabla 4.27. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **octanol** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)						
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7
2,50	*	*	*	*	*	*	*
6,37	*	*	14,11	*	27,49	30,16	*
19,42	21,58	16,88	29,25	18,28	179,52	283,24	*
21,20	25,62	*	34,16	21,10	228,54	321,52	51,76
23,50	30,81	22,85	40,91	23,61	270,90	401,37	70,52
25,58	38,30	27,25	47,63	27,29	*	*	89,14
27,50	43,89	31,88	64,92	29,57	334,46	447,95	110,91
Tiempo (h)	Media (μg)	DE	CV%	Mediana	Máximo	Mínimo	
2,50	*	*	*	*	*	*	
6,37	23,92	8,60	35,95	27,49	30,16	14,11	
19,42	91,46	113,32	123,90	25,41	283,24	16,88	
21,20	113,79	128,74	113,15	42,96	321,52	21,10	
23,50	123,00	151,25	122,97	40,91	401,37	22,85	
25,58	45,92	25,61	55,78	38,30	89,14	27,25	
27,50	151,94	168,95	111,19	64,92	447,95	29,57	

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.28. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **nonano** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estandar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)							
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8
2,50	*	11,40	*	*	*	*	*	*
6,37	*	17,43	17,32	*	*	25,34	*	*
19,42	11,74	70,44	61,26	*	*	*	*	*
21,20	12,72	80,43	75,46	*	*	91,44	*	*
23,50	14,06	96,89	96,77	*	*	120,37	*	*
25,58	15,81	106,94	113,30	*	*	150,61	*	*
27,50	17,84	114,56	133,50	*	*	209,67	*	*
Tiempo (h)	Media (μg)	DE	CV%	Mediana	Máximo	Mínimo		
2,50	11,40	*	*	11,40	11,40	11,40		
6,37	20,03	4,60	22,97	17,43	25,34	17,32		
19,42	47,81	31,58	66,04	61,26	70,44	11,74		
21,20	65,01	35,50	54,60	77,95	91,44	12,72		
23,50	82,02	46,65	56,87	96,83	120,37	14,06		
25,58	96,67	57,24	59,21	110,12	150,61	15,81		
27,50	118,89	78,92	66,38	124,03	209,67	17,84		

Tabla 4.29. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **decanol** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estandar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)						
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7
2,50	*	*	12,55	*	19,80	*	*
6,37	*	*	15,06	15,22	28,53	*	32,28
19,42	*	*	89,02	74,38	195,65	*	*
21,20	*	*	117,66	93,53	252,41	*	699,03
23,50	*	*	160,99	124,11	304,08	*	*
25,58	*	*	203,21	158,91	344,70	*	715,69
27,50	*	*	220,68	175,18	402,79	*	829,05
Tiempo (h)	Media (μg)	DE	CV%	Mediana	Máximo	Mínimo	
2,50	16,17	5,12	31,68	16,17	19,80	12,55	
6,37	22,77	8,95	39,28	21,88	32,28	15,06	
19,42	119,68	66,19	55,31	89,02	195,65	74,38	
21,20	290,66	281,08	96,71	185,03	699,03	93,53	
23,50	196,40	95,07	48,41	160,99	304,08	124,11	
25,58	355,63	252,78	71,08	273,95	715,69	158,91	
27,50	406,93	298,11	73,26	311,73	829,05	175,18	

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.30. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **dodecanol** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estandar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)						
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7
2,50	*	*	*	*	*	*	*
6,37	*	*	12,52	*	22,20	*	*
19,42	46,91	14,34	37,08	56,84	83,92	*	*
21,20	49,72	15,49	45,56	69,80	100,16	*	48,30
23,50	60,83	16,75	54,61	82,97	125,87	*	72,23
25,58	67,90	18,80	70,04	94,46	159,37	*	74,56
27,50	75,26	20,23	74,40	103,66	163,53	*	88,84
Tiempo (h)	Media (μg)	DE	CV%	Mediana	Máximo	Mínimo	
2,50	*	*	*	*	*	*	
6,37	17,36	6,84	39,40	17,36	22,20	12,52	
19,42	47,82	25,60	53,53	46,91	83,92	14,34	
21,20	54,84	28,22	51,46	49,01	100,16	15,49	
23,50	68,88	35,90	52,12	66,53	125,87	16,75	
25,58	80,86	45,88	56,74	72,30	159,37	18,80	
27,50	87,65	46,67	53,24	82,05	163,53	20,23	

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

Tabla 4.31. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **alcohol miristilo** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estandar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)						
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7
2,50	15,72	*	13,50	*	*	*	46,49
6,37	21,42	*	15,33	*	*	20,65	*
19,42	50,41	17,91	38,29	16,73	*	48,66	*
21,20	55,74	20,02	45,96	18,22	*	56,51	48,89
23,50	61,45	22,50	55,57	20,75	*	74,44	54,90
25,58	69,59	23,85	59,92	23,10	*	78,93	65,62
27,50	72,37	24,91	*	24,78	*	80,90	71,10
Tiempo (h)	Media (μg)	DE	CV%	Mediana	Máximo	Mínimo	
2,50	25,23	18,44	73,07	15,72	46,49	13,50	
6,37	19,13	3,32	17,34	20,65	21,42	15,33	
19,42	34,40	16,27	47,30	38,29	50,41	16,73	
21,20	40,89	17,34	42,41	47,42	56,51	18,22	
23,50	48,27	21,81	45,18	55,23	74,44	20,75	
25,58	53,50	24,07	44,99	62,77	78,93	23,10	
27,50	54,81	27,61	50,38	71,10	80,90	24,78	

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

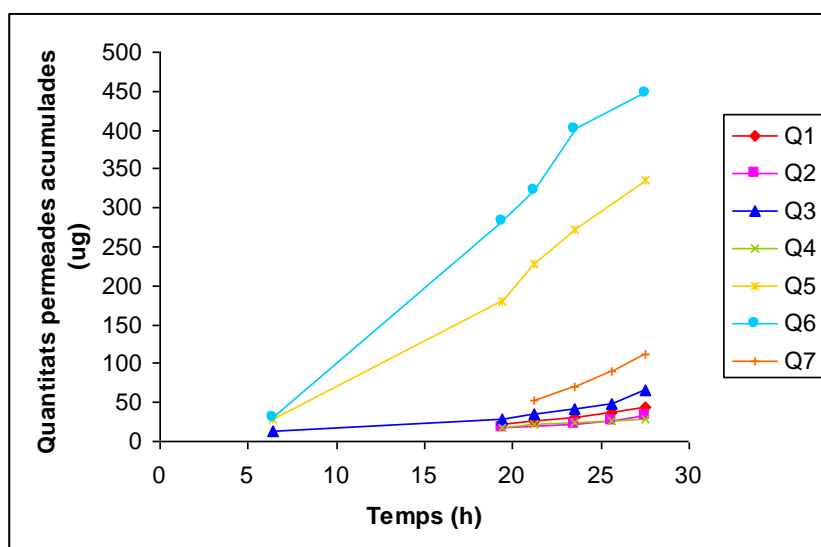


Figura 4.13. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **Octanol** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

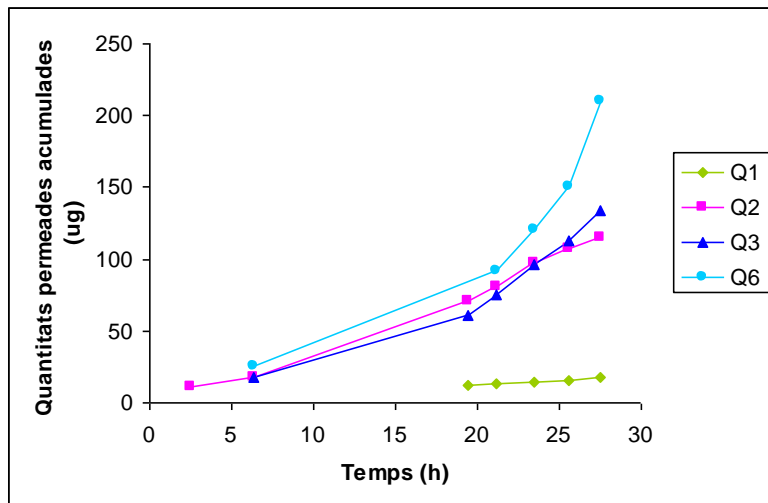


Figura 4.14. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **Nonano** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

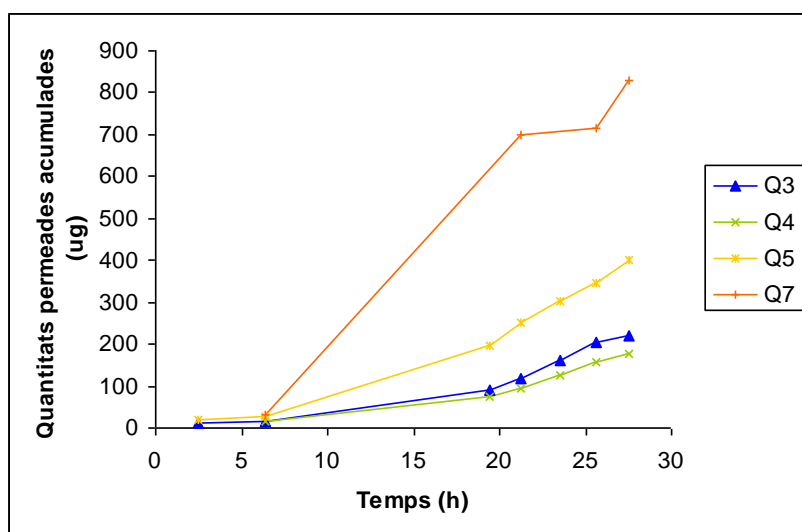


Figura 4.15. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **Decanol** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

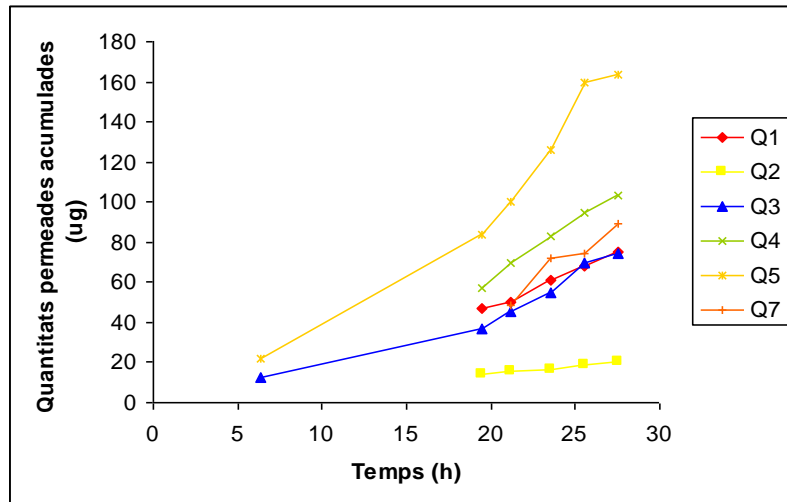


Figura 4.16. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **Dodecanol** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

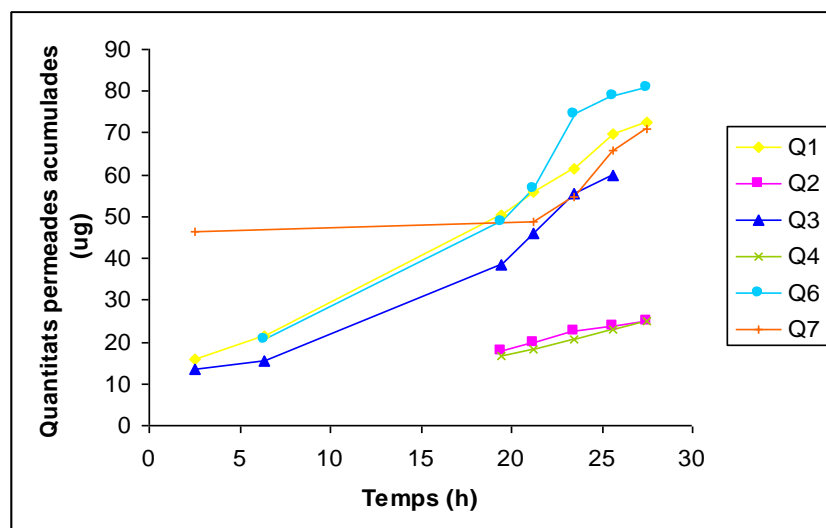


Figura 4.17. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **Alcohol miristilo** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

4.5.2.2.2 Parámetros de permeación

En las tablas 4.32 a 4.36 se exponen los valores individuales, mediana, mínimo y máximo, de los diferentes parámetros de permeación: P1, P2, coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo (J), período de

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

latencia (Tl), entre otros, obtenidos para cada emulsión de cetirizina diclorhidrato formuladas con cada uno de los promotores ensayados.

Tabla 4.32. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **octanol** como promotor.

Parámetros LAPLACE	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,002563	0,001255	0,004225	0,000428	0,007529	0,006214	0,024700	0,004225	0,024700	0,000428
P2 (1/h)	0,010510	0,012980	0,009594	0,025890	0,018740	0,027340	0,005825	0,012980	0,027340	0,005825
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000027	0,000016	0,000041	0,000011	0,000141	0,000170	0,000144	0,000041	0,000170	0,000011
Tl (h)	15,850000	12,840000	17,370000	6,438000	8,892000	6,096000	28,610000	12,840000	28,610000	6,096000
J (µg/h)	1,347000	0,814500	2,027000	0,554200	7,055000	8,494000	7,196000	2,027000	8,494000	0,554200
J Laplace (µg/h)	3,380000	2,060000	5,051000	1,400000	17,900000	21,500000	16,030000	5,051000	21,500000	1,400000
Cee (µg/ml)	0,004224	0,002575	0,006313	0,001750	0,022370	0,026880	0,020030	0,006313	0,026880	0,001750

Tabla 4.33. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **nonano** como promotor.

Parámetros LAPLACE	Q1	Q2	Q3	Q6	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,078130	0,000142	0,000407	0,008161	0,004284	0,078130	0,000142
P2 (1/h)	0,004823	0,041190	0,084970	0,010230	0,025710	0,084970	0,004823
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000377	0,000006	0,000035	0,000083	0,000059	0,000377	0,000006
Tl (h)	34,560000	4,047000	1,962000	16,290000	10,170000	34,560000	1,962000
J (µg/h)	18,840000	0,293000	1,729000	4,174000	2,951000	18,840000	0,293000
J Laplace (µg/h)	39,000000	0,744000	4,390000	10,400000	7,397000	39,000000	0,744000
Cee (µg/ml)	0,048750	0,000930	0,005487	0,013000	0,009245	0,048750	0,000930

* Valores de Q4, Q5, Q7 y Q8 no considerados por aberrante o pérdida de muestra

Tabla 4.34. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **decanol** como promotor.

Parámetros LAPLACE	Q3	Q4	Q5	Q7	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,026140	0,018440	0,016410	0,008866	0,017430	0,026140	0,008866
P2 (1/h)	0,007639	0,008003	0,012780	0,033250	0,010390	0,033250	0,007639
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000200	0,000148	0,000210	0,000295	0,000205	0,000295	0,000148
Tl (h)	21,820000	20,830000	13,040000	5,013000	16,930000	21,820000	5,013000
J (µg/h)	9,983000	7,380000	10,490000	14,740000	10,240000	14,740000	7,380000
J Laplace (µg/h)	24,020000	18,010000	26,600000	37,430000	25,310000	37,430000	18,010000
Cee (µg/ml)	0,030020	0,022510	0,033250	0,046780	0,031640	0,046780	0,022510

* Valores de Q1, Q2 y Q6 no considerados por aberrante o pérdida de muestra

Tabla 4.35. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **dodecanol** como promotor.

Parámetros LAPLACE	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q7	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,001275	0,000004	0,002903	0,002898	0,006539	0,005245	0,002901	0,006539	0,000004
P2 (1/h)	0,022900	1,311000	0,013230	0,016340	0,013210	0,010500	0,014790	1,311000	0,010500
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000029	0,000006	0,000038	0,000047	0,000086	0,000055	0,000043	0,000086	0,000006
Tl (h)	7,278000	0,127100	12,590000	10,200000	12,620000	15,870000	11,400000	15,870000	0,127100
J (µg/h)	1,460000	0,289200	1,921000	2,369000	4,318000	2,754000	2,145000	4,318000	0,289200
J Laplace (µg/h)	3,707000	0,734400	4,860000	6,012000	10,930000	6,910000	5,436000	10,930000	0,734400
Cee (µg/ml)	0,004633	0,000918	0,006075	0,007514	0,013660	0,008637	0,006794	0,013660	0,000918

* Valores de Q6 no considerados por aberrante o pérdida de muestra

Tabla 4.36. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **alcohol mirístico** como promotor.

Parámetros LAPLACE	Q1	Q2	Q3	Q4	Q6	Q7	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,000003	0,000003	0,000005	0,000154	0,000071	0,000002	0,000004	0,000154	0,000002
P2 (1/h)	7,873000	2,157000	3,307000	0,052240	0,329800	8,966000	2,732000	8,966000	0,052240
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000021	0,000007	0,000018	0,000008	0,000024	0,000020	0,000019	0,000024	0,000007
Tl (h)	0,021170	0,077260	0,050390	3,190000	0,505400	0,018590	0,063820	3,190000	0,018590
J (µg/h)	1,049000	0,367600	0,889700	0,402900	1,176000	0,989800	0,939800	1,176000	0,367600
J Laplace (µg/h)	2,665000	0,933600	2,259000	1,020000	2,978000	2,514000	2,386000	2,978000	0,933600
Cee (µg/ml)	0,003330	0,001167	0,002823	0,001275	0,003723	0,003142	0,002983	0,003723	0,001167

* Valores de Q5 no considerados por aberrante o pérdida de muestra

4.5.2.2.3 Tratamiento estadístico

Se han comparado estadísticamente los parámetros de permeación, obtenidos tras el estudio de permeación a través de piel humana, de las formulaciones con cetirizina diclorhidrato al 5% con diferentes alcoholes como promotores, mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis que proporciona el programa SPSS, según lo expuesto en el apartado 3.2.6.1 de Material y Métodos. En la tabla 4.37 se muestran los resultados obtenidos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.37. Tratamiento estadístico de los parámetros LAPLACE entre las diferentes formulaciones de cetirizina con la serie de alcoholes.

	P1	P2	Kp	TL	J	Cee
Chi-Cuadrado	16,038	13,323	11,661	13,323	11,712	11,712
gl	4	4	4	4	4	4
Sig. asintót.	0,003	0,010	0,020	0,010	0,020	0,020

Estadísticas de contraste (a, b)

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Formulación

Mediante este análisis estadístico se han puesto de manifiesto diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en todos los parámetros de permeación.

Tabla 4.38. Tabla resumen de la mediana de los parámetros de permeación LAPLACE de las formulaciones de cetirizina diclorhidrato con una serie de alcoholes.

Formulación de cetirizina con promotor	Parámetros (Mediana)					
	P1 (cm)	P2 (1/h)	Kp (cm/h)	Tl (h)	J (µg/h)	Cee (µg/ml)
Octanol	0,004225000	0,012982354	0,000040535	12,84	5,0510000	0,006313000
Nonano	0,004283929	0,025708157	0,000059028	10,17	7,3968	0,009244844
Decanol	0,017428941	0,010392325	0,000204727	16,93	25,3117	0,031635671
Dodecanol	0,002900603	0,014789174	0,000042894	11,39	5,4362	0,006794401
Alcohol miristilo	4,39395E-06	2,73235877	0,000018795	0,06	2,3863	0,002982502
Sig. Asintót.	0,003	0,010	0,020	0,010	0,020	0,020
Co = 50000 µg/ml						
Cee terapéutic = 0,257 - 0,384 µg/ml						

En este estudio de permeación transdérmica de cetirizina diclorhidrato utilizando diferentes alcoholes como promotores de la permeación, podemos observar que la formulación con la que se obtiene un

mayor flujo es la formulada con decanol. Los valores de P1 y P2 obtenidos para este promotor son del mismo orden (Tabla 4.38), por lo que se puede deducir que la acción de este penetrante se basa en aumentar la solubilidad de la cetirizina en la formulación. La presencia de octanol, nonano y dodecanol permiten obtener valores de flujo similares, no obstante, con el alcohol misristilo el flujo obtenido es menor. También se puede observar que, de los 5 promotores utilizados para este estudio, el decanol presenta una mayor concentración en estado de equilibrio estacionario ($C_{ee} = 0,03163 \mu\text{g/ml}$), con un tiempo de latencia (Tl) de 16,93 h.

Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía, concretan que, dentro del grupo de los alcoholes, los compuestos entre 8 y 10 átomos de carbono son los que presentan mayor acción penetrante de los fármacos a través de la piel (Domenech y col., 1998).

4.5.2.3 Permeación transdérmica de formulaciones al 5% de cetirizina diclorhidrato con 10% diferentes promotores

4.5.2.3.1 Cantidades permeadas de cetirizina diclorhidrato

Las tablas 4.39 a 4.44 muestran las cantidades permeadas acumuladas (μg) en cada tiempo de muestreo (h) para los distintos replicados (Q) de las formulaciones de cetirizina diclorhidrato con diferentes promotores (**limoneno, escualeno, cineol, nonano, azona y decanol**), obtenidos en el estudio de permeación a través de piel humana. Se acompaña, además, la media, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana, mínimo y máximo, obtenidos para cada tiempo de toma de muestra.

En las figuras 4.18 a 4.23 se representan las cantidades permeadas acumuladas (μg) en función del tiempo (h) para cada replicado en cada una de las formulaciones.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.39. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **limoneno** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estandar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
5	8,550	*	*	11,946	*	9,488
10	12,307	*	8,085	42,428	15,031	12,535
13	14,066	*	14,850	84,378	24,407	16,015
16	19,344	9,676	19,652	122,832	38,882	23,100
20	25,041	11,575	26,970	131,004	64,244	32,393
24	41,991	18,952	51,248	262,218	105,411	60,197
27	55,450	24,514	70,542	369,414	138,866	69,656
30	64,088	28,093	*	*	159,201	92,630
33	76,321	38,512	77,657	*	197,906	*
36	87,555	37,620	102,443	552,199	232,799	121,738
Tiempo (h)	Media	DE	CV (%)	Mediana	Máximo	Mínimo
5	9,994	1,754	17,547	9,488	11,946	8,550
10	18,077	13,839	76,557	12,535	42,428	8,085
13	30,743	30,267	98,452	16,015	84,378	14,066
16	38,914	42,193	108,425	21,376	122,832	9,676
20	48,538	44,026	90,705	29,681	131,004	11,575
24	90,003	89,038	98,928	55,723	262,218	18,952
27	121,407	127,135	104,718	70,099	369,414	24,514
30	86,003	55,485	64,515	78,359	159,201	28,093
33	97,599	69,290	70,994	76,989	197,906	38,512
36	189,059	189,238	100,095	112,090	552,199	37,620

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

Tabla 4.40. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **escualeno** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estandar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
5	*	1,465	3,836	2,265	13,238	13,156
10	*	1,764	8,227	3,325	25,194	20,264
13	*	1,989	13,732	4,451	31,043	38,062
16	*	2,550	22,695	4,890	40,495	79,312
20	*	2,798	40,187	*	51,802	120,272
24	*	3,608	62,308	11,784	89,594	*
27	*	3,973	*	15,619	112,353	217,988
30	*	*	*	*	138,552	*
33	*	6,562	*	19,583	144,947	*
36	*	9,034	*	38,438	168,616	372,318
Tiempo (h)	Media	DE	CV (%)	Mediana	Máximo	Mínimo
5	6,219	5,469	87,939	3,594	13,238	1,465
10	10,504	9,831	93,593	6,239	25,194	1,764
13	15,691	15,305	97,542	9,300	38,062	1,989
16	29,988	31,540	105,175	22,695	79,312	2,550
20	53,765	49,020	91,176	45,994	120,272	2,798
24	35,107	38,623	110,015	11,784	89,594	3,608
27	71,994	92,988	129,161	15,619	217,988	3,973
30	74,843	90,099	120,385	74,843	138,552	11,133
33	46,369	65,936	142,199	16,983	144,947	6,562
36	147,101	165,384	112,429	103,527	372,318	9,034

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.41. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **cineol** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estandar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
4	*	*	*	*	*	*
8	*	*	*	*	*	*
12	*	*	*	*	*	*
16	*	*	*	*	*	*
20	14,468	10,455	43,175	67,308	8,473	52,703
24	15,734	12,345	62,593	206,333	11,829	93,417
28	27,190	16,997	111,562	294,210	17,861	218,743
32	*	28,976	185,987	371,788	*	286,581
36	42,325	*	246,092	464,179	52,726	302,494
Tiempo (h)	Media	DE	CV (%)	Mediana	Máximo	Mínimo
4	*	*	*	*	*	*
8	*	*	*	*	*	*
12	*	*	*	*	*	*
16	*	*	*	*	*	*
20	32,764	24,987	76,264	28,822	67,308	8,473
24	67,042	75,882	113,186	39,163	206,333	11,829
28	114,427	118,017	103,137	69,376	294,210	16,997
32	218,333	147,319	67,474	236,284	371,788	28,976
36	221,563	177,937	80,310	246,092	464,179	42,325

*Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

Tabla 4.42. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **nonano** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
4	*	*	*	*	*	3,22686
8	4,109	4,462	17,063	3,190	*	4,12989
12	6,382	5,119	22,250	3,458	*	10,59967
16	8,621	6,851	*	4,600	7,612	18,79924
20	9,927	*	39,027	6,360	10,026	27,64073
24	13,503	*	*	*	5,042	44,94718
28	18,507	13,459	66,022	*	4,651	55,62064
32	28,971	*	86,838	19,378	*	80,9115
36	*	*	119,693	25,955	*	85,40704
Tiempo (h)	Media	DE	CV (%)	Mediana	Máximo	Mínimo
4	3,227	*	*	3,227	3,227	3,227
8	6,591	5,873	89,113	4,130	17,063	3,190
12	9,562	7,569	79,163	6,382	22,250	3,458
16	9,297	5,514	59,314	7,612	18,799	4,600
20	18,596	14,121	75,932	10,026	39,027	6,360
24	21,164	21,027	99,350	13,503	44,947	5,042
28	31,652	27,334	86,359	18,507	66,022	4,651
32	54,025	34,774	64,367	54,941	86,838	19,378
36	77,018	47,429	61,581	85,407	119,693	25,955

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.43. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **azona** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estandar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
5	2,81	3,577	1,856	2,417	*	7,295
10	4,40	5,929	5,227	6,010	2,468	13,285
13	13,94	8,994	30,516	6,879	4,587	21,205
16	*	13,532	*	25,136	5,036	35,629
20	28,350	22,754	65,487	*	10,898	47,485
24	*	26,693	82,017	33,148	11,629	64,253
27	57,220	*	*	43,847	17,250	75,725
30	70,715	28,760	*	84,745	23,356	84,575
33	82,354	*	122,809	92,210	32,864	95,952
36	*	36,210	136,347	145,565	*	108,35459
Tiempo (h)	Media	DE	CV (%)	Mediana	Máximo	Mínimo
5	3,592	2,163	60,223	2,813	7,295	1,856
10	6,220	3,699	59,480	5,578	13,285	2,468
13	14,354	9,882	68,849	11,468	30,516	4,587
16	19,833	13,370	67,413	19,334	35,629	5,036
20	34,995	21,567	61,628	28,350	65,487	10,898
24	43,548	28,808	66,153	33,148	82,017	11,629
27	48,511	24,600	50,710	50,534	75,725	17,250
30	58,430	30,156	51,609	70,715	84,745	23,356
33	85,238	32,887	38,583	92,210	122,809	32,864
36	106,619	49,534	46,459	122,351	145,565	36,210

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

Tabla 4.44. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **decanol** como promotor. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
4	5,378	4,937	*	*	5,517	*
8	39,883	20,119	3,618	5,226	22,304	*
12	87,890	78,545	9,370	8,408	52,538	*
16	*	149,847	19,703	12,499	86,952	*
20	*	*	43,365	21,208	187,061	*
24	188,251	*	68,633	32,879	228,670	*
28	*	*	130,721	45,484	286,155	*
32	*	*	160,252	86,734	355,957	*
36	*	*	203,504	112,309	427,111	*
Tiempo (h)	Media	DE	CV (%)	Mediana	Máximo	Mínimo
4	5,277	0,303	5,741	5,378	5,517	4,937
8	18,230	14,761	80,973	20,119	39,883	3,618
12	47,350	37,425	79,039	52,538	87,890	8,408
16	67,250	64,469	95,865	53,328	149,847	12,499
20	83,878	90,043	107,350	43,365	187,061	21,208
24	129,608	93,678	72,278	128,442	228,670	32,879
28	154,120	122,029	79,178	130,721	286,155	45,484
32	200,981	139,156	69,238	160,252	355,957	86,734
36	247,641	161,976	65,407	203,504	427,111	112,309

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

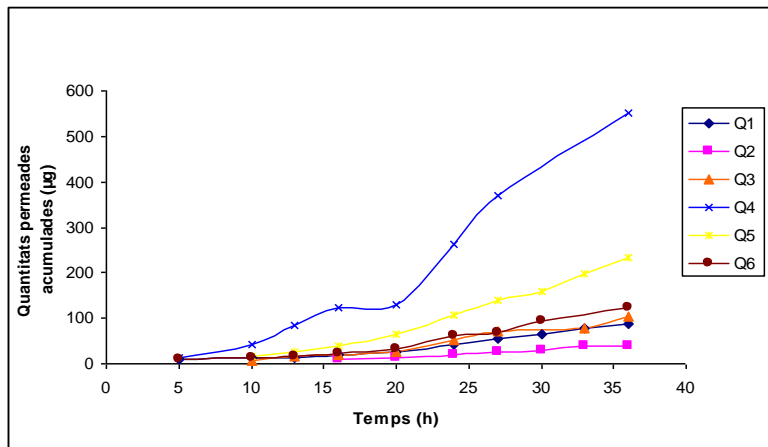


Figura 4.18. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **limoneno** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

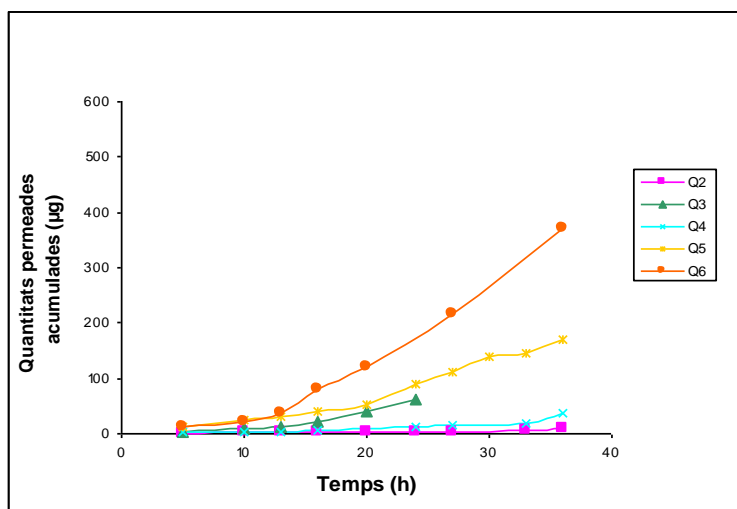


Figura 4.19. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **escualeno** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

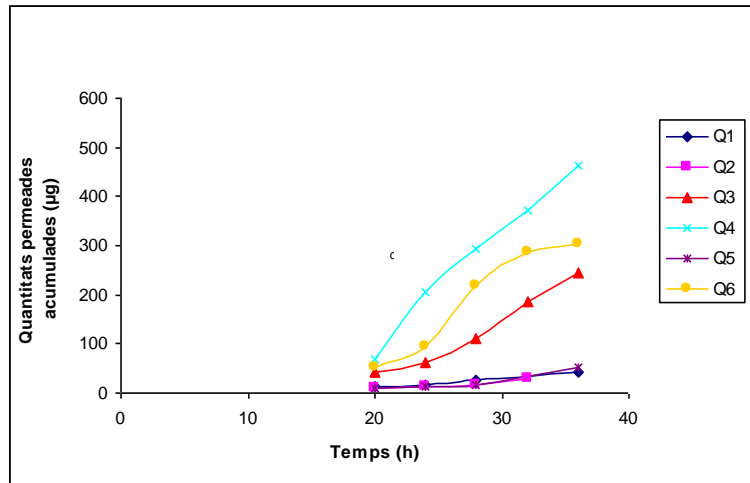


Figura 4.20. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **cineol** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

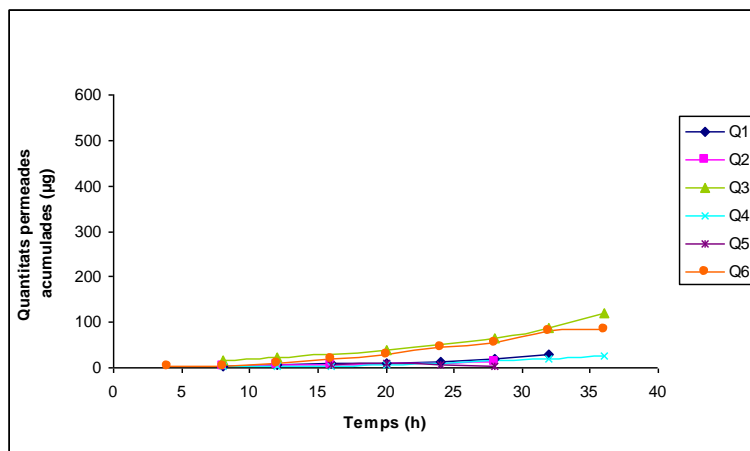


Figura 4.21. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **nonano** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

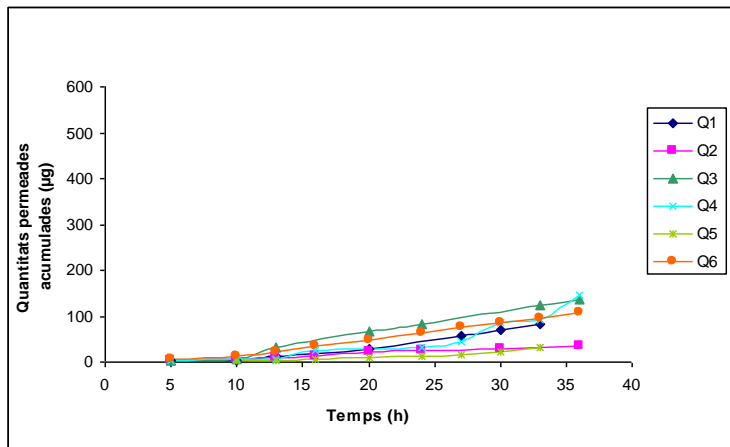


Figura 4.22. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación con **azona** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

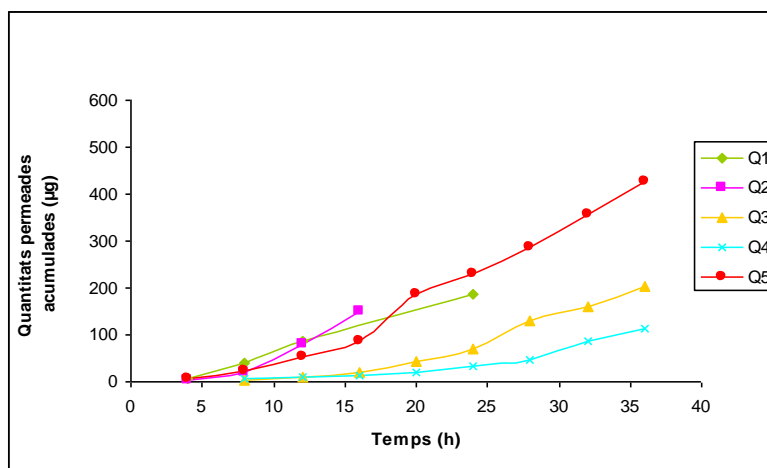


Figura 4.23. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **decanol** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.

4.5.2.3.2 Parámetros de permeación

En las tablas 4.45 a 4.50 se exponen los valores individuales, mediana, mínimo y máximo, de los diferentes parámetros de permeación: P1, P2, coeficiente de permeabilidad (Kp), flujo (J), período de latencia (Tl), entre otros, obtenidos para cada emulsión de cetirizina diclorhidrato formuladas con cada uno de los promotores ensayados.

Tabla 4.45. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **limoneno** como promotor.

Parámetros LAPLACE	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,002269	0,001255	0,002782	0,018120	0,009767	0,004250	0,003516	0,018120	0,001255
P2 (1/h)	0,012900	0,011470	0,012340	0,011240	0,009607	0,010770	0,011350	0,012900	0,009607
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000029	0,000014	0,000034	0,000204	0,000094	0,000046	0,000040	0,000204	0,000014
Tl (h)	12,920000	14,530000	13,510000	14,830000	17,350000	15,470000	14,680000	17,350000	12,920000
J (µg/h)	1,463000	0,719500	1,716000	10,180000	4,691000	2,289000	2,002000	10,180000	0,719500
J Laplace (µg/h)	3,700000	1,800000	4,300000	24,900000	9,900000	5,800000	5,050000	24,900000	1,800000
Cee (µg/ml)	0,004624	0,002250	0,005374	0,031120	0,012370	0,007249	0,006312	0,031120	0,002250

Tabla 4.46. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **escualeno** como promotor.

Parámetros LAPLACE	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,000107	0,004664	0,004134	0,003324	0,012230	0,004134	0,012230	0,000107
P2 (1/h)	0,020320	0,010570	0,005610	0,015700	0,011260	0,011260	0,020320	0,005610
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000002	0,000049	0,000023	0,000052	0,000138	0,000049	0,000138	0,000002
Tl (h)	8,200000	15,770000	29,710000	10,610000	14,800000	14,800000	29,710000	8,200000
J (µg/h)	0,108200	2,464000	1,159000	2,610000	6,890000	2,464000	6,890000	0,108200
J Laplace (µg/h)	0,269400	6,197000	2,899000	6,597000	16,980000	6,197000	16,980000	0,269400
Cee (µg/ml)	0,000337	0,007745	0,003623	0,008245	0,021220	0,007745	0,021220	0,000337

* Valores de Q1 no considerados debido a falta de integridad de la piel.

Tabla 4.47. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **cineol** como promotor.

Parámetros LAPLACE	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,001832	0,003098	0,052930	0,039340	0,024180	0,113800	0,031760	0,113800	0,001832
P2 (1/h)	0,012100	0,006577	0,004526	0,006778	0,003462	0,004148	0,005551	0,012100	0,003462
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000022	0,000020	0,000240	0,000267	0,000084	0,000472	0,000162	0,000472	0,000020
Tl (h)	13,770000	25,340000	36,830000	24,590000	48,130000	40,180000	31,080000	48,130000	13,770000
J (µg/h)	1,109000	1,019000	11,980000	13,330000	4,187000	23,610000	8,082000	23,610000	1,019000
J Laplace (µg/h)	1,800000	2,500000	29,050000	33,040000	9,910000	57,070000	19,480000	57,070000	1,800000
Cee (µg/ml)	0,002250	0,003125	0,036310	0,041290	0,012390	0,071330	0,024350	0,071330	0,002250

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.48. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **nonano** como promotor.

Parámetros LAPLACE	Q1	Q2	Q3	Q4	Q6	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,000608	0,000002	0,001963	0,000996	0,003005	0,000996	0,003005	0,000002
P2 (1/h)	0,015450	1,529000	0,016700	0,009956	0,011060	0,015450	1,529000	0,009956
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000009	0,000004	0,000033	0,000010	0,000033	0,000010	0,000033	0,000004
Tl (h)	10,790000	0,109000	9,979000	16,740000	15,080000	10,790000	16,740000	0,109000
J (µg/h)	0,469800	0,185100	1,639000	0,495600	1,661000	0,495600	1,661000	0,185100
J Laplace (µg/h)	1,180000	0,470000	4,100000	1,200000	4,110000	1,200000	4,110000	0,470000
Cee (µg/ml)	0,001475	0,000587	0,005124	0,001500	0,005137	0,001500	0,005137	0,000587

*Valores de Q5 no considerados por aberrante.

Tabla 4.49. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **azona** como promotor.

Parámetros LAPLACE	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,003186	0,000178	0,001862	0,053850	0,002704	0,001244	0,002283	0,053850	0,000178
P2 (1/h)	0,011040	0,050480	0,020890	0,003671	0,007121	0,023600	0,015970	0,050480	0,003671
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000035	0,000009	0,000039	0,000198	0,000019	0,000029	0,000032	0,000198	0,000009
Tl (h)	15,090000	3,301000	7,977000	45,400000	23,400000	7,062000	11,530000	45,400000	3,301000
J (µg/h)	1,760000	0,449600	1,945000	9,885000	0,962800	1,468000	1,614000	9,885000	0,449600
J Laplace (µg/h)	4,400000	1,100000	4,900000	23,040000	2,400000	3,700000	4,050000	23,040000	1,100000
Cee (µg/ml)	0,005499	0,001375	0,006124	0,028800	0,003000	0,004624	0,005062	0,028800	0,001375

Tabla 4.50. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **decanol** como promotor.

Parámetros LAPLACE	Q1	Q2	Q4	Q5	Q6	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,001297	0,001114	0,018240	0,020680	0,008745	0,008745	0,020680	0,001114
P2 (1/h)	0,054950	0,059020	0,006572	0,004787	0,015240	0,015240	0,059020	0,004787
Kp=P1xP2 (cm/h)	0,000071	0,000066	0,000120	0,000099	0,000133	0,000099	0,000133	0,000066
Tl (h)	3,033000	2,824000	25,360000	34,820000	10,930000	10,930000	34,820000	2,824000
J (µg/h)	3,564000	3,286000	5,994000	4,950000	6,665000	4,950000	6,665000	3,286000
J Laplace (µg/h)	9,050000	8,340000	15,000000	12,570000	16,810000	12,570000	16,810000	8,340000
Cee (µg/ml)	0,011310	0,010420	0,018750	0,015710	0,021010	0,015710	0,021010	0,010420

*Valores de Q3 no considerados debido a falta de integridad de la piel.

4.5.2.3.3 Tratamiento estadístico

Se han comparado estadísticamente los parámetros de permeación, obtenidos tras el estudio de permeación a través de piel humana, de las formulaciones con cetirizina diclorhidrato al 5% con diferentes promotores, mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis que proporciona el programa SPSS, según lo expuesto en el apartado 3.2.6.1 de material y métodos. En la tabla 4.51 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.51. Tratamiento estadístico de los parámetros LAPLACE entre las diferentes formulaciones de cetirizina con diferentes promotores.

	P1	P2	Kp	Tl	J	Cee
Chi-Cuadrado	9,548	7,897	10,358	7,897	10,159	10,159
gl	5	5	5	5	5	5
Sig. asintót.	,089	,162	,066	,162	,071	,071

Estadísticas de contraste (a, b)

- a. Prueba de Kruskal-Wallis
- b. Variable de agrupación: Formulación

Mediante este análisis estadístico no se han puesto de manifiesto diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.52. Tabla resumen de la mediana de los parámetros de permeación LAPLACE de las formulaciones de cetirizina diclorhidrato con diferentes promotores.

Formulación de cetirizina con promotor	Parámetros (Mediana)					
	P1 (cm)	P2 (1/h)	Kp (cm/h)	TI (h)	J (µg/h)	Cee (µg/ml)
Limoneno	0,003515771	0,011353631	0,000040048	14,68	5,0500	0,006311711
Escualeno	0,004133873	0,011264753	0,000049280	14,79	6,1970	0,007745282
Cineol	0,031762394	0,005551228	0,000161639	31,08	19,4800	0,024346957
Nonano	0,000995562	0,01544797	0,000009912	10,79	1,2000	0,001499813
Azona	0,002283104	0,015969096	0,000032273	11,53	4,05000	0,005061867
Decanol	0,008744754	0,015243609	0,000098999	10,93	12,5700	0,015710536
Sig. Asintót.	0,089	0,162	0,066	0,162	0,071	0,071
Co = 50000 µg/ml						
Cee terapéutic = 0,257 - 0,384 µg/ml						

En el estudio de permeación transdérmica de cetirizina diclorhidrato con diferentes promotores el mayor flujo se obtiene con el cineol (Tabla 4.52). De acuerdo con los valores de P1 y P2 obtenidos para esta formulación, puede deduirse, que la acción del cineol sobre el flujo de la cetirizina, es debido al hecho de que el terpeno aumenta el coeficiente de reparto del fármaco entre el vehículo y los lípidos del estrato córneo, de acuerdo con el valor de P1 obtenido en comparación con el valor de P2. Asimismo, se obtiene una mayor concentración en estado de equilibrio estacionario para el cineol (Cee = 0,002434 µg/ml) con un tiempo de latencia (TI) de 31,08 h.

4.5.2.4 Permeación transdérmica de formulaciones al 5% de cetirizina diclorhidrato con 5% de dimetilsulfóxido y 5% de decanol

De acuerdo con resultados de otras experiencias, se decide potenciar la acción promotora de la formulación de cetirizina con dos promotores (DMSO y decanol) para obtener una posible sinergia entre ambos, debido a que el decanol posee un mayor poder penetrante.

4.5.2.4.1 Cantidades permeadas de cetirizina diclorhidrato

Las cantidades permeadas acumuladas (µg) para cada tiempo de muestreo (h) para los distintos replicados (Q) de las formulaciones de cetirizina diclorhidrato con **dimetilsulfóxido y decanol**,

obtenidos en el estudio de permeación a través de piel humana, se muestran en la tabla 4.53. Se acompaña, además, la media, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana, máximo y mínimo, obtenidos para cada tiempo de toma de muestra.

En la figura 4.24 se representan las cantidades permeadas acumuladas (μg) en función del tiempo (h) para cada replicado de la formulación.

Tabla 4.53. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con **dimetilsulfóxido y decanol**. Se acompaña de las cantidades acumuladas promedio (media), desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%), mediana y los valores máximo y mínimo, obtenidos a cada tiempo de toma de muestra en el estudio de permeación.

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas (μg)					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
2,08	*	11,21	8,91	*	10,30	*
5,17	*	15,19	9,42	*	11,28	*
15,67	*	144,93	74,99	71,61	104,05	78,94
17,67	128,23	179,16	91,11	88,42	146,62	105,12
25,50	192,66	309,36	149,72	151,89	250,49	180,84
28,83	307,41	*	176,74	188,47	276,65	204,35
Tiempo (h)	Media	DE	CV (%)	Mediana	Máximo	Mínimo
2,08	10,14	1,16	11,44	10,30	11,21	8,91
5,17	11,96	2,95	24,63	11,28	15,19	9,42
15,67	94,90	30,74	32,40	78,94	144,93	71,61
17,67	123,11	35,42	28,77	116,67	179,16	88,42
25,50	205,83	62,56	30,40	186,75	309,36	149,72
28,83	230,72	57,85	25,07	204,35	307,41	176,74

* Aberrante o pérdida de muestra (Test de Dixon)

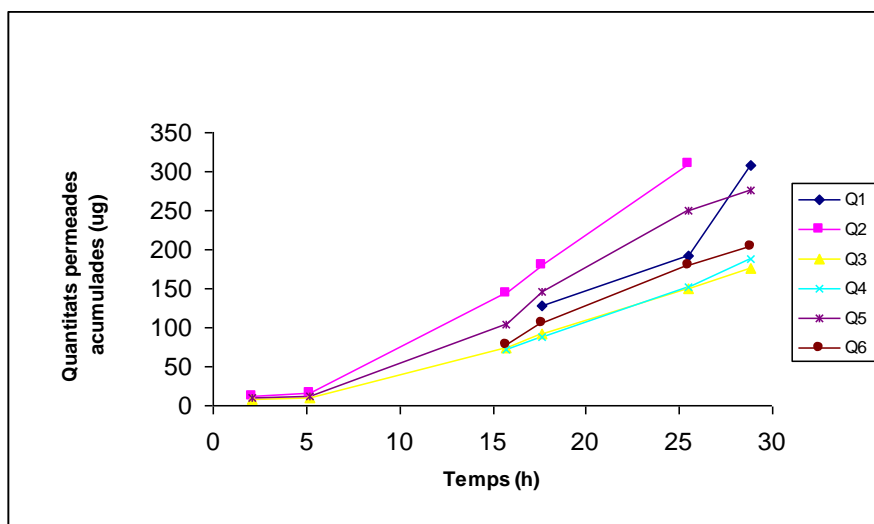


Figura 4.24. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **dimetilsulfóxido y decanol** como promotores, en función del tiempo para cada uno de los replicados.

4.5.2.4.2 Parámetros de permeación

En la tabla 4.54 se exponen los valores individuales, mediana, máximo y mínimo, de los diferentes parámetros de permeación: P1, P2, coeficiente de permeabilidad (Kp), flujo (J), período de latencia (Tl), entre otros, obtenidos para cada emulsión de cetirizina diclorhidrato formuladas con cada uno de los promotores ensayados.

Tabla 4.54. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **dimetilsulfóxido y decanol**.

Parámetros LAPLACE	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Mediana	Máximo	Mínimo
P1 (cm)	0,005995	0,002107	0,002860	0,006325	0,004148	0,004148	0,006325	0,002107
P2 (1/h)	0,022450	0,028480	0,022920	0,018760	0,019990	0,022450	0,028480	0,018760
Kp=P1xP2(cm/h)	0,000135	0,000060	0,000066	0,000119	0,000083	0,000083	0,000135	0,000060
Tl (h)	7,424000	5,851000	7,271000	8,885000	8,337000	7,424000	8,885000	5,851000
J (µg/h)	6,730000	3,001000	3,277000	5,932000	4,146000	4,146000	6,730000	3,001000
J Laplace (µg/h)	17,090000	7,624000	8,324000	15,060000	10,530000	10,530000	17,090000	7,624000
Cee (µg/ml)	0,021360	0,009528	0,010400	0,018830	0,013160	0,013160	0,021360	0,009528

Tabla 4.55. Mediana de los parámetros de permeación LAPLACE de la formulación de cetirizina diclorhidrato con dimetilsulfóxido y decanol.

Formulación de cetirizina diclorhidrato con promotores	Parámetros (Mediana)					
	P1 (cm)	P2 (1/h)	Kp (cm/h)	Tl (h)	J (µg/h)	Cee (µg/ml)
Dimetilsulfóxido y decanol	0,004147896	0,022449866	0,000082917	7,42	10,529391300	0,013160094
Co = 50000 µg/ml						
Cee terapéutico = 0,257 - 0,384 µg/ml						

Como se observa en la tabla 4.55, con la combinación de estos dos promotores se consigue un mayor flujo ($J = 10,529 \mu\text{g/h}$), que utilizando otros promotores de la permeación de cetirizina, no obstante, sigue siendo un flujo más bajo si se compara con la formulación que sólo lleva Decanol como promotor ($J = 25,3117 \mu\text{g/h}$).

Si se compara el flujo de la formulación de cetirizina sin promotor ($J = 2,84 \mu\text{g/h}$), con las formulaciones que sí llevan promotor, se puede observar que se obtienen flujos más bajos para las formulaciones con las pirrolidonas, excepto con la octilpirrolidona, comprobándose una actividad promotora linealmente creciente con la longitud de la cadena alquílica (hasta la n-octilderivado). También se obtienen flujos más bajos con el alcohol miristilo y con el nonano como promotor.

De acuerdo con los resultados obtenidos de todos los estudios realizados de la permeación transdérmica de cetirizina diclorhidrato con diferentes promotores, se ha encontrado que se obtiene un mayor flujo para la formulación con DECANOL como promotor, esto es debido a la capacidad que tiene este promotor de extraer lípidos del estrato córneo, facilitando un aumento de la difusión del fármaco a través de la piel (Sinha y Kaur, 2000); aunque no se consigue llegar a concentraciones terapéuticas con ninguno de los promotores utilizados a lo largo del presente trabajo.

4.5.2.5 Permeación transdérmica de un hidrogel y una nanoemulsión al 5% de cetirizina diclorhidrato

Las cantidades permeadas acumuladas de cetirizina para la nanoemulsión se pueden observar en la figura 4.25. No se detectaron concentraciones de cetirizina en el compartimento receptor de la formulación del hidrogel, en cualquier caso, los parámetros de permeación podrían ser estimados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Solamente la nanoemulsión de cetirizina penetró a través de la piel después de 19 h aproximadamente desde la aplicación tópica. En dicha figura se puede observar una relación casi lineal entre las cantidades acumuladas de cetirizina (%) frente al tiempo.

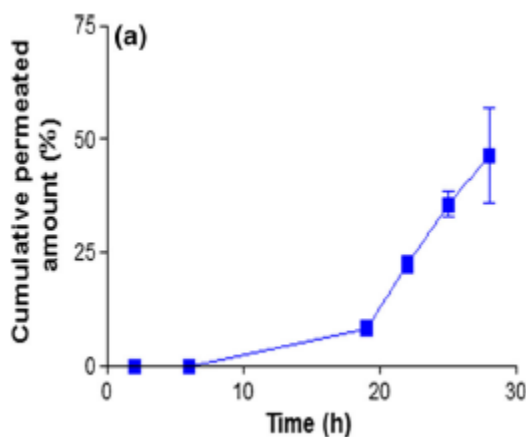


Figura 4.25. Cantidades permeadas acumuladas de la nanoemulsión de cetirizina a través de piel humana bajo condiciones ex vivo, en función del tiempo (n = 6).

A pesar de lo antes explicado, el flujo, el tiempo de latencia y el coeficiente de permeabilidad de la nanoemulsión de cetirizina resultaron ser bajos, como se muestra en la tabla 4.56. Teniendo en cuenta cantidades de aclaramiento plasmático de cetirizina (CLp) de 53 ml/min, y suponiendo un área de aplicación de 16 cm² de piel, el nivel plasmático promedio de 0,060 µg/ml se predijo a ser alcanzado. Pequeñas cantidades de la dosis tópica aplicada son absorbidas y las concentraciones séricas están significativamente por debajo del rango terapéutico (0,257-0,384 µg/ml). Parece que la aplicación tópica de cetirizina es óptima sólo para un efecto de aplicación local.

Tabla 4.56. Parámetros de permeación transdérmica de la nanoemulsión de cetirizina al 5%	
J (µg/cm/h)	4,01
Tl (h)	16,52
Kp (cm/h)	0,000263

Los resultados de este estudio permitieron la realización del artículo: *“Semisolid formulations containing cetirizine: human skin permeation and topical antihistaminic evaluation in a rabbit model”* publicado en la revista Arch Dermatol Res. 2014 Oct; 306 (8): 711-7 (ANEXO).

4.6 ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DEL HIDROGEL Y LA NANOEMULSIÓN DE CETIRIZINA DICLORHIDRATO IN VITRO

Se realizaron estudios de liberación de cetirizina diclorhidrato de hidrogeles y nanoemulsiones (sin promotor) al 5% de cetirizina según lo descrito en el apartado 3.2.7 del capítulo de Material y Métodos.

Los perfiles de liberación de cetirizina se muestran en la figura 4.26. Como era de esperar, la velocidad significativamente más alta de liberación del antihistamínico fue observada para la solución control. Más del 60% de la droga fue liberada a los 60 minutos y completada en 120 minutos.

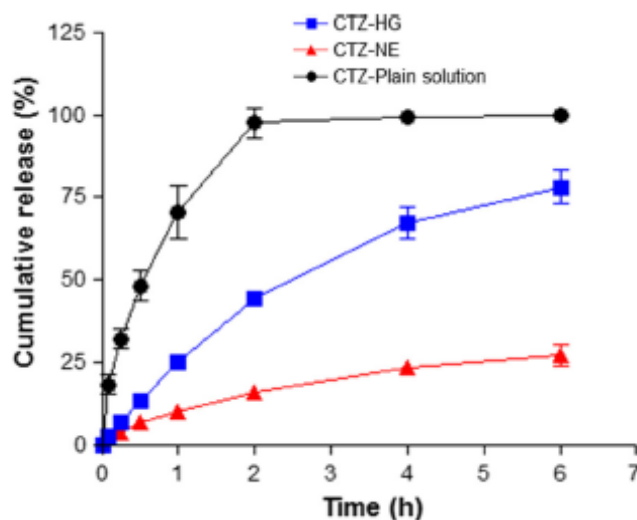


Figura 4.26. Perfiles de liberación para el hidrogel cetirizina (CTZ-HG), nanoemulsión de cetirizina (CTZ-NE) y para la solución control de cetirizina.

La velocidad de liberación de cetirizina para las nanoemulsiones fueron estadísticamente más bajas cuando se compararon con los hidrogeles ($P < 0,05$). Ambos vehículos proporcionaron una liberación sostenida de cetirizina diclorhidrato, siendo los hidrogeles los más adecuados, ya que se alcanzó un 75% de droga liberada en 6 horas. Podría ser debido a la alta capacidad de hinchamiento de la hidroxietil celulosa, que tiene un efecto significativo en la cinética de liberación de un fármaco incorporado (Siepmann y col., 2001). El ajuste del modelo, de acuerdo con la información de criterios

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de valores de mínimos de Akaike de 41,34 y 32,84 para el hidrogel y nanoemulsión, respectivamente, mostraron que ambas formulaciones siguieron estadísticamente un modelo de liberación Korsmeyer-Peppas [$Mt/M_{\infty}=K \times t^n$] describiendo la dependencia exponencial de la cantidad de liberación de fármaco (Mt/M_{∞}) en el tiempo (t).

Las constantes de liberación (k) fueron $22,42 \pm 3,1 \text{ h}^{-1}$ (% CV = 13,82) y $9,4 \pm 1,67 \text{ h}^{-1}$ (% CV = 18,44) para el hidrogel y nanoemulsión, respectivamente. En este modelo n puede ser utilizado para obtener información importante sobre el mecanismo de liberación difusional de un fármaco desde un dispositivo polimérico en el caso del hidrogel, $n = 0,73 \pm 0,09$ (% CV = 12,40) y $n = 0,63 \pm 0,12$ (% CV = 19,89) para la nanoemulsión, ambos indicativos de transporte anómalo intermediado entre la difusión de Fickian y caso-II (es decir, la liberación de orden cero). El mecanismo molecular que prevalece es un acoplamiento de difusión y la relajación macromolecular como resultado de la cual el fármaco se difunde hacia afuera con un comportamiento cinético que es dependiente de la proporción relativa de la difusión y la relajación (Ritger y col., 1987).

4.7 ESTUDIO DE RETENCIÓN DEL HIDROGEL Y DE LA NANOEMULSIÓN DE CETIRIZINA

Para el estudio de retención de cetirizina diclorhidrato en piel humana, se prepararon curvas de calibración en solución reguladora de fosfato a pH 7,4 en un rango de concentraciones de 100 - 1,56 $\mu\text{g/ml}$ con el fin de medir la concentración del fármaco en las muestras de piel y validar la metodología analítica por el sistema HPLC.

La validación inter día de la metodología analítica (n= 6), fue lineal ($P > 0.05$), de acuerdo con la estadística aplicada; precisa y exacta con un porcentaje del coeficiente de variación (CV %) por debajo de 9,95 %, y con un error relativo (%E) inferior a 5,92 %. El límite de detección fue de 1,56 $\mu\text{g/ml}$.

La cantidad de cetirizina retenida en la piel después de 28 horas de tratamiento fue de 39,57 $\mu\text{g/g}$ de piel/ cm^2 para la nanoemulsión y 54,55 $\mu\text{g/g}$ de piel/ cm^2 para el hidrogel, tal como se muestra en la figura 4.27.

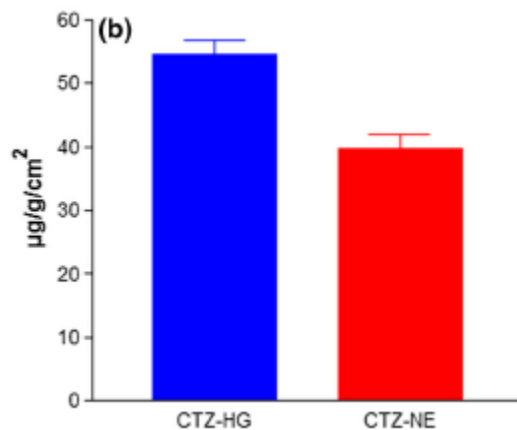


Figura 4.27. Representación gráfica de las cantidades retenidas de cetirizina en piel humana: hidrogel de cetirizina (CTZ-HG) y nanoemulsión de cetirizina (CTZ-NE).

4.8 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIHISTAMÍNICA DE HIDROGELES Y NANOEMULSIONES DE CETIRIZINA DICLORHIDRATO EN CONEJOS MACHOS ALBINOS.

Cetirizina diclorhidrato es un antihistamínico de segunda generación con efectos antihistamínicos de larga duración, por lo tanto, sería un tratamiento efectivo para una gran variedad de afecciones alérgicas (Vlastos D y Stephanou G, 1998). Así mismo, estudios realizados *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* sugieren que la cetirizina tiene numerosas propiedades antialérgicas y antiinflamatorias que parecen ser independientes de su actividad bloqueadora H1 por estabilización de los mastocitos (Assanasen P y Naclerio RM, 2002). Por este motivo la cetirizina ha sido utilizada como tratamiento de elección tanto para el manejo de síntomas de urticaria crónica y piel atópica en niños (Diepgen TL, 2002).

Hasta ahora no existe en el mercado farmacéutico un antihistamínico de segunda generación de uso tópico eficaz, por este motivo, el objetivo principal de esta tesis, es el diseño de dos formas de dosificación tópica (hidrogel y nanoemulsión) conteniendo cetirizina por lo que se procedió a realizar la respectiva evaluación de estas dos fórmulas en conejos.

Después de realizar dicho estudio siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.8, se puede decir que no se observó acción antihistamínica en las áreas que recibieron la formulación control. La relación entre el área de la pápula y el tiempo de extinción de la misma se representa en la Figura 4.28, en la que sólo el control de solución salina estéril se muestra con mayor claridad, debido a que las otras formulaciones se comportan de manera similar; es decir, después de 20 min de aplicación de la formulación control, se pudo observar una obvia supresión del área de la roncha en comparación con las otras formulaciones ensayadas. Aunque estadísticamente no se observaron diferencias entre las formulaciones con cetirizina, se puede observar que el hidrogel demostró el efecto máximo en 30 minutos, considerando AUC0-30 el efecto total como % de reducción, la cual se representa en la Figura 4.29. El antihistamínico comercial, la dexclorfeniramina, exhibió levemente mayor reducción de la pápula que el hidrogel de cetirizina (14,12 y 12,60 %, respectivamente) seguida por dimetindeno maleato (9,02%) y finalmente la nanoemulsión (8,32%) en 30 minutos. El resultado corrobora hallazgos anteriores encontrados en los estudios de permeabilidad de cetirizina en piel humana.

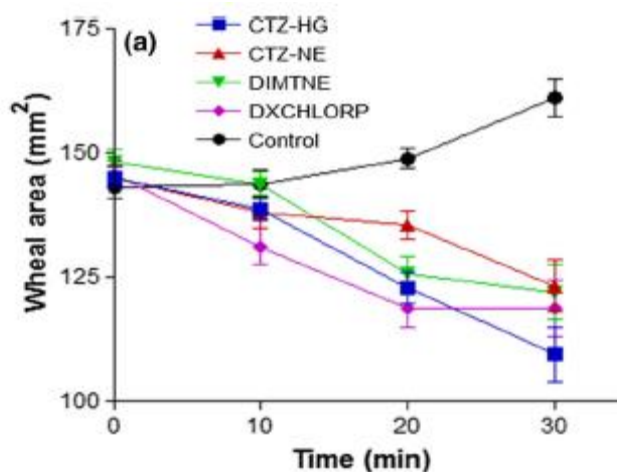


Figura 4.28. Evaluación del área de roncha inducida por la histamina después de la aplicación de las formulaciones ensayadas a diferentes intervalos de tiempo: hidrogel de cetirizina (CTZ-HG), nanoemulsión de cetirizina (CTZ-NE), maleato de Dimetindeno (DIMTNE), dexclorfeniramina (DXCHLORP) y control.

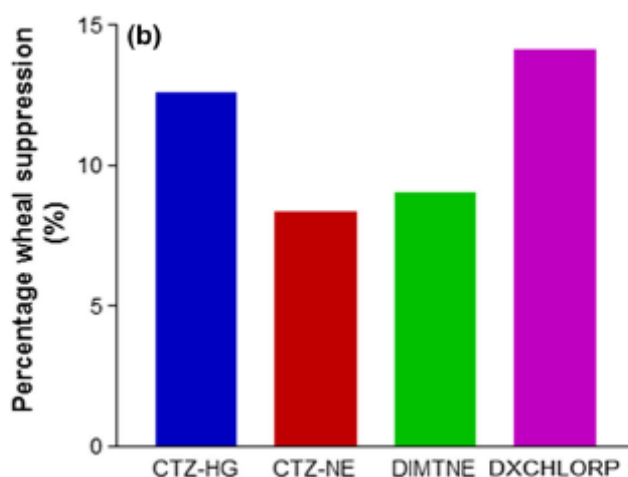


Figura 4.29. Porcentaje de supresión de la roncha inducida por histamina en conejos machos albinos después de la aplicación tópica de las formulaciones ensayadas.

4.9 BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE FORMULACIONES TRANSDÉRMICAS DE CETIRIZINA CON AYUDA DE REDES NEURONALES ARTIFICIALES (RNA)

Es conocido que la permeación transdérmica se puede potenciar aumentando las concentraciones de los promotores químicos, pero este aumento, a menudo causa daños en la piel. Sin embargo, se puede conseguir mediante la optimización de las formulaciones a través de RNA, una combinación óptima de promotores y tensioactivos que no dañen la piel. En este sentido, en 1999 Kozo Takayama y col., realizaron un estudio de absorción percutánea in vivo en ratas, optimizando hidrogeles de ketoprofeno con mentol y con 0-etilmentol, utilizando RNA.

En 2001, Pao-Chu Wu y col. lograron optimizar una formulación de hidrogel de ketoprofeno conteniendo 0-etil-3-butilciclohexanol como promotor de la absorción percutánea.

Las RNA pueden ser muy útiles en muchos aspectos de la investigación farmacéutica, que incluye, farmacocinética, farmacodinámica de modelado, la optimización de los sistemas de dosificación y administración de fármacos (Sutariya y col., 2013).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El nombre de redes neuronales, viene de la idea de **imitar el funcionamiento de las redes neuronales de los organismos vivos**: conjunto de neuronas conectadas entre sí y que trabajan en conjunto, sin que haya una tarea concreta para cada una. Con la experiencia, las neuronas van creando y reforzando ciertas conexiones para "aprender" algo que se queda fijo en el tejido.

Ahora bien, el enfoque biológico no ha sido especialmente útil: las redes neuronales han ido moviéndose para tener un foco en matemáticas y estadística. Se basan en una idea sencilla: dados unos parámetros hay una forma de combinarlos para predecir un cierto resultado. Las redes neuronales permiten buscar la combinación de parámetros que mejor se ajusta a un determinado problema.

Las veintiuna redes obtuvieron un valor similar del error residual (Ecuación 1.12) en el conjunto de entrenamiento, lo que significa que todas ellas tuvieron éxito en aproximar el valor medio de cada variable de salida para cada punto dado del espacio de entradas (esto es, para cada vector de entradas dado en el conjunto de entrenamiento). Sin embargo, las predicciones (salidas) de las veintiuna redes sobre datos de entrada no vistos en el entrenamiento son obviamente diferentes, ya que las redes representan diferentes superficies (de no-linealidad creciente) sobre el espacio de entradas.

En una típica aplicación de las FNNs para aprendizaje supervisado, después de entrenar las redes, existe (como mínimo) un conjunto de test de K ejemplos de prueba $\{(\mathbf{x}_i, \mathbf{t}_i)\} \subset \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^m$, no usados en el conjunto de entrenamiento, con el que se evalúa la predicción o capacidad de generalización de las redes. En el presente caso, sin embargo, no conocemos las salidas (mediciones de las características) correspondientes a otras formulaciones no usadas en el conjunto de entrenamiento. Dicho de otra manera, no tenemos salidas esperadas \mathbf{t}_i disponibles para la fase de test.

Por lo tanto, el objetivo es proponer un cierto número de nuevas formulaciones con composiciones razonables (datos de entrada de test \mathbf{x}_i), aplicar las diferentes redes a \mathbf{x}_i para obtener las correspondientes predicciones de los datos de salida \mathbf{y}_{iz} (esto es, un vector diferente de salida para cada modelo o red z), y seleccionar como formulaciones candidatas aquellas para las que la mayoría de redes coinciden en predecir valores satisfactorios de las variables de salida.

Así se construyó un conjunto de test de 89 vectores de entrada $\mathbf{x}_i \subset \mathbb{R}^{18}$, donde cada \mathbf{x}_i representa la composición de una formulación propuesta en términos de 18 constituyentes (agua, propilenglicol, transcitol, isostearato y los 14 promotores antes mencionados), como en el conjunto de

entrenamiento. Las veintiuna redes entrenadas se aplicaron a las entradas de test para predecir los valores de las cuatro características (J ($\mu\text{g/h}$), Tl (h), Kp (cm/h) y C_{ee} ($\mu\text{g/mL}$)) para cada nueva formulación. A partir de estas predicciones, se seleccionaron siete formulaciones candidatas para las que al menos el 50% de las redes (incluyendo la lineal) predijeron resultados satisfactorios, y en dos de ellas (las más prometedoras) al menos el 75% de las redes coincidieron.

Según lo explicado en el apartado 3.2.9 del capítulo de Material y Métodos, de los datos de las 94 formulaciones elaboradas y caracterizadas en los estudios de permeación transdérmica de cetirizina diclorhidrato, se cogen sólo los datos de 89 formulaciones que llevan promotores. Los resultados de los parámetros predictivos obtenidos de aplicar los modelos de regresión multidimensional haciendo uso de redes neuronales, se muestran en la tabla 4.57.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.57. Parámetros de permeación de las 89 formulaciones de cetirizina diclorhidrato con diferentes promotores.

Fórmula	J ($\mu\text{g/h}$) - LP	Tl (h) - LP	Kp (cm/h) - LP	Cee ($\mu\text{g/mL}$) - LP
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	11,5135	17,7300	0,0001	0,0144
6	0	3,7408	0	0
7	12,4507	12,7324	0,0001	0,0156
8	0	9,3880	0	0
9	0	8,7412	0	0
10	0	2,6633	0	0
11	0	9,8498	0	0
12	0	0	0	0
13	0	2,7181	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	5,4322	22,0240	0	0,0068
19	0	0	0	0
20	49,5650	33,3569	0,0004	0,0619
21	8,1069	18,4920	0	0,0101
22	0	1,9638	0	0
23	16,9709	12,2582	0,0001	0,0212
24	13,6326	18,1790	0,0001	0,0170
25	0	4,2358	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	38,5588	17,6732	0,0004	0,0482
31	0	0,0693	0	0
32	0,5831	18,1185	0	0,0007
33	0	8,6583	0	0
34	0	0	0	0
35	0,0147	11,1014	0	0
36	4,7186	16,0630	0,0001	0,0059
37	0	13,6521	0	0
38	1,5728	9,8721	0	0,0020
39	0	10,8608	0	0
40	0	0	0	0
41	0	13,8364	0	0
42	0	0	0	0
43	0	3,7231	0	0
44	0	0	0	0
45	24,3386	29,0038	0,0003	0,0304
46	0	8,8881	0	0
47	24,4464	11,6439	0,0002	0,0305
48	0	3,5432	0	0
49	3,4534	8,7160	0	0,0043

50	0	7,6602	0	0
51	0	5,5602	0	0
52	0	0	0	0
53	0	0	0	0
54	0	0	0	0
55	10,7413	21,4176	0,0001	0,0134
56	0	0	0	0
57	0	15,6861	0	0
58	0	8,2775	0	0
59	0	1,1238	0	0
60	5,2261	13,0752	0	0,0065
61	0	0	0	0
62	0	0	0	0
63	0	0	0	0
64	0	3,9367	0	0
65	22,3110	36,8069	0,0002	0,0279
66	0	7,3749	0	0
67	0	1,7394	0	0
68	0	0	0	0
69	0	4,8751	0	0
70	0	0	0	0
71	0	9,3036	0	0
72	0	0	0	0
73	0	0	0	0
74	0	0	0	0
75	0	0	0	0
76	0	13,0047	0	0
77	0	7,8695	0	0
78	26,8347	19,7315	0,0002	0,0335
79	0	9,6100	0	0
80	0,2431	8,1864	0	0,0003
81	4,7619	5,5928	0	0,0059
82	0	9,6334	0	0
83	0	19,6869	0	0
84	15,6199	15,7858	0,0001	0,0195
85	0	0	0	0
86	0	0	0	0
87	18,2584	14,8648	0,0002	0,0228
88	0	2,8424	0	0
89	0	5,8576	0	0

5. CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos en el trabajo de investigación realizado en la presente Memoria, se han formulado las siguientes conclusiones:

1. La metodología analítica empleada para cuantificar la cetirizina en las muestras procedentes de los ensayos de permeación, ha resultado ser lineal, exacta y precisa con un error relativo (E%) comprendido entre -6,085 y 3,442; y un coeficiente de variación (CV%) entre 0,145 y 10,04 en el ámbito de concentraciones de 100 – 1,5625 $\mu\text{g/ml}$, con un límite de detección de $0,53 \pm 0,14$ y un límite de cuantificación de $1,60 \pm 0,42$.
2. A partir de las soluciones libres de fármaco (soluciones saturadas), el mayor flujo para la cetirizina se obtiene cuando se formula en forma de diclorhidrato en el solvente etanol/agua (50:50) con $J = 5,1904 \mu\text{g/h}$.
3. El mayor valor de flujo obtenido en el estudio de permeación de cetirizina con diferentes promotores de la permeación se alcanzó para la formulación elaborada con DECANOL como promotor.
4. Las formulaciones elaboradas con diferentes promotores de la permeación no permiten obtener flujos elevados de cetirizina diclorhidrato, por lo que se concluye que estos penetrantes no son apropiados para desarrollar formulaciones destinadas a ser administradas por vía transdérmica y alcanzar concentraciones terapéuticas por vía sistémica.
5. De los 21 modelos de regresión multidimensional por el uso de redes neuronales, 15 dan valores positivos y predicen bien los parámetros de permeación. Estos datos nos servirán para llevar a cabo futuras investigaciones.
6. Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que la nanoemulsión y el hidrogel conteniendo cetirizina fueron elaboradas satisfactoriamente con propiedades óptimas para su aplicación por vía tópica con una acción antihistamínica eficaz cuando se comparó con el maleato de dimetindeno y con la dexclorfeniramina, dos antihistamínicos de primera generación disponibles comercialmente.

6. BIBLIOGRAFÍA

6 BIBLIOGRAFÍA

Acosta E. *Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery*. Current Opinion in Colloid and Interface Science 2009; 14(1):3-15.

AEFI. *Validación de métodos analíticos*. Barcelona: Monografías de AEFI; 2001.

AHFS drug information. American Society of Health-System Pharmacists. Bethesda, Maryland: Staff, cop. 2010.

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

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

Anigbogu ANC, Williams AC, Barry BW, Edwards HGM. *Fourier transform Raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethyl sulfoxide and human stratum corneum*. International Journal Pharmaceutics 1995; 125:265-282.

Araujo FA, Kelmann RG, Araujo BV, Finatto RB, Teixeira HF, Koester LS. *Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide*. Eur J Pharm Sci 2011; 42(3):238-245.

Ashton P, Walters KA, Brain KR, Hadgraft J. *Surfactant effects in percutaneous absorption: II. Effects on protein and lipid structure of stratum corneum*. International Journal Pharmaceutics 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.

6. BIBLIOGRAFÍA

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.

Baroli B, López-Quintela MA, Delgado-Charro MB, Fadda Am, Blanco-Mendez J. *Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen*. J. Control Release 2000; 69: 209-218.

Barry BW. *Drug delivery routes in skin: a novel approach*. Advanced Drug Delivery Reviews 2002; 54(suppl.1): S31-S40.

Barry BW. *Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement*. Journal of controlled release 1991; 15(3):237-248.

Barry BW. *Action of skin penetration enhancers-the Lipid Protein Partitioning theory*. Int J Cosmet Sci 1988; 10(6):281-293.

Barry BW. *Mode of action of penetration enhancers in human skin*. Journal of controlled release 1987; 6:85-97.

Barry BW. *Methods for studying percutaneous absorption* In: Barry BW, editor. Dermatological formulation New York: Marcel Dekker; 1983. p. 234-295.

Bartek MJ, La Budde JA, Maibach HI. *Skin permeability in vivo: comparison in rat, rabbit, pig and man*. Journal of Investigate Dermatology 1972; 58: 114-123.

Basketter D, Darlenski R, Fluhr JW. *Skin irritation and sensitization: mechanisms and new approaches for risk assess-ment*. Skin Pharmacol Physiol 2008; 21:191-202

Beastall JC, Hadgraft J, Washington C. *Mechanism of action of Azone as a percutaneous penetration enhancer: Lipid bilayer fluidity and transition temperature effects*. International journal of pharmaceutics 1988; 43(3):207-213.

Berner B, Juang RH, Mazzenga GC. *Ethanol and water absorption into stratum corneum and model systems*. J Pharm Sci 1989; 78(6):472-476.

Bhatia KS, Singh J. *Percutaneous absorption of LHRH through porcine skin: effect of N-methyl 2-pyrrolidone and isopropyl myristate*. Drug development and industrial pharmacy 1997; 23:1111-1114.

Bishop CM. *Neural networks for pattern recognition*. New York: Oxford University Press Inc. 1995.

Bivas-Benita M, Oudshoorn M, Romeijn S, van Meijgaarden K, Koerten H, van der Meulen H, et al. *Cationic submicron emulsions for pulmonary DNA immunization*. J Control Release 2004; 100(1):145-155.

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*. International journal of pharmaceutics 1993; 98(1-3):93-99.

Bouchard G, Pagliara A, Plemper van Balen G, Carrupt P, Testa B, Gobry V, Girault H, Caron G, Ermondi G, Fruttero R. *Ionic Partition Diagram of the Zwitterionic Antihistamine cetirizine*. Helvetica Chimica Acta, vol. 84, 375-387, 2001.

Bouwstra JA, de Vries MA, Gooris GS, Bras W, Brussee J, Ponc M. *Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier*. Journal of controlled release 1991; 15:209-220.

6. BIBLIOGRAFÍA

Bronaugh RL, Maibach HI. Percutaneous absorption of nitroaromatic compounds: in vivo and in vitro studies in human and monkey skin. *Journal of Investigate Dermatology* 1985; 84: 180-183.

Bronaugh RL, Stewart RF, Congdon ER. Methods for in vitro absorption studies. II. Animal models for human skin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1982; 62: 481-488.

Camacho MA, Torres AI, Gil ME, Obregón M y Ruiz V. Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Practiques* 1993; 3: 197-202.

Cardona Villa, Ricardo; Serrano Reyes, Carlos. *Alergia: abordaje clínico, diagnóstico y tratamiento*. Bogotá: Médica Panamericana, cop. 2010.

Carelli V, Di Colo G, Nannipieri E, Serafini MF. *Enhancement effects in the permeation of alprazolam through hairless mouse skin*. *International journal of pharmaceutics* 1992; 88:89-97.

Catálogo de Medicamentos. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid, 2014.

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.

Challacombe SJ, Rahman D, O'Hagan DT. *Salivary, gut, vaginal and nasal antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles*. *Vaccine* 1997; 15(2):169-175.

Cornwell PA, Barry BW. *The routes of penetration of ions and 5-fluorouracil across human skin and the mechanisms of action of terpene skin penetration enhancers*. *Int J Pharm* 1993; 94: 189-194.

Danielson I, Lindman B. *The definition of a microemulsion*. *Colloid Surf* 1981; 3: 391-392.

Date AA, Nagarsenker MS. *Design and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for cefpodoxime proxetil*. Int J Pharm 2007; 329(1-2):166-172.

Dean SH. *Drug permeation enhancement*. New York: Marcel Dekker ed.; 1994. p. 3-10.

Devarajan V, Ravichandran V. *Nanoemulsions: as modified drug delivery tool Pharmacie Globale (IJCP)* 2011; 4(01).

Diez-Sales O, Watkinson AC, Herraéz-Dominguez M, Javaloyes C, Hadgraft J. *A mechanistic investigation of the in vitro human skin permeation enhancing effect of Azone®*. International journal of pharmaceutics 1996; 129(1):33-40.

Doménech J, Martínez J, Plá JM. *Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen II. Biofarmacia*. Editorial Síntesis, S.A. 1998; 431.

Dreher F, Walde P, Walther P, Wehrli E. *Interaction of lecithin microemulsion gel with human stratum corneum and its effect on transdermal transport*. J Control Release 1997; 45: 131-140.

Djordjevic L, Primorac M, Stupar M, Krajisnik D. *Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug*. Int J Pharm 2004; 271(1-2):11-19.

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.

Elias PM. *Epidermal lipids, barrier function, and desquamation*. J Invest Dermatol 1983; 80 Suppl: 44s-49s.

6. BIBLIOGRAFÍA

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 Tayar N, Tsai RS, Testa B, Carrupt PA, Hansch C, Leo A. *Percutaneous penetration of drugs: a quantitative structure permeability relationship study*. J. Pharm. Sci., 80: 744-749, 1991.

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 AC, 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 Oct;101(10): 3739-52. Doi: 10.1002/jps.23249. Epub 2012 Jul 6.

Février F. *Microemulsions for topical application*. En: 10th Pharmaceutical Technology Conference. 1991. Gattefossé S.A.

Flynn GL. *Physicochemical determinants of skin absorption. In principles of route-to-route extrapolation for risk assessment*. New York: TR Gerrety and CJ Henry, Elsevier, 93-127, 1990.

Franz TJ. *Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data*. J. Invest. Dermatol., 64 (3): 190-195, 1975.

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*. Journal of controlled release 1997; 45:199-206.

Ganta S, Deshpande D, Korde A, Amiji MM. *A review of multifunctional nanoemulsion systems to overcome oral and CNS drug delivery barriers*. Mol Membr Biol 2010; 27(7):260-273.

Gao S, Singh J. *Mechanism of transdermal transport of 5-fluorouracil by terpenes: carvone, 1,8-cineole and thymol*. International journal of pharmaceutics 1999; 154(1):67-77.

Goindi S, Kumar G, Kumar N, Kaur A. *Development of novel elastic vesicle-based topical formulation of cetirizine dihydrochloride for treatment of atopic dermatitis*. AAPS PharmSciTech. 2013 Dec; 14(4):1284-93.

Goindi S, Dhatt B, Kaur A. *Ethosomes-based topical delivery system of antihistaminic drug for treatment of skin allergies*. J. Microencapsul. 2014; 31(7):716-24. Doi: 10.3109/02652048.2014.918667. Epub 2014 Jun 25.

Gonzalez-Mira E, Nikolic S, Garcia ML, Egea MA, Souto EB, Calpena AC. *Potential use of nanostructured lipid carriers for topical delivery of flurbiprofen*. J Pharm Sci 2011; 100(1):242-251.

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*. Journal of Pharmacy and Pharmacology 1986; 38:71-79.

Grafourian T, Fooladi S. *The effect structural QSAR parameters on skin permeation*. Int. J. Pharm., 217: 1-11, 2001.

Grammer, Leslie; Greenberger, Paula. *Patterson enfermedades alérgicas*. Séptima edición. Madrid: Aula Médica, cop. 2011.

Grimmes S. *Pathways of ionic flow through human skin in vivo*. Acta Derm Venereol (Stockh) 1984; 64: 93-98.

Guglielmini G. *Nanostructured novel carrier for topical application*. Clin Dermatol 2008; 26(4):341-346.

6. BIBLIOGRAFÍA

Hadgraft J, Valenta C. *pH, pKa and dermal delivery*. Int J Pharm 2000; 200: 243-247.

Harrison SM, Barry BW, Dugard PH. *Effects of freezing on human skin permeability*. J Pharm Pharmacol 1984; 36: 261-262.

Hearnden V, Sankar V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr AR, et al. *New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease*. Advanced Drug Delivery Reviews 2012; 64(1):16-28.

Heisig M, Lieckfeldt R, Wittum G, Mazurkevich G, Lee G. *Non steady-state descriptions of drug permeation through stratum corneum. The biphasic brick and mortar model*. Pharm Res 1996; 13: 421-426.

Higuchi T. *Physical chemical analysis of percutaneous absorption from creams and ointments*. J. Soc. Cosmet. Chem., 11: 85-97, 1960.

Ho HO, Chen LC, Chiang HS, Spur BP, Wong PK, Sheu MT. *The percutaneous delivery of prostaglandin E-1 carried by microemulsion System*. Proc Control Release Soc 1998: 579-580.

ICH: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: *Stability testing of new drug substances and products (Q12A)*. 2003. <http://www.ich.org/guidelines>.

Izquierdo P, Feng J, Esquena J. *The influence of surfactant mixing ratio on nanoemulsion formation by the PIT method*. Journal of colloid and interface science 2005; 285:388-394.

Idson B. *Percutaneous absorption*. Journal of pharmaceutical sciences 1975; 64(6):901-924.

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.

Jadoul A, Hanchard C, Thysman S, Preat V. *Quantification and localization of fentanyl and TRH delivered by iontophoresis in the skin*. International journal of pharmaceutics 1995; 120:221-228.

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.

Jones, DS, Woolfson, AD, Brown, AF. *Textural analysis and flow rheometry of novel, bioadhesive antimicrobial oral gels*. Pharm. Res. 1997; 14:450–457.

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.

Kelmann RG, Kuminek G, Teixeira HF, Koester LS. *Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process*. Int J Pharm 2007; 342(1-2):231-239.

Kemken J, Ziegler, Müller BW. *Influence of supersaturation on the pharmacodynamics effect of bupranolol after dermal administration using microemulsions as vehicle*. Pharm Res 1992; 9: 554-558.

6. BIBLIOGRAFÍA

Kim CK, Kim JJ, Chi SC, Schim CK. *Effect of fatty acids and urea on the penetration of ketoprofen through rat skin*. International journal of pharmaceutics 1993; 99:109-118.

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*. International journal of pharmaceutics 1992; 80:17-31.

Kim MK, Lee CH, Kim DD. *Skin permeation of testosterone and its ester derivatives in rats*. J Pharm Pharmacol 2000; 52(4):369-375.

Klang V, Matsko NB, Valenta C, Hofer F. *Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assessment*. Micron 2012; 43(2-3):85-103.

Kligman AM, A biological brief on percutaneous absorption. Drug Dev Industr Pharm 1983; 9: 521-560.

Kogan A, Garti N. *Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles*. Adv Colloid Interface Sci 2006; 123-126:369-385.

Komata Y, Inaoka M, Kaneko A, Fujie T. *In vitro percutaneous absorption of thiamine disulfide from a mixture of propylene glycol and fatty acid*. Journal of pharmaceutical sciences 1992; 81(8):744-746.

Korsgren M, Andersson M, Borgå O, Larsson L, Aldén-Raboisson M, Malmqvist U, Greiff L. *Clinical efficacy and pharmacokinetic profiles of intranasal and oral cetirizine in a repeated allergen challenge model of allergic rhinitis*. Ann Allergy Asthma Immunol. 2007 Apr; 98(4):316-21.

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.

Kreilgaard M. *Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery.* Advanced drug delivery reviews 2002; 54 Suppl 1: S77-98.

Kreilgaard M. *Dermal pharmacokinetics of microemulsion formulations determined by in vivo microdialysis.* Pharm Res 2001; 18(3):367-373.

Kumar M, Misra A, Pathak K. *Formulation and characterization of nanoemulsion of olanzapine for intranasal delivery.* PDA J Pharm Sci Technol 2009; 63(6):501-511.

Kumar M, Misra A, Babbar AK, Mishra AK, Mishra P, Pathak K. *Intranasal nanoemulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone.* Int J Pharm 2008; 358(1-2):285-291.

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.

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.

Lawrence MJ, Rees GD. *Microemulsion-base media as novel drug delivery systems.* Adv Drug Deliv Rev 2000; 45: 89-91.

Leahy DE et al. *QSAR: rational approaches to the design of bioactive compounds.* New York: Elsevier, 75-82, 1991.

6. BIBLIOGRAFÍA

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.

Lippold BC. *How to optimize drug penetration through the skin*. Pharm Acta Helv 1992; 67(11): 294-300.

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.

Liu J, Huang X, Lu L, Li M, Xu J, Deng H. *Turbiscan Lab® Expert analysis of the biological demulsification of a water-in-oil emulsion by two biodemulsifiers*. J Hazard Mater. 2011; 190 (1-3): 214-21.

Lüllman, Heinz ; Mohr, Klaus; Hein, Lutz. *Farmacología: texto y atlas*. 6ª edición. Madrid: Médica Panamericana, cop. 2010.

Magnolis SA, Levenson M. *Certification by Karl Fischer method of the water content in SRM 2890, water satures 1-octanol, an analysis of associated interlaboratory bias in the measurement process*. J. Anal Chem 2000; 367: 1-7.

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.

Matich, DJ. *Redes Neuronales: Conceptos básicos y aplicaciones*. Cátedra de Informática Aplicada a la Ingeniería de Procesos–Orientación I, 2001.

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*. International journal of pharmaceutics 1995; 116:101-112.

Méndez de Inocencio, Julia; Huerta, José; Bellanti, Joseph; Ovilla, Roberto; Escobar, Alejandro. *Alergia: enfermedad multisistémica: fundamentos básicos y clínicos*. México, D.F.: Médica Panamericana, 2008.

Michaels AS, Chandrasekaran SK, Shaw JE. *Drug permeation through human skin: Theory and in vitro experimental measurement*. *AIChE J* 1975; 21: 985-996.

Mistry A, Stolnik S, Illum L. *Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs*. *Int J Pharm* 2009; 379(1):146-157.

Moghimi HR, Barry BW, Williams AC. *Stratum corneum and barrier performance. A model lamellar structural approach*. En: Bronaugh RL, Maibach HI. *Percutaneous Absorption*. 3ª ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1999. Cap 31:515-553.

Moller P, Fall A, Bonn D. *Origin of apparent viscosity in yield stress fluids below yielding*. *Europhys Lett* 2009; 87: 38004-38009

Montagna W. *The Structure and Fuction of Skin*. 2nd ed. New York: Academic Press; 1961.

Myc A, Vanhecke T, Landers JJ, Hamouda T, Baker JR, Jr. *The fungicidal activity of novel nanoemulsion (X8W60PC) against clinically important yeast and filamentous fungi*. *Mycopathologia* 2002; 155(4):195-201.

Nagashima K, Zheng J, Parmiter D, Patri A. *Biological Tissue and Cell Culture Specimen Preparation for TEM Nanoparticle Characterization Chapter 8*. In Scott E. McNeil (ed.), *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery, Methods in Molecular Biology*, vol. 697, DOI 10.1007/978-1-60327-198-1_8, © Springer Science+Business Media, LLC 2011.

Nicolaos G, Crauste-Manciet S, Farinotti R, Brossard D. *Improvement of cefpodoxime proxetil oral absorption in rats by an oil-in-water submicron emulsion*. *Int J Pharm* 2003; 263(1-2):165-171.

6. BIBLIOGRAFÍA

Nuevo manual Merck de información médica general. Barcelona: Océano, 2008.

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 199; 84(4):482-488.

Olmeda I. y Barba-Romero, S. *Redes Neuronales Artificiales. Fundamentos y Aplicaciones.* Universidad de Alcalá de Henares. Servicio de Publicaciones; 1993.

Osborne DW, Ward AJ, O'Neil KJ. *Microemulsions as topical drug delivery vehicles: in-vitro transdermal studies of model hydrophilic drug.* J Pharm Pharmacol 1991; 43: 450-454.

Pader M. *Dentifrice rheology.* In: Laba D (ed) *The rheological properties of cosmetic and toiletries.* Marcel Dekker, New York; 1993, 247-273

Pagliara A, Testa B, Carrupt PA, Jolliet P, Morin C, Morin D, Urien S, Tillement JP, Rihoux JP. *Molecular properties and pharmacokinetic behavior of cetirizine, a zwitterionic H₁-receptor antagonist.* J Med Chem 1998, 41: 853-863.

Pinto JF. *Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: from the mouth to the colon.* Int J Pharm 2010; 395(1-2):44-52.

Potts RO, Guy RH. *Predicting skin permeability.* Pharm. Res., 9 (5): 663-669, 1992.

Potts RO, Golden GM, Francoeur MI, Mak V, Guy RH. *Mechanism and enhancement of solute transport across the stratum corneum.* Journal of controlled release 1991; 15:249-260.

Poulin P, Krishnan K. *Molecular structure-based prediction of human abdominal skin permeability coefficients for several organics compounds.* J. Tox. Env. Health, Part A, 62: 143-159, 2001.

Rao J, McClements DJ. *Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method.* J Agric Food Chem 2011; 59(9):5026-5035.

Rao SVR, Agarwal P, Shao J. *Selfnanoemulsifying drug delivery system (SNEEDS) for oral delivery of protein drugs. II. In vitro transport study.* International journal of pharmaceutics 2008; 362:10-15.

Ramalingam K, Amaechi BT, Ralph RH, Lee VA. *Antimicrobial activity of nanoemulsion on cariogenic planktonic and biofilm organisms.* Arch Oral Biol 2012; 57(1):15-22.

Rang, H.; [et al]. *Farmacología.* 5ª edición. Madrid: Elsevier España, cop. 2004.

Ravi TPU, Padma T. *Nanoemulsions for drug delivery through different routes.* Research in Biotechnology 2011; 2(3):1-13.

Ritger PL, Peppas NA. *A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices.* J Control Release 1987; 5:37-42.

Roberts MS, Sherre EC, Pellet MA. Skin transport. En: Walters KA. *Dermatological and transdermal formulations.* New York: Marcel Dekker, Inc; 2002. p. 89-195.

Rosano HL, Caluse M. *Microemulsions systems.* En: Surfactants science series. Vol: 24. New York: Ed. Marcel Dekker; 1987.

Santos-Magalhaes NS, Pontes A, Pereira VM, Caetano MN. *Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules.* Int J Pharm 2000; 208(1-2):71-80.

Santoyo S, Arellano A, Ygartua P, Martin C. *In vitro percutaneous absorption of piroxicam through synthetic membranes and abdominal rat skin.* Pharm Acta Helv 1996; 71(2):141-146.

6. BIBLIOGRAFÍA

Sato K, Sugibayashi K, Morimoto Y. *Effect and mode of action of aliphatic esters on the in vitro skin permeation of nicorandil*. International journal of pharmaceutics 1988;43(1-2):31-40.

Scheuplein RJ, Blank IH, Brauner GJ, MacFarlane DJ. *Percutaneous absorption of steroids*. KJ Invest Dermatol 1969; 52: 63-70.

Scheuplein RJ, Blank IH. *Permeability of the skin*. Physiol Rev 1971; 51:702-747.

Schmalfuss U, Neubert R, Wohlrab W. *Modification of drug penetration into human skin using microemulsions*. Journal of controlled release 1997; 46:279-285.

Scott DC, Clymer JW. *Estimation of distribution coefficients from partition coefficient and pKa*. Pharmaceutical Technology 2002; 30-40.

Scott RC, Walker MW, Dugard PH. *A comparison of the in vitro permeability properties of human and some laboratory animal skin*. International Journal of Cosmetics Science 1987; 8:189-194.

Scott RC, Guy RH, Hydgraft J. *Prediction of percutaneous penetration*. IBC Technical Services. London, 1990.

Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK, Ali M. *Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation*. Eur J Pharm Biopharm 2007; 66(2):227-243.

Shakeel F, Ramadan W. *Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions*. Colloids Surf B Biointerfaces 2010; 75(1):356-362.

Shakeel F, Ramadan W, Gargum HM, Singh R. *Preparation and in vivo evaluation of indomethacin loaded true nanoemulsions*. Sci Pharm. 2010; 78(1): 47–56.

Siepmann J, Peppas NA. *Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)*. Adv Drug Deliv Rev 2001; 48:139-157.

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.

Software. SPSS versió 12. 2007.

Software. *Numerical Inversion of Laplace Transforms*. Salt Lake City: Micromath Scientific Software, Inc. 1991.

Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. *Nano-emulsions*. Current Opinion in Colloid and Interface Science 2005; 10:102-110.

Sole I, Pey CM, Maestro A, Gonzalez C, Porras M, Solans C, et al. *Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: preparation variables and scale up*. J Colloid Interface Sci 2010; 344(2):417-423.

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*. International journal of pharmaceutics 1984; 22(2-3):291-298.

Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK. *Buccal bioadhesive drug delivery--a promising option for orally less efficient drugs*. J Control Release 2006; 114(1):15-40.

Sun Yong, Jiang Yue, An Keyao. *Preparation and the Influencing Factors of Cetirizine Hydrochloride Microemulsion*. Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology, 2011, 39:174-176.

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.

6. BIBLIOGRAFÍA

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 (Tokyo) 199; 41(8):1434-1437.

Tamilvanan S, Benita S. *The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs*. Eur J Pharm Biopharm 2004; 58(2):357-368.

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.

Tharp MD. *The clinical efficacy of antihistamines in the skin*. Allergy, 55: 11-16, 2000.

Thomas BJ, Finnin BC. *The transdermal revolution*. Drug Discov Today 2004; 9(16):697-703.

Tiwari SB, Amiji MM. *Improved oral delivery of paclitaxel following administration in nanoemulsion formulations*. J Nanosci Nanotechnol 2006; 6(9-10):3215-3221.

Tojo K. Random brick model for drug transport across stratum corneum. *J Pharm Sci* 1987; 76: 889-891.

Tortora GJ, Grabowski SR. Principles of anatomy and physiology. 7thed. New York: Harper Collins Publishers; 1993.

Touitou E, Abed L. *Effect of propylene glycol, Azone and n-decylmethyl sulphoxide on skin permeation kinetics of 5-fluorouracil*. *International journal of pharmaceutics* 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*. *International journal of pharmaceutics* 1994;103(2):131-136.

Tregear RT. *The permeability of skin to albumin, dextrans and polyvinyl pyrrolidone*. *J Invest Dermatol* 1966; 46: 24-27.

Trotta M, Morel S, Gasco MR. *Effect of oil phase composition on the skin permeation of felopipine from o/w microemulsions*. *Pharmazie* 1997; 52: 50-53.

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.

Vaes WHJ, Ramos EU, Verhaar HJM, Cramer CJ, Hermens JLM. *Understanding and estimating membrane-water partition coefficients: approaches to derive quantitative structure property relationship*. *Chem. Res. Tox.*, 11: 847-854, 1998.

6. BIBLIOGRAFÍA

Valenta C, Wanka M, Heidlas J. *Evaluation of novel soya-lecithin formulations for dermal use containing ketoprofen as a model drug*. Journal of controlled release 2000; 63(1-2):165-173.

Velázquez; directores: Pedro Lorenzo Fernández; [et al]. *Farmacología básica y clínica*. 18ª edición. Madrid: Médica Panamericana, cop. 2008.

Velázquez; directores: Pedro Lorenzo Fernández; [et al]; colaboradores: Ricardo Caballero Collado; [et al]. *Manual de farmacología básica y clínica*. Madrid: Médica Panamericana, cop. 2013.

Venkateswarlu V, Manjunath K. *Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapina solid lipid nanoparticles*. J Control Release, 2004; 95: 627-638.

Vincent A, Hackley y Jeffrey Clogston. Measuring the Hydrodynamic Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering chapter 4 in Scott E. McNeil (ed.), *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, Methods in Molecular Biology, vol. 697, DOI 10.1007/978-1-60327-198-1_4, © Springer Science+Business Media, LLC 2011.

Vyas TK, Shahiwala A, Amiji MM. *Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations*. Int J Pharm 2008; 347(1-2):93-101.

Walker M, Hadgraft J. *Oleic acid - a membrane fluidiser or fluid within the membrane*. International journal of pharmaceutics 1991; 71: R1-R4.

Wertz PW. *The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects*. Advanced Drug Delivery Reviews 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.

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. *The enhancement index concept applied to terpene penetration enhancers for human skin and model lipophilic (oestradiol) and hydrophilic (5-fluorouracil) drugs*. International journal of pharmaceutics 1991a; 74:157-168.

Williams AC, Barry BW. *Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement*. Pharmaceutical research 1991b; 8(1):17-24.

Williams AC, Cornwell PA, Barry BW. *On the non-gaussian distribution of human skin permeabilities*. Int. J. Pharm., 86: 69-72, 1992.

Wu H, Ramachandran C, Weiner ND, Roessler BJ. *Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions*. Int J Pharm 2001; 220(1-2):63-75.

Wulff-Pérez M, Martín-Rodríguez A, Gálvez-Ruiz MJ, de Vi-cente J. *The effect of polymeric surfactants on the rheo-logical properties of nanoemulsions*. Colloid Polym Sci 2013; 291:709-716

Yamada M, Uda Y. *Enhancement of percutaneous absorption of molsidomine*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1987; 35:3390-3398.

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*. International journal of pharmaceutics 1995; 117(2):173-179.

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.

6. BIBLIOGRAFÍA

Zaater, M; Tahboub, Y; Najib, N. *RP-LC method for the determination of cetirizine in serum*. J. of Pharm and Biomedical Analysis, 22 (2000), 739–744.

Zeta Potential Using Laser Doppler Electrophoresis. Malvern.com
http://www.malvern.com/labeng/technology/zeta_potential/zeta_potential_lde.htm

Zhang Q, Chen Y, Fu W-J, Sun S-Y. *Study on the stability of pesticide WDG suspension by TURBISCAN LAB*. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi Guang Pu. 2008; 28(4): 843-6.

Zhao K, Singh J. *Mechanisms of percutaneous absorption of tamoxifen by terpenes: eugenol, D-limonene and menthone*. J Control Release 1998; 55(2-3):253-260.

Zhou H, Yue Y, Liu G, Li Y, Zhang J, Gong Q, et al. *Preparation and characterization of a lecithin nanoemulsion as a topical delivery system*. Nanoscale Res Lett 2009; 5(1):224-230.

Zhu W, Yu A, Wang W, Dong R, Wu J, Zhai G. *Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir*. Int J Pharm 2008; 360(1-2):184-190.

Zimmerman M. *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (editorial)*. Pain 1983; 16:109.

Zubeldia, José Manuel; Baeza, M^a Luisa; Jáuregui, Ignacio; Senent, Carlos. *Libro de las enfermedades alérgicas de la Fundación BBVA*. Bilbao: Fundación BBVA; SEAIC Fundación, 2012.

7. ÍNDICE DE FIGURAS

7 INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Mecanismo de reacción alérgica.....	7
Figura 1.2. Atopia y terapia antialérgica.....	13
Figura 1.3. Estructura química de la cetirizina.....	22
Figura 1.4. Nanoemulsión. Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM).....	26
Figura 1.5. Estructura de microemulsiones/nanoemulsiones directas (O/A) e inversas (A/O).....	30
Figura 1.6. Transiciones estructurales desde microemulsiones inversas (A/O) a microemulsiones directas (O/A) a través de microemulsiones bicontinuas.....	30
Figura 1.7. Lectura de un diagrama pseudo-ternario.....	32
Figura 1.8. Estructura de la piel humana.....	38
Figura 1.9. Capas y tipos de células de la epidermis en la piel gruesa.....	40
Figura 1.10. Principales vías de penetración transdérmica.....	42
Figura 1.11. Estructura química del ácido oleico.....	49
Figura 1.12. Estructura química del alcohol láurico.....	49
Figura 1.13. Estructura química del miristato de isopropilo.....	50
Figura 1.14. Estructura química de la azona.....	50
Figura 1.15. Estructura química del mentol.....	52
Figura 1.16. Estructura química del DMSO.....	52
Figura 1.17. Estructura química de la urea.....	53
Figura 1.18. Estructura química de la n-metil-2-pirrolidona.....	53
Figura 1.19. Ejemplo de una red neuronal totalmente conectada.....	59
Figura 3.1. Esquema del HPLC.....	81
Figura 3.2. Equipo Z-sizer (1), ordenador con el software Z-sizer instalado (2), cubeta de cuarzo (3) y espacio donde se coloca la cubeta (4).....	82
Figura 3.3. Esquema del movimiento de partículas pequeñas y grandes en un líquido.....	83

Figura 3.4. Viscosímetro integrado al ordenador.....	85
Figura 3.5. Tipos de comportamientos reológicos.....	86
Figura 3.6. Curvas de Fuerzas.....	88
Figura 3.7. TurbiscamLab®.....	89
Figura 3.8. Esquema de una célula de difusión de Franz.....	90
Figura 3.9. Trozo de piel humana antes de ser cortada.....	91
Figura 3.10. Dermatomo AESCULAP y piel cortada a 0,4 mm de grosor.....	92
Figura 3.11. Equipo de muestreo manual de células de Franz.....	93
Figura 3.12. Representación de la función de permeación. Cantidades permeadas acumuladas en función del tiempo, Q_t	107
Figura 4.1. Representación gráfica de un cromatograma de una muestra de cetirizina.....	124
Figura 4.2. Representación gráfica de un cromatograma de una muestra patrón de cetirizina.....	124
Figura 4.3. Microfotografías electrónicas de transmisión de la nanoemulsión de cetirizina.....	128
Figura 4.4. Curvas de flujos y curvas de viscosidad de la nanoemulsión de cetirizina.....	129
Figura 4.5. Curvas de flujos y curvas de viscosidad del hidrogel de cetirizina.....	131
Figura 4.6. Perfiles de transmisión y perfiles de retrodispersión del hidrogel de cetirizina.....	132
Figura 4.7. Perfiles de transmisión y perfiles de retrodispersión de la nanoemulsión de cetirizina.....	133
Figura 4.8. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de referencia (sin promotor) en función del tiempo para cada uno de los replicados.....	144
Figura 4.9. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con metilpirrolidona como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....	145
Figura 4.10. Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con etilpirrolidona como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....	145

- Figura 4.11.** Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **octilpirrolidona** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....146
- Figura 4.12.** Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **dodecylpirrolidona** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....146
- Figura 4.13.** Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **octanol** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....155
- Figura 4.14.** Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **nonano** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....156
- Figura 4.15.** Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **decanol** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....156
- Figura 4.16.** Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **dodecanol** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....157
- Figura 4.17.** Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **alcohol miristilo** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....157
- Figura 4.18.** Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **limoneno** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....168
- Figura 4.19.** Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **escualeno** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....168
- Figura 4.20.** Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **cineol** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....169
- Figura 4.21.** Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **nonano** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....169

- Figura 4.22.** Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación con **azona** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....170
- Figura 4.23.** Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **decanol** como promotor en función del tiempo para cada uno de los replicados.....170
- Figura 4.24.** Representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas de la formulación de cetirizina con **dimetilsulfóxido y decanol** como promotores, en función del tiempo para cada uno de los replicados.....176
- Figura 4.25.** Cantidades permeadas acumuladas de la nanoemulsión de cetirizina a través de piel humana bajo condiciones ex vivo, en función del tiempo (n = 6).....178
- Figura 4.26.** Perfiles de liberación para el hidrogel cetirizina (CTZ-HG), nanoemulsión de cetirizina (CTZ-NE) y para la solución control de cetirizina.....179
- Figura 4.27.** Representación gráfica de las cantidades retenidas de cetirizina en piel humana : hidrogel de cetirizina (CTZ-HG) y nanoemulsión de cetirizina (CTZ-NE).....181
- Figura 4.28.** Evaluación del área de roncha inducida por la histamina después de la aplicación de las formulaciones ensayadas a diferentes intervalos de tiempo: hidrogel de cetirizina (CTZ-HG), nanoemulsión de cetirizina (CTZ-NE), maleato de Dimetindeno (DIMITNE), dexclorfeniramina (DXCHLORP) y control.....182
- Figura 4.29.** Porcentaje de supresión de la roncha inducida por histamina en conejos machos albinos después de la aplicación tópica de las formulaciones ensayadas.....183

8. ÍNDICE DE TABLAS

8 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Características farmacocinéticas de los antihistamínicos de 1ª y 2ª generación.....	21
Tabla 3.1. Screening de formulaciones de cetirizina con diferentes promotores.....	106
Tabla 3.2. Datos de los 94 experimentos de entrenamiento con sus 18 vectores de entradas.....	113-114
Tabla 3.3. Datos de las cuatro características medidas de los 94 experimentos de entrenamiento.....	115-116
Tabla 4.1. Relación área/concentración de cetirizina diclorhidrato correspondiente a las cinco rectas de calibración obtenidos en la validación interdía de la metódica analítica.....	121
Tabla 4.2. Concentraciones experimentales de cetirizina diclorhidrato en el margen de concentraciones de 100 – 6,25 µg/ml.....	122
Tabla 4.3. Concentraciones experimentales de cetirizina diclorhidrato en el margen de concentraciones de 6,25 – 1,5625 µg/ml.....	123
Tabla 4.4. Límites de cuantificación y límites de detección correspondientes a cada replicado con sus respectivas medias (X) y desviación estándar (DE) obtenidos en la validación de la metódica analítica.....	125
Tabla 4.5. Resumen de los valores del tamaño medio de gota de las formulaciones de cetirizina diclorhidrato con diferentes promotores y su polidispersión (PdI).....	127
Tabla 4.6. Cantidades permeadas acumuladas (µg) para cada replicado de cetirizina base y cetirizina diclorhidrato en propilenglicol/agua (50:50).....	134
Tabla 4.7. Cantidades permeadas acumuladas (µg) para cada replicado de cetirizina base y cetirizina diclorhidrato en etanol/agua (50:50).....	135
Tabla 4.8. Valores individuales, mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación estimados mediante el programa LAPLACE de cetirizina base en propilenglicol/agua (50:50)....	135
Tabla 4.9. Valores individuales, mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación estimados mediante el programa LAPLACE de cetirizina diclorhidrato en propilenglicol/agua (50:50).....	136

Tabla 4.10. Valores individuales, mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación estimados mediante el programa LAPLACE de cetirizina base en etanol/agua (50:50).....	136
Tabla 4.11. Valores individuales, mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación estimados mediante el programa LAPLACE de cetirizina diclorhidrato en etanol/agua (50:50)...	137
Tabla 4.12. Tratamiento estadístico de los parámetros LAPLACE entre cetirizina base y cetirizina diclorhidrato en propilenglicol/agua (50:50).....	137
Tabla 4.13. Tratamiento estadístico de los parámetros LAPLACE entre cetirizina base y cetirizina diclorhidrato en etanol/agua (50:50).....	138
Tabla 4.14. Tabla resumen de las medianas de los parámetros de permeación LAPLACE de cetirizina base y cetirizina diclorhidrato en propilenglicol/agua (50:50) y en etanol/agua (50:50).....	138
Tabla 4.15. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación de referencia (sin promotor).....	140
Tabla 4.16. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con metilpirrolidona como promotor.....	141
Tabla 4.17. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con etilpirrolidona como promotor.....	142
Tabla 4.18. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con octilpirrolidona como promotor.....	143
Tabla 4.19. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con docecilpirrolidona como promotor.....	144
Tabla 4.20. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina sin promotor	147

Tabla 4.21. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con metilpirrolidona como promotor.....	147
Tabla 4.22. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con etilpirrolidona como promotor.....	148
Tabla 4.23. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con octilpirrolidona como promotor.....	148
Tabla 4.24. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con dodecilpirrolidona como promotor.....	148
Tabla 4.25. Tratamiento estadístico de los parámetros LAPLACE entre las diferentes formulaciones de cetirizina con la serie de pirrolidonas.....	149
Tabla 4.26. Tabla resumen de la mediana de los parámetros de permeación LAPLACE de las formulaciones de cetirizina diclorhidrato con una serie de pirrolidonas.....	150
Tabla 4.27. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con octanol como promotor.....	151
Tabla 4.28. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con nonano como promotor.....	152
Tabla 4.29. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con decanol como promotor.....	153
Tabla 4.30. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con dodecanol como promotor.....	154

Tabla 4.31. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con alcohol miristilo como promotor.....	155
Tabla 4.32. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con octanol como promotor.....	158
Tabla 4.33. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con nonano como promotor.....	158
Tabla 4.34. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con decanol como promotor.....	158
Tabla 4.35. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con dodecanol como promotor.....	159
Tabla 4.36. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con alcohol miristilo como promotor.....	159
Tabla 4.37. Tratamiento estadístico de los parámetros LAPLACE entre las diferentes formulaciones de cetirizina con la serie de alcanos.....	160
Tabla 4.38. Tabla resumen de la mediana de los parámetros de permeación LAPLACE de las formulaciones de cetirizina diclorhidrato con una serie de alcanos.....	160
Tabla 4.39. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con limoneno como promotor.....	162
Tabla 4.40. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con escualeno como promotor.....	163
Tabla 4.41. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con cineol como promotor.....	164

Tabla 4.42. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con nonano como promotor.....	165
Tabla 4.43. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con azona como promotor.....	166
Tabla 4.44. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con decanol como promotor.....	167
Tabla 4.45. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con limoneno como promotor.....	171
Tabla 4.46. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con escualeno como promotor.....	171
Tabla 4.47. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con cineol como promotor.....	171
Tabla 4.48. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con nonano como promotor.....	172
Tabla 4.49. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con azona como promotor.....	172
Tabla 4.50. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con decanol como promotor.....	172
Tabla 4.51. Tratamiento estadístico de los parámetros LAPLACE entre las diferentes formulaciones de cetirizina con diferentes promotores.....	173
Tabla 4.52. Tabla resumen de la mediana de los parámetros de permeación LAPLACE de las formulaciones de cetirizina diclorhidrato con diferentes promotores.....	174
Tabla 4.53. Cantidades permeadas acumuladas (μg) de cetirizina a través de piel humana en función del tiempo (h), correspondientes a la formulación con dimetilsulfóxido y decanol	175

Tabla 4.54. Valores individuales, mediana, máximo y mínimo de los parámetros de permeación obtenidos para la formulación de cetirizina con **dimetilsulfóxido y decanol**.....176

Tabla 4.55. Mediana de los parámetros de permeación LAPLACE de la formulación de cetirizina diclorhidrato con dimetilsulfóxido y decanol.....177

Tabla 4.56. Parámetros de permeación transdérmica de la nanoemulsión de cetirizina al 5%.....178

Tabla 4.57. Parámetros de permeación de las 89 formulaciones de cetirizina diclorhidrato con diferentes promotores.....186-187

9. ANEXO

Semisolid formulations containing cetirizine: human skin permeation and topical antihistaminic evaluation in a rabbit model

Claudia Ciurlizza · Francisco Fernández ·
Ana Cristina Calpena · Raquel Lázaro ·
Alexander Parra · Beatriz Clares

Received: 6 May 2014/Revised: 28 June 2014/Accepted: 30 June 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Cetirizine dihydrochloride (CTZ) is a second-generation histamine H₁ antagonist, effective for the treatment of a wide range of allergic diseases. It has been utilized for managing the symptoms of chronic urticaria and atopic skin conditions. Thus, two novel semisolid formulations, nanoemulsion (NE) and hydrogel (HG) were developed to study their potential utility as vehicles including cetirizine (CTZ) and evaluate the potential use as topical H₁-antihistamines agents. The physicochemical and stability properties of both vehicles were tested. Drug release kinetics and human skin permeation studies were performed using Franz cells. The antihistaminic activity was assayed in New Zealand rabbits and compared with two commercial first generation antihistamines. Both formulations were stable and provided a sustained drug release. Amounts of CTZ remaining in the skin were higher for HG, showing the maximum biological effect at 30 min, similar to topical first generation H₁-antihistamines commercially available. These results suggest that CTZ-HG could be a promising system for the treatment of topical allergy bringing rapid antihistaminic relief.

Keywords Cetirizine · Second-generation antihistamines · Skin penetration · Semisolid preparations for cutaneous application

Introduction

Cetirizine (CTZ) dihydrochloride is a second-generation histamine H₁ antagonist with long acting antihistaminic effects. It is an effective treatment for a wide range of allergic diseases [20]. Data from in vitro, in vivo, and ex vivo studies suggest that CTZ has a number of anti-allergic, anti-inflammatory properties that appear to be independent of their H₁-blockade activity by mast-cell stabilization [1]. The skin has a high concentration of mast cells, which synthesise histamine and other mediators including platelet activating factor (PAF), leukotrienes, and hydroxyeicosatetraenoic acids and cytokines stored in their secretory cytoplasmic granules. Allergen-dependent cross-linking of receptor-bound IgE results in the initiation of degranulation [21]. Thus, it has been utilized as the treatment of choice for managing the symptoms of chronic urticaria and atopic skin conditions, even in infants, due to its reported safety [8].

Hydrogels (HGs) are defined as three-dimensional polymer networks swollen by large amounts of solvent and have been classically used as topical drug delivery systems [7]. They have a pleasant cosmetic aspect and cool feeling, very helpful in certain dermatologic conditions [19]. They usually increase the residence time in the action site, improving the drug delivery. Their manufacturing process is relatively easy and well established by the pharmaceutical and cosmetic industry. Nanoemulsions (NEs) are transparent (translucent) dispersions of two immiscible phases, with a mean droplet

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00403-014-1484-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Ciurlizza · F. Fernández · A. C. Calpena · R. Lázaro ·
A. Parra
Biopharmaceutical and Pharmacokinetics Unit, School
of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII,
08028 Barcelona, Spain

B. Clares (✉)
Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology,
School of Pharmacy, University of Granada, Campus de la
Cartuja, s/n, 18071 Granada, Spain
e-mail: beatrizclares@ugr.es

size in the nanometric scale (from 20 to 200 nm) [18]. These systems are one of the most promising for transdermal delivery of drugs combining advantages of nanoparticles, microemulsions, niosomes and liposomes with improved transdermal delivery properties due to the small droplet size and the presence of permeation promoters [15]. Equally, NE itself accelerates the drug penetration into the tissue [5]. Since at present no commercially available first-generation topical antihistamines exist, the main aims of this work were (1) the design of two topical dosage forms (HG and NE) containing CTZ, (2) the evaluation of their in vitro drug release and the ex vivo drug permeation through human skin, and finally (3) the in vivo evaluation in a rabbit model.

Materials and methods

Developed formulations

Cetirizine-hydrogel (5 % w/v; Roig Pharma, Barcelona, Spain) for topical application was prepared by dissolving the drug in water and adding hydroxyethyl cellulose (3 % w/v; Natrosol[®], Quiminet, Madrid, Spain) gradually under continuous stirring. Finally, the solution was neutralized with sodium hydroxide (Panreac Química, Barcelona, Spain) up to eudermic pH and kept protected from light for 24 h.

CTZ-NE (5 % w/w) was prepared with oils (9 % w/w; isostearyl isoestearate and 10 % w/w; d-limonene, Gattefossé, Saint-Priest, France), aqueous ingredients (18 % w/w; water, 5 % w/w; propylene-glycol, 15 % w/w; Transcutol[®] P, Gattefossé, Saint-Priest, France) and surfactant blend (19 % w/w; labrasol[®], 19 % w/w; plulol[®] oleique, Gattefossé, Saint-Priest, France) by mixing the oily phase with the surfactant/co-surfactant mixture before adding the aqueous phase with CTZ under magnetic stirring. This composition was previously selected based on the best physicochemical properties of the resulting system from a pseudo-ternary diagram mapped by titration method varying mass ratios of components in the mixtures from 1:9 to 9:1 with constant mass ratio of the third.

Physicochemical characterization

The NE droplet size (*z*-ave) and polydispersity index (PI) were determined by dynamic light scattering using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). To corroborate the droplet size and to examine the morphology, the formulation was observed using transmission electron microscopy (TEM) with a Zeiss 902 CEM microscope (Zeiss, Barcelona, Spain).

pH values were measured using a Crison 501 digital pH/mV-meter (Crison, Barcelona, Spain).

The apparent viscosity of formulations (0.4 ml) was determined without dilution using a Rheometer Haake VT500 (Thermo Scientific, Germany), with coaxial cylinders (MV2). The models of Newton, Bingham, Ostwald–de-Waele, Herschel–Bulkley and Casson, were fitted to the rheological data obtained for both formulations. The RheoWin[®] Data Manager software (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Germany) was used for the calculation.

All values are the averages of three parallel experiments.

Stability studies

The physical stability of prepared CTZ dispersions was assessed, by means of optical analysis based on the multiple dispersion of the light using the TurbiScanLab[®] (Formulation, L'Union, France).

For the chemical stability test, known amounts of formulations were stored in hermetically sealed containers at room temperature for up to 3 months and assayed to determine the CTZ content. For CTZ analysis, samples were dissolved in mobile phase and stirred by vortex mixer.

Quantitative HPLC analysis

Cetirizine was quantified by HPLC system consisting of a Waters 515 pump (Waters, Milford, USA) with UV–VIS 2487 detector (Waters, Milford, USA) set at 232 nm. A reverse-phase column, C8 Kromasil column (5 μ m, 250 \times 4.6 mm, Teknokroma, Barcelona, Spain), a flow rate of 0.7 ml/min was used. The mobile phase consisted of a mixture of 10 mM ammonium acetate:acetonitrile (50:50 v/v). The injection volume was 100 μ l and total run time was 12 min.

The calibration curves were prepared in phosphate buffer pH 7.4 with a concentration range of 100–1.56 μ g/ml in order to measure the CTZ concentration of the samples and to validate the analytical technique. The latter, validated inter-day ($n = 6$), was linear ($P > 0.05$), according to the statistics applied, precise and accurate with a percentage variation coefficient (CV %) below 9.95 %, and with a relative error (%E) lower than 5.92 %. The detection limit of the HPLC method for CTZ was 1.56 μ g/ml ($n = 6$).

In vitro drug release

The release studies were performed using vertical Franz diffusion cell (FDC 400, Crown Glass, Somerville, USA) with dialysis cellulose membranes (MWCO 12–14 kDa, Iberlabo, Madrid, Spain) between the donor and the

receptor compartment (13 ml phosphate buffer pH 7.4) with effective diffusional area of 2.54 cm^2 , keeping sink conditions in the whole experiment at $32 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ under continuous stirring. 300 μl samples were withdrawn at selected time intervals for 6 h and replaced with the same volume of fresh receptor medium. The concentration of released drug was measured as previously described by HPLC. All values are the averages of six parallel experiments. Five different kinetic models (zero order, first order, Higuchi, Weibull and Peppas–korsmeyer function) were used to fit the experimental data obtained from drug release experiments.

Human skin permeation studies

Human skin from abdominal plastic surgery of a single donor to eliminate intrasubject variability was used as a permeation membrane [6]. Skin was cleaned and stored at $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ until further use. For the experiment skin was cut using an Aesculap GA 630 dermatome (Aesculap, Tuttlingen, Germany) into 0.4 mm thick pieces at room temperature. The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Barcelona SCIAS Hospital (Spain), and written informed consent forms were provided by volunteers.

Permeation study was performed on vertical Franz diffusion cell (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NY) with an effective diffusional area of 2.54 cm^2 . Skin samples from the same donor were mounted between the donor and receptor chambers of the cell, with the dermal side in contact with the receptor medium. Barrier integrity of skin samples was characterized by transepidermal water loss measurements (Dermalab, Cortex Technology, Hadsund, Denmark). NE or HG (equivalent to 15 mg of CTZ) was applied to the skin. The receptor chamber was filled with 13 ml of phosphate-buffered saline pH 7.4, ensuring sink conditions, and kept at $32 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ by a circulating-water jacket. Samples were withdrawn at regular time intervals, up to 28 h, and replaced with the same volume of fresh phosphate buffer after each collection. Drug content was determined by HPLC. All values are the averages of six parallel experiments.

The cumulative amount (Q_t) of CTZ permeated through the skin was calculated as a function of time. The slope and intercept of the linear portion of the plot was derived by regression. The steady-state fluxes (J_s , $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) of CTZ were calculated from the slope of linear portion of the cumulative amounts permeated through the human skin 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). Apparent permeability coefficients (K_p , cm/h) were also obtained. The predictive steady-state plasma concentration

of drug, that would penetrate human skin after topical application was also calculated [4].

Retention study

At the end of the test, the formulation remaining on the skin was removed, cleaned with gauze soaked in a 0.05 % solution of sodium lauryl sulphate and washed with distilled water. The skin was then weighed, cut into small pieces and sonicated for 15 min with acetonitrile:water (50:50, v/v) to extract its CTZ content. The resulting solutions were centrifuged and their drug content ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of skin) determined by HPLC. All values are the averages of six parallel experiments.

Antihistaminic activity testing

New Zealand male albino rabbits (2.7–3.5 kg, St. Feliu de Codines, Barcelona, Spain) ($n = 6$) were housed in plastic cages with a 12 h light/dark cycle. Food and water were available ad libitum. The rabbits were acclimatized to temperature and humidity in controlled facilities for at least 8 days before the experiment. All animals were accustomed to handling (30 min of handling per day for 3 days) and to the testing equipment before the experiments. Two days prior the study, the hair on the back of each rabbit was cut using a hair clipper. The day before the study, a depilatory cream was applied and then thoroughly washed off to ensure complete removal of the hair, after drying with a towel rabbits were held in a warm area until completely dry. Before study commenced, rabbits were inspected and no visual signs of skin irritation were observed. The respective areas of the animals were divided into eight sections by a marker, four sections each side. Right-sided areas were taken as test sites, and left-sided areas as control sites. The study was approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation at the University of Barcelona (Spain) in line with Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983 and performed under veterinary supervision.

A sterile aqueous solution, 0.05 ml, of histamine phosphate containing 5 mg/ml was injected intradermally in the eight sections of the back of the rabbits. The initial wheal area was traced after 10 min of histamine injection. Then 500 mg of each formulation (CTZ-NE and CTZ-HG) were applied, moreover as drug reference 500 mg dimetindene maleate (Fenistil[®]) and 500 mg dexchlorpheniramine (Polaramine[®]) was also applied. As controls, NE and HG vehicles, as well as, sterile saline solution were applied. The wheal diameter was measured after 10, 20 and 30 min of application by means of a caliper. The % of wheal suppression was determined as the area under the curve of

response (wheal area versus time from 0 to 30 min) (AUC_{0-30}).

Statistics

All the data were statistically analyzed using SPSS[®], v. 15 software (SPSS Inc., Chicago, USA) when applicable. Depending on the data distribution (normal or no-normal) a *t* student or Mann–Whitney test was applied, respectively, when two groups were compared, and ANOVA or Kruskal–Wallis when more than two groups were compared, respectively.

Results and discussion

Hydroxyethyl cellulose is a non-ionic water soluble polymer widely used in topical formulations due to its good biocompatibility. On the other hand, most of the components of the NE had already been evaluated in other studies due to their optimal properties for skin delivery. As oil phase, isostearyl isostearate was selected on the base of its reported effects on stratum corneum lipid phase behavior [13], and the terpene d-limonene to exploit their penetration enhancement abilities [3]. The frequent combination of Labrasol[®] and Plurol Oleique[®] was used as surfactant and co-surfactant, respectively, because of the known skin compatibility [9]. It can be hypothesized, that NE promoted the drug skin permeation itself, and especially when incorporated with permeation enhancers such as d-limonene and Transcutol[®] P [10]. The z-ave of NE was 99.95 nm with a PI of 0.15. These results were confirmed by TEM observation (online resource 1), it could be seen that NE droplets were small, spherical and uniform. pH of both formulations was slightly acidic and indicated a mild nature of the surfactant (6.77 and 6.31 for CTZ-HG and CTZ-NE, respectively). The acidity of the skin ranges from pH 4–6, depending on the skin area and the age of the individual, due to the buffer system in the skin. Thus, both findings make these formulations suitable for topical application [2]. pH of dermal formulations is an important factor to avoid skin irritation or make the skin susceptible to bacterial infection.

The flow curves of the NE and the HG (shear stress versus shear rate) are shown in Fig. 1. The flow properties of formulations determine some essential characteristics directly related with their applications, including shelf stability, sensorial properties, filling/dosing behavior, spreadness, and so forth. NE presented an apparent viscosity of 85.23 ± 1.31 mPa s at 25 °C (100 s⁻¹). The curve obtained reflected a non-Newtonian fluid, as viscosity depended on shear rate. Increasing shear rate breaks down the colloidal structure and, therefore, the viscosity is reduced. The

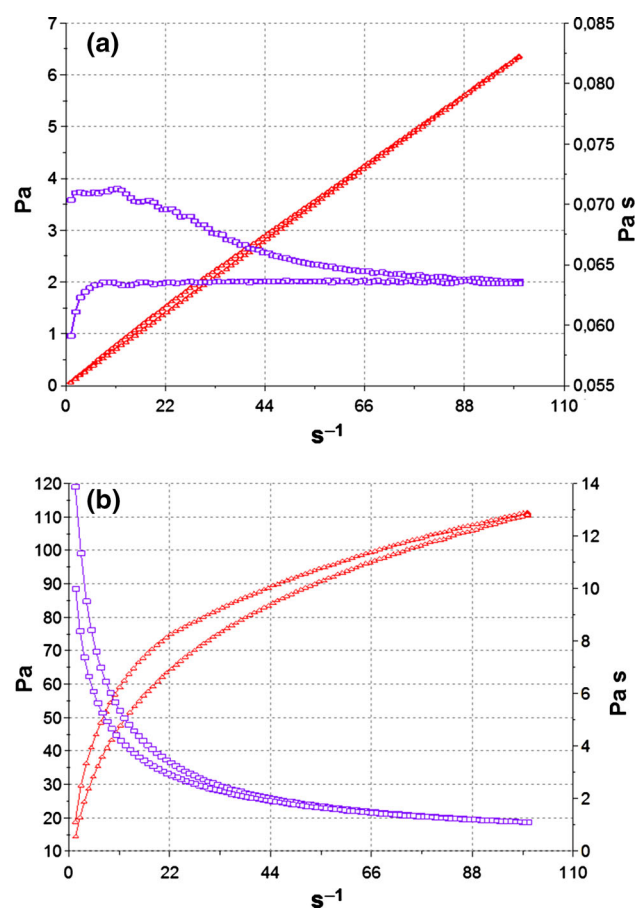


Fig. 1 Flow curves and viscosity curves of the formulations. Cetrizine loaded nanoemulsion (a). Cetrizine loaded hydrogel (b). Shear stress (Pa) versus shear rate (s^{-1}), and viscosity (Pa s) versus shear rate (s^{-1})

presence of a yield stress in emulsions is indicative of the formation of a three-dimensional structure under no-flow conditions [22]. The model that best fitted these data for both, ascending and descending stretches, was Bingham equation with r^2 0.9895 and 0.9939, respectively. On the other hand, the hysteresis area (thixotropy), a pseudoplastic natural characteristic, was observed in the rheogram obtained from the hydroxyethyl cellulose gel (Fig. 1b). This is a desirable indicator of pseudoplastic materials for topical formulations because it can break down for easy spreading, and the applied film can gain viscosity instantaneously to resist running [12]. This formulation presented an apparent viscosity of 6.31 ± 0.01 Pa s at 25 °C (100 s⁻¹). As it was expected, apparent viscosity of the gel was much higher than NE. The model that provided the best fitting of experimental data was the Herschel–Bulkley equation with r^2 0.9763 and 0.9999 for ascending and descending stretches, respectively. This model has been found to be the most suitable for fitting experimental data for foams, hair gels and different types of HG [11].

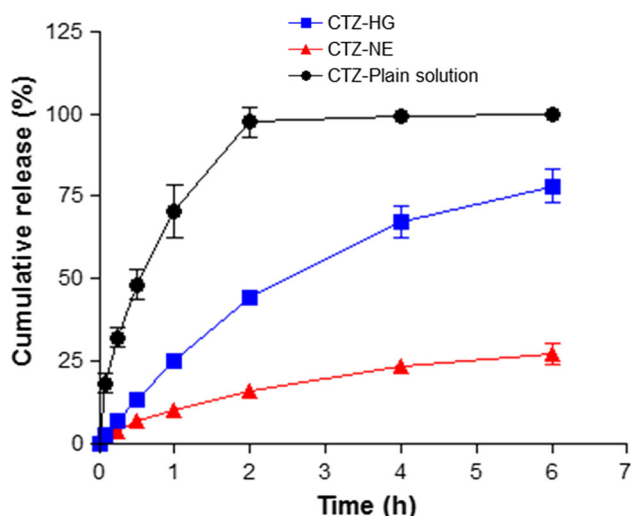


Fig. 2 Cetrizine release profiles from hydrogel vehicle (CTZ-HG), nanoemulsion vehicle (CTZ-NE), and cetrizine plain solution (mean \pm SD, $n = 6$)

Optical stability profiles of CTZ dispersions (online resource 2) showed that gel formulation presented values of transmission and backscattering that remained stable throughout the entire analysis with a typical fluctuating feature of this kind of formulation due to its high viscosity. Nevertheless, no destabilization of the gel is observed over the entire experiment. On the other hand, NE exhibited variations $<1.5\%$, thus no coalescence, creaming or sedimentation processes were observed. The CZT content in formulations after 90 day-storage period was maintained above 98 %.

The release profiles of CTZ are shown in Fig. 2. As expected, significantly higher rate of drug release was observed from drug plain solution; more than 60 % drug released within 60 min and complete release was obtained within 120 min. The rate of drug release from the NE formulation was statistically slower when compared with HG ($P < 0.05$). These both vehicles provided a sustained release of CTZ, HG being the most suitable because it was able to reach 75 % drug released within 6 h. It might be due to the high swellability of the hydroxyethyl cellulose, which has a significant effect on the release kinetics of an incorporated drug [17]. Model fitting, according to the least Akaike's information criterion values of 41.37 and 32.84 for the HG and NE, respectively, showed that both formulations statistically followed a Korsmeyer–Peppas release model [$M_t/M_\infty = k \times t^n$] describing the exponential dependence of the amount of drug released (M_t/M_∞) on time (t). The release constants (k) were $22.42 \pm 3.1 \text{ h}^{-1}$ (%CV = 13.82) and $9.4 \pm 1.67 \text{ h}^{-1}$ (%CV = 18.44) for CTZ-HG and CTZ-NE, respectively. In this model n can be used to obtain important information about the diffusional

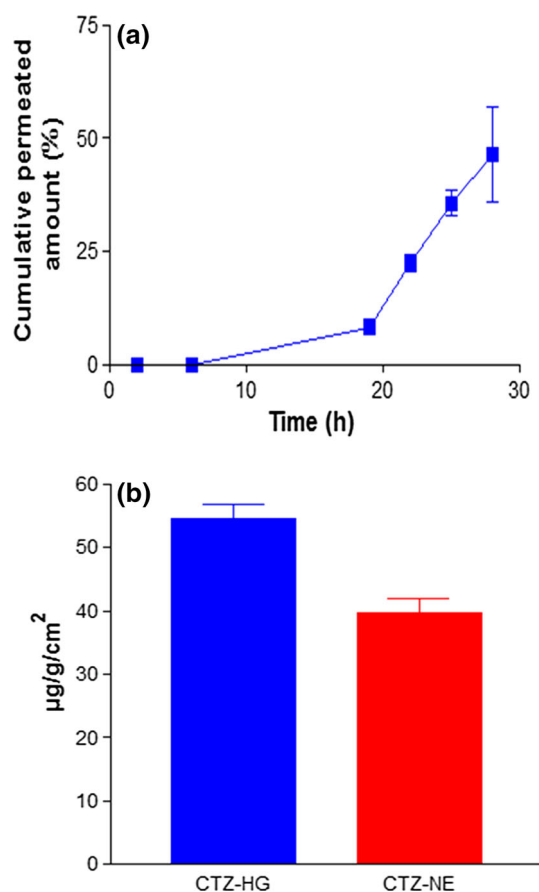


Fig. 3 Permeation profiles of cetrizine loaded nanoemulsion (a) across human skin under ex vivo conditions per unit surface area as a function of time (mean \pm SD, $n = 6$). Retained amounts of cetrizine (b) from hydrogel vehicle (CTZ-HG) and nanoemulsion (CTZ-NE)

release mechanism of a drug from a polymeric device in the case of CTZ-HG, $n = 0.73 \pm 0.09$ (%CV = 12.40) and $n = 0.63 \pm 0.12$ (%CV = 19.89) for CTZ-NE, both indicative of anomalous transport intermediate between Fickian diffusion and case-II (i.e., zero-order release). The prevailing molecular mechanism is a coupling of diffusion and macromolecular relaxation as a result of which the drug diffuses outward with a kinetic behavior that is dependent on the relative ratio of diffusion and relaxation [14].

Permeation profiles of CTZ can be observed in Fig. 3a, only CTZ from NE permeated through the skin after topical application. After 19 h approximately, a nearly linear relationship between the cumulative amounts of drug permeated versus time could be observed. Since no CTZ amounts were detected in the receptor compartment from the HG formulation, in any case permeation parameters could be estimated, moreover no theoretical amounts of CTZ would be found in blood. Contrary, J_s of CTZ per-

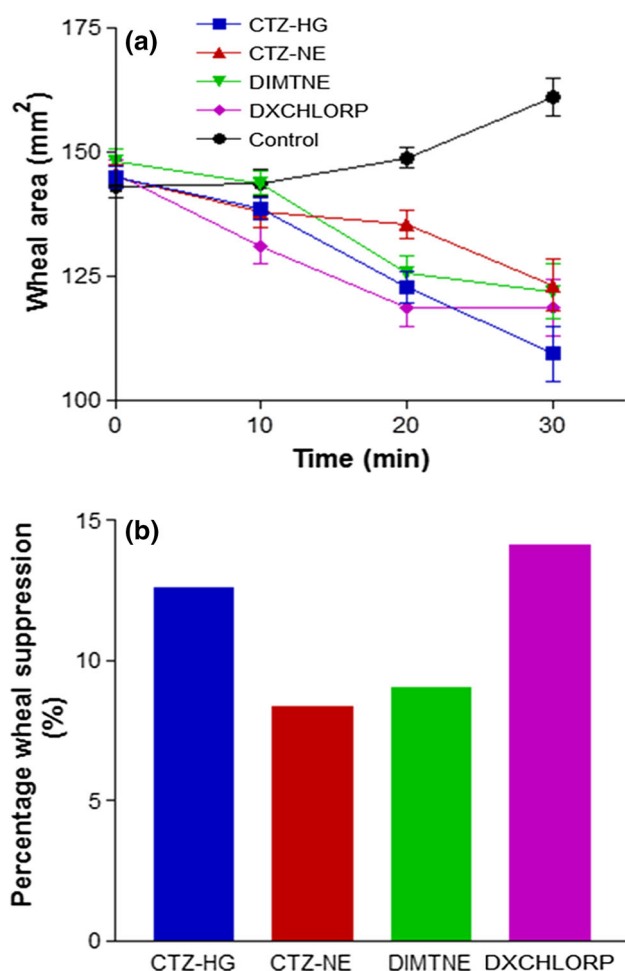


Fig. 4 **a** Histamine induced wheal area evaluation after application of the tested preparations at different time intervals cetirizine loaded hydrogel (CTZ-HG) cetirizine loaded nanoemulsion (CTZ-NE), commercially available dimetindene maleate (DIMTNE) commercially available dexchlorpheniramine (DXCHLORP) and control. **b** Percentage suppression of histamine-induced wheal formation (AUC_{0-30}) on the shaved backs of rabbits after the topical application of tested formulations

meation from NE was $4.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, with T_1 of 16.52 h and K_p $2.63 \times 10^{-4} \text{ cm}/\text{h}$. Taking into account a CTZ plasmatic clearance (Cl_p) of 53 ml/min, and assuming a hypothetical application area of 16 cm^2 median plasma level of $0.060 \mu\text{g}/\text{ml}$ was predicted to be reached. Small amounts of the topical dose applied are absorbed and serum concentrations are significantly below the therapeutic range ($0.257\text{--}0.384 \mu\text{g}/\text{ml}$). It seems that topically applied CTZ is optimal for a local effect, since the aim of the NE vehicle is to increase the penetration through the stratum corneum into deeper layers of skin while avoiding systemic absorption. When relating our permeation results to rheological findings, it appears that differences in rheological profiles are of decisive influence on the CTZ permeation. Lower viscosity under shear of NE was accompanied by

the highest flux and permeation. This is in accordance with previously argued ability of the formulations exhibiting low viscosity to augment J_s and K_p [16]. CTZ remaining in the skin after 28 h of treatment was 39.57 and $54.55 \mu\text{g}/\text{g}$ of skin/ cm^2 for NE and HG, respectively (Fig. 3b). Consequently, a sustained local action of CTZ could be expected. The objective of these formulations was not the absorption into the systemic circulation but the skin retention.

The most common comparative tool to detect pharmacodynamics activity of antihistamines is the percutaneous injection of histamine in human or animal skin. No healing was observed in areas receiving the nonmedicated preparations, which indicated the absence of therapeutic effect of plain HG and NE formulations. The correlation between mean areas and time was represented in Fig. 4a, in which only negative control sterile saline is depicted for clarity, because all negative controls behaved in a similar way. After 20 min of formulation application, it could be observed obvious wheal area suppression when compared with controls. Although no statistically differences were observed among active medicated formulations, CTZ-HG showed the maximum effect at 30 min. Considering AUC_{0-30} , the total effect (as % reduction) considering the control as reference is represented in Fig. 4b. Commercially dexchlorpheniramine exhibited slightly higher wheal reduction than CTZ-HG (14.12 and 12.6 %, respectively) followed by commercially dimetindene maleate (9.02 %) and finally CTZ-NE (8.32 %) in 30 min. This results corroborated previous findings of amount of CTZ remaining in the ex vivo human skin permeation study.

Conclusion

The results obtained in the present work showed that CTZ formulations NE and HG were successfully produced with optimal properties for topical application with efficient ability as peripheral H_1 -antihistamine when compared with two commercially available first generation H_1 -antihistamines. However, the CTZ-HG showed a pseudoplastic flow with thixotropy, which are desirable features to facilitate local application on the skin and prolong the contact time, a higher and faster drug release, as well as, greater drug amount retained in the skin. Since at present no commercially available first generation antihistamines exit, it could be concluded that the CTZ-HG seems to be a promising system for the treatment of topical allergy.

Acknowledgments The authors would like to thank to Gattefossé for kindly supplying the nanoemulsion ingredients used in this study and Hospital Barcelona-SCIAS (Barcelona, Spain) for providing skin samples.

References

1. Assanasen P, Naclerio RM (2002) Antiallergic anti-inflammatory effects of H1-antihistamines in humans. *Clin Allergy Immunol* 17:101–139
2. Basketter D, Darlenski R, Fluhr JW (2008) Skin irritation and sensitization: mechanisms and new approaches for risk assessment. *Skin Pharmacol Physiol* 21:191–202
3. Cal K (2006) How does the type of vehicle influence the in vitro skin absorption and elimination kinetics of terpenes? *Arch Dermatol Res* 297:311–315
4. Calpena AC, Lauroba J, Suriol M, Obach R, Doménech J (1994) Effect of d-limonene on the transermal permeation of nifedipine and domperidone. *Int J Pharm* 103:179–186
5. Campos FF, Calpena Campmany AC, Delgado GR, Serrano OL, Naveros BC (2012) Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies. *J Pharm Sci* 101:3739–3752
6. Casiraghi A, Ardovino P, Minghetti P, Botta C, Gattini A, Montanari L (2007) Semisolid formulations containing dimethyl sulfoxide and alpha-tocopherol for the treatment of extravasation of antineoplastic agents. *Arch Dermatol Res* 299:201–207
7. Chang C, Zhang L (2011) Cellulose-based hydrogels: present status and application prospects. *Carbohydr Polym* 84:40–53
8. Diepgen TL (2002) Long-term treatment with cetirizine of infants with atopic dermatitis: a multi-country, double-blind, randomized, placebo-controlled trial (the ETAC trial) over 18 months. *Pediatr Allergy Immunol* 13:278–286
9. Djekic L, Primorac M (2008) The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. *Int J Pharm* 352:231–239
10. Escribano E, Calpena AC, Queralt J, Obach R, Doménech J (2003) Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. *Eur J Pharm Sci* 19:203–210
11. Moller P, Fall A, Bonn D (2009) Origin of apparent viscosity in yield stress fluids below yielding. *Europhys Lett* 87:38004–38009
12. Pader M (1993) Dentifrice rheology. In: Laba D (ed) *The rheological properties of cosmetic and toiletries*. Marcel Dekker, New York, pp 247–273
13. Pennick G, Harrison S, Jones D, Rawlings AV (2010) Superior effect of isostearyl isostearate on improvement in stratum corneum water permeability barrier function as examined by the plastic occlusion stress test. *Int J Cosmet Sci* 32:304–312
14. Ritger PL, Peppas NA (1987) A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J Control Release* 5:37–42
15. Sandig AG, Campmany AC, Campos FF, Villena MJ, Naveros BC (2013) Transdermal delivery of imipramine and doxepin from newly oil-in-water nanoemulsions for an analgesic and anti-allodynic activity: development, characterization and in vivo evaluation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 103:558–565
16. Savić S, Savić M, Tamburić S, Vuleta G, Vesić S, Müller-Goymann CC (2007) An alkylpolyglucoside surfactant as a prospective pharmaceutical excipient for topical formulations: the influence of oil polarity on the colloidal structure and hydrocortisone in vitro/in vivo permeation. *Eur J Pharm Sci* 30:441–450
17. Siepmann J, Peppas NA (2001) Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev* 48:139–157
18. Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ (2005) Nano-emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 10:102–110
19. Vermeulen B, Remon JP, Nelis H (1999) The formulation and stability of erythromycin-benzoyl peroxide in a topical gel. *Int J Pharm* 178:137–141
20. Vlastos D, Stephanou G (1998) Effects of cetirizine dihydrochloride on human lymphocytes in vitro: micronucleus induction. Evaluation of clastogenic and aneuploidic potential using CREST and FISH assays. *Arch Dermatol Res* 290:312–318
21. Walsh GM (2002) Second-generation antihistamines in asthma therapy: is there a protective effect? *Am J Respir Med* 1:27–34
22. Wulff-Pérez M, Martín-Rodríguez A, Gálvez-Ruiz MJ, de Vicente J (2013) The effect of polymeric surfactants on the rheological properties of nanoemulsions. *Colloid Polym Sci* 291:709–716

