UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE FARMACIA

Análisis comparativo de los perfiles de liberación in vitro para diferentes formulaciones en gel con Diclofenaco dietilamonio como principio activo en Voltaren® Emulgel®, Katafenac® gel, Diclofedol® gel y Astefin® gel, mediante el uso de la membrana de huevo obtenida de la cáscara de huevo de gallina *Gallus gallus domesticus*, para la propuesta de un método de optimización de uso de la membrana, desarrollado en la Universidad Internacional de las Américas de enero a agosto de 2023

ALLAN MÉNDEZ CHAVERRI

TUTOR:
ADAM AMEY

Año 2023

MODALIDAD DE TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN FARMACIA

I. Resumen

El presente trabajo de investigación posee como objetivo general comparar los perfiles de liberación in vitro para diferentes formulaciones en gel con Diclofenaco dietilamonio como principio activo en Voltaren® Emulgel®, Katafenac® gel, Diclofedol® gel y Astefin® gel, mediante el uso de la membrana de huevo obtenida de la cáscara de huevo de gallina Gallus gallus domesticus.

Para logar el cumplimiento de este objetivo se realizó la caracterización de la membrana de cáscara de huevo para asegurar su uso adecuado durante los estudios de liberación in vitro. De igual manera, se optimizaron las variables para establecer la metodología de estos estudios y se realizaron los estudios de liberación para los cuatro productos propuestos en la investigación.

Mediante la evaluación de las cinéticas de orden cero y orden uno, se evidenció las diferencias en la formulación de los cuatro productos y el ajuste de estos ante estas cinéticas. Mediante la cinética de Higuchi y Korsmeyer-Peppas se determinó la velocidad de liberación de principio activo desde la matriz a través de la membrana y el fenómeno de difusión presente en cada producto, respectivamente.

Con la investigación se concluye que el Voltaren evidenció una diferenciación clara entre todos los productos, donde la cantidad de fármaco liberado por unidad de área fue evaluado mediante la cinética de Higuchi fue evidentemente superior a los demás, mientras que el producto Katafenac presentó las mayores diferencias entre los otros productos genéricos evaluados en la investigación considerando que fue el único de los productos que no presentó un ajuste a la cinética de orden cero.

II. Agradecimientos

Agradezco a mi familia y, en especial, a mi madre y padre pues sin el apoyo de ellos no hubiera podido lograr las metas que desde niño me establecí. Esta tesis es la culminación de todos los buenos deseos y trabajo arduo que mis padres realizaron por años para asegurar mi educación por ello, les agradezco infinitamente.

Agradezco a mi mejor amiga, Adriana por sus consejos y por siempre estar ahí, escuchándome. Agradezco todas las palabras de motivación desde que inicié mi carrera de farmacia hasta la culminación de la presente tesis.

A mis compañeros de carrera, ellos me aceptaron cálidamente, en especial María Guadalupe, Melany y Gabriel que compartieron tiempo de calidad conmigo y me apoyaron todo el tiempo. A Diana y Gabriela, por siempre apoyarme en muchas cosas y ofrecerme palabras de aliento para completar la tesis. Y a Karina, por estar ahí y apoyarme siempre.

A mi profesor, el Licenciado Adam Amey, por demostrarme que existen profesores comprometidos con la educación y el desarrollo de sus estudiantes, por aceptar este proyecto y por la guía brindada durante este proceso.

A la comunidad del Colegio Mundo Unido Costa Rica, por su disposición y apoyo en el desarrollo de la investigación. En especial, a mis actuales y exestudiantes que con su paciencia y sus palabras de apoyo me ayudaron a concluir esta etapa de la vida. En especial, a Carlos y Hana, que estuvieron ahí durante los experimentos apoyándome tanto en las buenas como en las malas.

A mi jefa, Paula Morán por todo el apoyo ofrecido desde que inicié la carrera y la flexibilidad que me otorgó para poder cumplir este sueño.

Al personal de PermeGear por su generosa donación de las celdas de difusión de Franz, sin ellos no hubiese sido posible la culminación de esta investigación.

III. Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo de investigación a mis padres, Hernán Méndez y Auria Chaverri que desde que inicié con mi carrera de Química Industrial hasta esta carrea de Farmacia han estado en todo momento ayudándome en todo sentido. Este título les corresponde porque sin sus sacrificios y esfuerzos jamás podría haber llegado donde estoy ahora. Los amo con todo mi corazón.

IV. Tabla de contenidos

I. Resumen ..... **ii**

II. Agradecimientos ..... **iii**

III. Dedicatoria ..... **iv**

IV. Tabla de contenidos ..... **v**

V. Lista de tablas ..... **vii**

VI. Lista de figuras ..... **viii**

VII. Lista de gráficas ..... **ix**

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN ***1***

1.1. Introducción 2
1.2. Planteamiento del problema 3
1.3. Objetivos 4
1.3.1. Objetivo general 4
1.3.2. Objetivos específicos 4
1.4. Justificación 5
1.5. Antecedentes 6
1.5.1. Antecedentes históricos 6
1.5.2. Antecedentes regionales 7
1.5.3. Antecedentes internacionales 8

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO ***11***

2.1. Productos farmacéuticos genéricos y originales 12
2.2. Productos de uso tópico 13
2.2.1 Tipos de productos tópicos 14
2.2.2 Productos tópicos con antiinflamatorios no esteroideos 16
2.2.3 Aprobación de productos farmacéuticos de uso tópico 19
2.3. Estudios de permeación in vitro (IVPT) y estudios de liberación in vitro (IVPR) 20
2.3.1. Membranas utilizadas en sistema IVRT 24
2.3.2. Cámara donante en sistema IVRT 25
2.3.3. Cantidad de producto en la cámara donante en sistema IVRT 26
2.3.4. Cámara receptora en sistema IVRT 26
2.3.5. Cuantificación del principio activo en la cámara receptora 27
2.3.6. Duración del estudio IVRT: tiempos de muestreo y número de réplicas 30
2.4. Permeación y liberación de fármacos tópicos 31
2.4.1. Aspectos generales del tejido de la piel 31
2.4.2. Transporte de drogas a través de la piel 33
2.4.3. Cinética de permeación de fármacos a través de membrana 34
2.5. Evaluación de la cinética de permeación de fármacos a través de membrana 35
2.5.1. Cinética de orden cero 36
2.5.2. Cinética de orden uno 36
2.5.3. Cinética de Higuchi 36
2.5.4. Cinética de Korsmeyer-Peppas 37
2.5.5. Cálculo de cantidad acumulada de fármaco en el tiempo 38
2.6. Estudios de liberación in vitro con membrana de cáscara de huevo 38
2.6.1. Composición de la membrana de la cáscara de huevo 38
2.6.2. Extracción y separación de la membrana de la cáscara de huevo 40
2.6.2.1. Métodos no-químicos de extracción de la MCH 40
2.6.2.2. Métodos químicos de extracción de la MCH 41

2.6.2.3. Métodos enzimáticos de extracción de la MCH....43
2.6.3. Caracterización de la MCH....43
2.6.3.1. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier....43
2.6.3.2. Adsorción con azul de metileno e isotermas de adsorción....45

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO....48

3.1 Tipo de investigación....49
3.2 Fuentes de información....50
3.2.1. Fuentes de información primaria....50
3.2.2. Fuentes de información secundaria....51
3.3 Criterios de búsqueda de información....51
3.4 Criterios de exclusión e inclusión....52
3.5 Clasificación de información según el nivel de evidencia....54
3.6 Variables de la investigación....54
3.7 Procedimiento de recolección y análisis de datos....56
3.8 Instrumentos y técnicas....57
3.9 Materiales, reactivos, equipos y condiciones....57
3.9.1. Extracción de la membrana de la cáscara de huevo....57
3.9.2. Estudios de liberación in vitro....58
3.9.3. Componentes reactivos....59
3.9.4. Equipos electrónicos....60
3.10 Diseño de Experimentos....61
3.10.1 Extracción de la membrana de la cáscara de huevo....61
3.10.1.1 Preparación de las soluciones acuosas de ácido acético....61
3.10.1.2 Separación del contenido interno del huevo....61
3.10.1.3 Separación de la MCH de la cáscara de huevo....62
3.10.2 Evaluación de la capacidad adsorbente de la MCH....64
3.10.3 Caracterización de la MCH por espectroscopía infrarroja (IR)....65
3.10.4 Optimización de las condiciones experimentales de los perfiles de liberación....66
3.10.4.1 Evaluación de la linealidad del sistema....66
3.10.4.2 Evaluación del tiempo de remojo de la MCH en buffer pH 7.0....67
3.10.4.3 Determinación del tiempo total del estudio de liberación....67
3.10.5 Obtención de las absorbancias para la construcción de los IVRTs de los productos tópicos68

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS....75

4.1 Establecer las condiciones óptimas de obtención de la membrana de cáscara de huevo natural mediante la manipulación de variables experimentales asociadas al proceso.....76
4.2 Optimización de los parámetros experimentales de los estudios de liberación in vitro.....89
4.3 Determinación de las posibles diferencias en el comportamiento de liberación del fármaco en las distintas formulaciones de diclofenaco gel, mediante el análisis de las curvas de concentración de fármaco liberado en función del tiempo de las formulaciones analizadas. 100

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES....118

5.1 Conclusiones....119
5.2 Recomendaciones....121

CAPÍTULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS....123

CAPITULO VII: ANEXOS....137

V. Lista de tablas

Tabla 1. Resumen de métodos químicos de la extracción de la MCH de la cáscara de huevo. 42
Tabla 2. Criterios de búsqueda de información consultados para la investigación. 51
Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión considerados en la investigación.....53
Tabla 4. Cuadro de evidencias según Sackett.....54
Tabla 5. Operacionalización de las variables.....55
Tabla 6. Materiales necesarios para la extracción de la membrana de la cáscara de huevo y su descripción 58
Tabla 7. Materiales para realizar los estudios de liberación y su descripción 59
Tabla 8. Lista de reactivos necesarios para la realización de los estudios de liberación.....59
Tabla 9. Lista de equipos electrónicos necesarios para obtener la data necesaria para la investigación 60
Tabla 10. Masas y porcentaje de recuperación de la MCH obtenidas a partir de diversas concentraciones de ácido acético, en la primera determinación. 77
Tabla 11. Masas y porcentaje de recuperación de la MCH obtenidas a partir de diversas concentraciones de ácido acético, en la segunda determinación. 78
Tabla 12. Masas y porcentaje de recuperación de la MCH obtenidas a partir de diversas concentraciones de ácido acético, en la tercera determinación. 78
Tabla 13. Coeficientes de variación (CV) para los porcentajes promedio de recuperación de MCH obtenidas a partir de diversas concentraciones de ácido acético. 79
Tabla 14. Datos de concentración inicial y en equilibrio en conjunto con la cantidad de AM en equilibrio 83
Tabla 15. Datos de concentración inicial y en equilibrio en conjunto con la cantidad de diclofenaco dietilamonio en equilibrio 86
Tabla 16. Datos de concentración inicial y en equilibrio en conjunto con la cantidad de diclofenaco dietilamonio en equilibrio 94
Tabla 17. Valores de absorbancia de diclofenaco sódico que logró atravesar la MCH obtenido durante la prueba de remojo de membrana a los 15 y 30 minutos de muestreo 95
Tabla 18. Valores de Qn y raíz cuadrada del tiempo, necesario para obtener las cinéticas de Higuchi.....96
Tabla 19. Datos de velocidad de liberación, valor de R^2 y % recuperación obtenida para el Voltaren® a tres tiempos finales diferentes.....98
Tabla 20. Valores de Q acumulado liberado promedio obtenidos en los estudios IVRT con respecto al tiempo para Voltaren, Astefin, Katafenac y Diclofedol. 102
Tabla 21. Valores de (Q remante), ln (Q remante) obtenidos con el tiempo para el producto Voltaren. 105
Tabla 22. Valores de (Q remante), ln (Q remante) obtenidos con el tiempo para el producto Astefin.....105
Tabla 23. Valores de (Q remante), ln (Q remante) obtenidos con el tiempo para el producto Katafenac. 106
Tabla 24. Valores de (Q remante), ln (Q remante) obtenidos con el tiempo para el producto Diclofedol. 106
Tabla 25. Valores de coeficiente de determinación, R^2, obtenidos en las cinéticas de orden cero y orden uno para Voltaren, Astefin, Katafenac y Diclofedol.....108

Tabla 26. Valores de cantidad de fármaco µg liberado por unidad de área obtenidos con el tiempo para Voltaren, Astefin, Katafenac y Diclofedol. 109
Tabla 27. Límite superior e inferior para las comparaciones entre producto genérico contra referencia 113
Tabla 28. Valores de log (Q_t/Q_∞) y obtenidos con el tiempo para Voltaren, Astefin, Katafenac y Diclofedol. 114
Tabla 29. Valores de n obtenidas a partir de las pendientes de la cinética de Korsmeyer–Peppas. 116
Tabla 30. Comparación de los valores de K_H obtenidas al inicio y al final de la investigación 117

VI. Lista de figuras

Figura 1. Uso del IVPT para diferenciar formulaciones de diversas proporciones de excipiente de un producto genérico contra el original 14
Figura 2. Estructuras químicas de a) diclofenaco sódico, b) diclofenaco potásico y c) diclofenaco dietilamonio.....17
Figura 3. Mecanismo de acción del diclofenaco.....18
Figura 4. Uso del IVPT para diferenciar formulaciones de diversas proporciones de excipiente de un producto genérico contra el original 20
Figura 5. Esquema representativo de una cámara de difusión vertical con sus componentes. Fuente modificado de Santos[42]. 22
Figura 6. Esquema representativo de una cámara de difusión vertical abierto (A) y cerrado (B) con sus componentes 23
Figura 7. Celda de difusión “side-bi-side cell”. 23
Figura 8. Celda de difusión a la izquierda con chaqueta y a la derecha sin chaqueta 24
Figura 9. Efecto de la membrana en la liberación in vitro del principio activo aciclovir. 25
Figura 10. Espectrofotómetro UV-vis marca Vernier. 29
Figura 11. Ilustración de los componentes de la epidermis 32
Figura 12. Anatomía de un huevo y membranas del huevo. 39
Figura 13. Espectro infrarrojo de la membrana de cáscara de huevo de 1660 a 800 cm^{-1}. ..44
Figura 14. Efecto del tipo de ácido usado sobre la cáscara de huevo 45
Figura 15. Calentamiento de las disoluciones de ácido acético de varias concentraciones a 62
Figura 16. MCH obtenidas después del proceso de extracción en medio ácido 63
Figura 17. Espectrofotómetro infrarrojo Agilent Cary 630 FTIR utilizado en la investigación 65
Figura 18. Membrana de la cáscara de huevo colocada sobre el orificio de la cámara receptora de Franz.....69
Figura 19. Aplicación de la muestra sobre la MCH una vez fijada sobre la cámara receptora.....70
Figura 20. Distribución de la muestra sobre la MCH situada sobre la cámara receptora. 71
Figura 21. Colocación del anillo de teflón sobre la cámara receptora de Franz que dispone de la MCH con la muestra aplicada del fármaco. 72
Figura 22. Colocación de la cámara donante sobre el anillo de teflón y membrana 72

Figura 23. Celda de Franz ensamblada 73
Figura 24. Celdas de difusión de Franz colocadas en el baño maría 74
Figura 25. Espectro IR de la MCH obtenido en la primera extracción mediante extracción con disoluciones de ácido acético a distintas concentraciones en un intervalo de 0.5 a 1.5 M. 80
Figura 26. Espectro IR de la MCH obtenido en la primera extracción mediante extracción con disoluciones de ácido acético a distintas concentraciones en un intervalo de 0.5 a 1.5 M. 81
Figura 27. Espectro IR de la MCH obtenido en la primera extracción mediante extracción con disoluciones de ácido acético a distintas concentraciones en un intervalo de 0.5 a 1.5 M. 81
Figura 28. Ensamblaje de la cámara de difusión de Franz: A) equipo necesario, B) colocación de la membrana, C) anillo de teflón, D) aplicación de la muestra, E) cámara donante y F) prensa de bloqueo de cámaras 92

VII. Lista de gráficas

Gráfica 1. Isotermas de Langmuir obtenidas para la adsorción de AM con la MCH.....83
Gráfica 2. Isotermas de Freundlich obtenidas para la adsorción de AM con la MCH 85
Gráfica 3. Isotermas de Langmuir obtenida para la adsorción de diclofenaco sódico con la MCH 88
Gráfica 4. Isotermas de Freundlich obtenida para la adsorción de diclofenaco sódico.....88
Gráfica 5. Curvas de calibración de diclofenaco sódico (DS) obtenidas a 275 nm en el día 1. 93
Gráfica 6. Curvas de calibración de diclofenaco sódico (DS) obtenidas a 275 nm en el día 2. 93
Gráfica 7. Cinética de Higuchi del Voltaren® obtenida hasta los 90 minutos de muestreo.96
Gráfica 8. Cinética de Higuchi del Voltaren® obtenida hasta los 240 minutos de muestreo. 97
Gráfica 9. Cinética de Higuchi del Voltaren® obtenida hasta los 300 minutos de muestreo. 97
Gráfica 10. Curva de liberación de diclofenaco en Voltaren® realizado en 90 y 240 minutos respectivamente 99
Gráfica 11. Cinéticas de orden cero para los cuatro productos evaluados.....103
Gráfica 12. Cinéticas de orden uno para los cuatro productos evaluados 107
Gráfica 13. Cinéticas de Higuchi para los cuatro productos evaluados.....110
Gráfica 14.Cinéticas de Korsmeyer-Peppas para los cuatro productos evaluados. 115

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN

1.1.Introducción

Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos corresponden a un grupo de fármacos de gran utilidad para la población en general debido a su fácil acceso, diversas formas farmacéuticas disponibles y por su evidenciada efectividad en el manejo de dolor de diversas fuentes[1]. El diclofenaco, un antiinflamatorio esteroideo, en su forma de dimetilamonio se encuentra presente como principio activo en diversas marcas comerciales en forma de gel y cremas para el manejo sistémico del dolor.

Debido a la gran diversidad de marcas comerciales de medicamentos, se ha generado una clasificación de estos mismos basados en principios de calidad, seguridad y efectividad. Esta clasificación permite identificar los medicamentos llamados líderes o innovadores de aquellos denominados como genéricos y biosimilares. A diferencia de los medicamentos orales, a los cuales se les pueden realizar estudios de bioequivalencia in vivo e in vitro, los medicamentos destinados para uso tópico necesitan ser estudiados y analizados de una manera muy diferente[2].

Los estudios de permeabilidad de membrana son experimentos que permiten evaluar la eficacia de la liberación transdérmica de fármacos tópicos. Permiten, además, discernir características entre formulaciones y evaluar velocidades de difusión a través de membranas epiteliales[3]. Por tanto, estos estudios son una herramienta versátil que se utiliza para evaluar entre diversas formulaciones y, por ende, comparar marcas comerciales entre sí.

Para realizar los estudios de permeabilidad es necesario tener a disposición un equipo de transferencia entre dos medios, uno aceptor y el otro receptor. Ambos separados a través de una membrana. Esta membrana, de acuerdo con la finalidad de los estudios, puede incluir tejido humano o animal ex vivo, tejidos vegetales, membranas naturales y sintéticas. [3].Una membrana que ha tenido utilidad en los estudios de permeabilidad ha sido la membrana de cáscara de huevo.

La membrana de cáscara de huevo se obtiene a partir de métodos de separación física y química de huevos de gallina u otras especies. Esta membrana se utiliza para evaluar la eficacia de la transferencia de un principio activo de un medio acuoso a otro, de manera que,

de existir diferencias en las formulaciones de los productos, se evidencia en la velocidad de permeación del activo.[4]

De esta manera, es importante evaluar de forma in sílio el parámetro de permeabilidad de formas farmacéuticas tópicas con el objetivo de asegurarle al paciente la eficacia y calidad de los productos que consume.

1.2.Planteamiento del problema

Los medicamentos tópicos antiinflamatorios están destinados al alivio casi inmediato del dolor localizado en zonas específicas del cuerpo. El diclofenaco, en su forma sódica, potásica y dietilamonio, es uno de los antiinflamatorios no esteroides más utilizados por parte de la población. De acuerdo con Maanvizhi, Iyyappan y Bhavishi,[5] para elucidar acciones farmacológicas de productos tópicos, y con ello clasificarlos ya sea en genéricos o bio similares se deben realizar pruebas de rendimiento como la de difusión a través de membrana.

La FDA (Food and Drug Administration) recomienda un sistema vertical de difusión para la evaluación de la permeabilidad a través de membrana de fármacos de liberación tópica[5]. El sistema más utilizado para lograr este objetivo es el sistema de difusión de Franz, el cual consiste en una cámara denominada donadora y otra receptora, separados por una membrana[6]. Esta membrana representa uno de los retos principales en los sistemas de difusión, debido a que la naturaleza de la membrana afectará los resultados de los estudios de permeabilidad.

El sistema de difusión de Franz es un sistema complejo y de elevado precio; además, la membrana que se utiliza es de carácter sintético y de igual manera, de precio alto. Por esta razón, se propone un sistema modificado de Franz con el uso de una membrana de fácil adquisición la cual corresponde a la membrana interna de la cáscara de huevo. Con esta membrana se han documentado diversas aplicaciones, una de las más relevantes y se que se aborda en el presente estudio, corresponde a su uso como material simulado del tejido de la piel pues posee la característica de ser de bajo costo y, además, biodegradable[4].

Por otra parte, es necesario evaluar diversas marcas comerciales que ofrecen el mismo producto farmacéutico con el objetivo de lograr una diferenciación o no de las mismas, esto

le permitirá al consumidor decidir cuál producto o marca le beneficia más. La membrana de cáscara de huevo podría ser usada en el sistema modificado de Franz como una alternativa sencilla a nivel de laboratorio para obtener datos cuantificables de la permeabilidad a través de membrana. También, ofrecerá información valiosa al formulador farmacéutico para innovar en los productos que formula.

De acuerdo con lo anterior, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo se puede utilizar y optimizar el uso de la membrana de huevo obtenida de la cáscara de huevo de gallina *Gallus gallus domesticus* para el análisis comparativo de los perfiles de permeabilidad in vitro para diferentes formulaciones en gel con Diclofenaco dietilamonio como principio activo en Voltaren® Emulgel®, Katafenac® gel, Diclofedol® gel y Astefin® gel?

1.3.Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Comparar los perfiles de liberación in vitro para diferentes formulaciones en gel con diclofenaco dietilamonio como principio activo en Voltaren® Emulgel®, Katafenac® gel, Diclofedol® gel y Astefin® gel, mediante el uso de la membrana de huevo obtenida de la cáscara de huevo de gallina Gallus gallus domesticus.

1.3.2. Objetivos específicos

- Establecer las condiciones óptimas de obtención de la membrana de cáscara de huevo natural mediante la manipulación de variables experimentales asociadas al proceso
- Optimizar los parámetros experimentales de los estudios de liberación in vitro (IVRT).
- Determinar si existen diferencias en el comportamiento de liberación del fármaco en las distintas formulaciones de diclofenaco gel, mediante el análisis de las curvas de concentración de fármaco liberado en función del tiempo de las formulaciones analizadas.

1.4.Justificación

Uno de los motivos para la elaboración de estudios de permeabilidad para productos de uso tópico es precisamente retar la formulación de los productos comerciales en términos de su similitud o no. La formulación y la potencia del principio activo en el producto farmacéutico deben ser lo suficientemente idóneas para realizar, de manera correcta, los análisis comparativos entre productos que incluyen estudios de bioequivalencia in vivo, estudios de permeación in vitro y estudios de farmacodinamia[7].

Para productos de uso tópico, los métodos más adecuados para realizar estudios de permeación son aquellos que utilizan membranas de origen animal y humano, conocido como sistema ex vivo. Tiene la ventaja de lograr simular, de manera muy cercana, la permeación de un fármaco a través de la piel, pero posee la desventaja de la disponibilidad del tejido, estabilidad del tejido[8] y de acuerdo con Wei *et al*[9] cadáveres de humanos y animales suelen ser usados en investigaciones, pero eso incluiría consideraciones éticas y, además, el tejido es susceptible a cambios después de la hora de muerte. Otra alternativa constituye el uso de membranas artificiales de origen sintético y natural que permitan bajar los costos y simplificar los sistemas de permeación.

De tal manera, se considera de gran importancia la elaboración de un método de permeación in vitro utilizando sistemas de bajo costo y, en especial, con el uso de membranas de fácil obtención y simplicidad. La membrana extraída de la cáscara de huevo posee muchas aplicaciones tales como: catálisis en síntesis orgánica, biocatálisis, procesos de gasificación, como biomaterial sustituto de tejidos[10], entre otros. Sin embargo, la relevancia de esta membrana en el presente proyecto consiste en utilizarla en estudios de permeación in vitro demostrada en diversos estudios ya realizados con diversos productos farmacéuticos[11].

La membrana de la cáscara de huevo se puede extraer por diversos métodos que incluyen físicos, químicos y enzimáticos[12]. Sin embargo, el método de extracción química mediante el uso de sustancias ácidas de concentraciones variadas ha sido reportado como uno de los métodos más sencillos y confiables para la obtención de la membrana. Aunque dicho método de extracción requiere optimización, el proceso en sí no implica una inversión económica elevada y el proceso requiere como máximo 24 horas para lograr la extracción[13];

así, resulta un método sencillo y fácilmente aplicable para cualquier laboratorio con un mínimo de materiales y equipo.

Una vez obtenida la membrana de la cáscara de huevo, esta se puede usar hasta por un tiempo de 30 días si se conserva de manera adecuada. Por tanto, esta membrana representa una forma alternativa y económicamente viable para su uso en estudios de permeabilidad de fármacos de uso tópico. Además, la metodología propuesta en el presente trabajo representará un inicio importante para establecer metodologías de estudios de permeabilidad in vitro para diversos productos farmacéuticos.

1.5.Antecedentes

1.5.1. Antecedentes históricos

En el siguiente apartado, se presentan una serie de antecedentes históricos ligados con el uso y extracción de la membrana de la cáscara de huevo para diversos fines relacionados con la presente investigación. Además, se incluyen antecedentes vinculados con estudios de permeabilidad de fármacos de uso tópico.

Tari, et al[14]., utilizaron la membrana de cáscara de huevo para entender los procesos de difusión de nanopartículas y aminoácidos. Realizaron microscopia de escaneo electrónico para evaluar la porosidad de la membrana que extrajeron de forma manual y en un sistema modificado de Franz, que es el sistema estándar de difusión, evaluar la difusión a través de membrana.

Los investigadores lograron observar la relación de difusión en m^2 s^{-1} para las nanopartículas solas y en combinación con aminoácidos. Determinaron la efectividad de estas moléculas, pues son capaces de atravesar la membrana en diversos niveles de difusión. Concluyeron afirmando la utilidad de dicha membrana en futuros estudios de permeabilidad in vitro para diversos productos farmacéuticos.

En la investigación de Yanin, Shi et al.[4], se hace un resumen exhaustivo de las diversas aplicaciones de la membrana de la cáscara de huevo que incluyen desde propiedades antioxidantes, curación de heridas, inmovilización, actividad antimicrobiana, salud de la

microbiota intestinal e ingeniería de tejidos. Además, se menciona los componentes de la membrana y las características de ésta.

Los investigadores concluyen que la membrana obtenida de la cáscara de huevo no posee características que la clasifiquen como peligrosa para uso y consumo humano. Inclusive, se menciona su potencial en otras áreas como en baterías, como alternativa a las de litio y en capacitadores en lugar de los materiales usualmente usados a base de carbono.

Tanifuji et al[15]., utilizaron la membrana de la cáscara de huevo como alternativa de filtro en celdas de combustión protón-conductancia (PEFC por sus siglas en inglés) comparada con el sistema control usando una membrana de Nafion. Los investigadores escogieron esta membrana debido a que posee características de buena porosidad al dióxido de carbono, estabilidad térmica y buena reciclabilidad. Además, la membrana fue caracterizada mediante sistema de barrido calorimétrico, espectroscopia infrarroja y energía de dispersión de rayos X.

Dentro de los resultados obtenidos, los investigadores encontraron que la membrana de cáscara de huevo acoplada con la celda PEFC posee una generación de electricidad mucho menor al sistema control utilizando una membrana de Nafion acoplada a la misma celda. No obstante, el sistema de membrana de cáscara de huevo con la celda PEFC posee un costo mucho menor que el sistema control y recomienda usar huevos de avestruz para obtener membranas de tamaños mayores.

1.5.2. Antecedentes regionales

No se lograron encontrar antecedentes de carácter nacional de manera que en el siguiente apartado se adjuntan los antecedentes regionales relacionados con el uso de la membrana de la cáscara de huevo en diversas investigaciones.

Velloso, Andreetta y Landoni[16] en su investigación acerca del efecto de dos surfactantes en la permeabilidad in vitro de butorfanol usando un sistema membranal de mucosa nasal equina, evaluaron tres diferentes fórmulas: una sin surfactante, otra con cetrimida y otra con Tween 80. Los investigadores lograron demostrar diferencias en

parámetros farmacocinéticos como el valor de flujo máximo Jss, había diferencias estadísticas entre las fórmulas propuestas.

Por otra parte, los investigadores concluyen que el surfactante Tween 80 aumenta significativamente la permeación del fármaco a través de la mucosa nasal equina. Este hallazgo es significativo dado que la droga butorfanol es lipofílica y requiere de surfactantes para poder incrementar su difusión a través de membranas biológicas.

En la investigación realizada por Silva, G., Araújo, C., Gonsalves, A[17] se obtuvo la membrana de cáscara de huevo a partir del método químico utilizando ácido acético al 10.0% volumen/volumen. Esta membrana se secó y pulverizó para cargar una droga lipofílica llamada nimesulida con el objetivo de mejorar la liberación de la droga usando la membrana de cáscara de huevo como matriz polimérica.

En esta investigación, se evalúa la cinética de liberación del fármaco mediante modelo de orden cero, primer orden, Higuchi y Peppas. Se demostró, mediante espectroscopia infrarroja, la adhesión del fármaco a la membrana de cáscara de huevo, sus propiedades adsorbentes y, además, esta membrana posee un alto potencial de uso como agente en sistemas farmacéuticos de liberación prolongada.

Mendoza, Chávez y Araya[18] evaluaron el uso de la membrana de la cáscara de huevo como alternativa de cicatrización en una serie de ratones albinos machos. Lograron demostrar que con la membrana de cáscara de huevo la velocidad de curación aumentó comparada con el grupo control; además, observaron las diferencias estadísticas entre el tratamiento con la membrana antes mencionada y el tratamiento convencional.

Las características de la membrana de la cáscara de huevo le permiten ser utilizada como membrana orgánica sustituto de la piel. Los investigadores corroboraron dicho uso con los animales de experimentación. La conclusión principal de la investigación radica en que esta membrana dadas sus características posee potencial biomédico y en bioingeniería.

1.5.3. Antecedentes internacionales

A continuación, se presentan una serie de antecedentes de carácter internacional referidos al uso de la membrana de la cáscara de huevo como alternativa en los estudios de permeabilidad in vitro de diversos fármacos de uso tópico.

Por otra parte, los investigadores Astuti et al.[19], prepararon una formulación tópica con diclofenaco y Carbopol 940. Se realizaron estudios de difusión del fármaco a través de un sistema de celda de difusión vertical utilizando filtros Whatman n1 como membrana, la cual fue preparada mediante un sistema de inmersión con una solución compuesta de vaselina, ácido palmítico y aceite de oliva. El diclofenaco fue cuantificado utilizando un equipo de espectrofotometría ultravioleta a 277 nm, para los estudios de permeabilidad.

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que la difusión del diclofenaco es dependiente del pH del medio. Cuando el pH toma un valor de 8 se obtiene la máxima difusión posible, comparado con otros pHs como 7 y 6. Según los autores, este fenómeno ocurre por la buena solubilidad del diclofenaco, este aumenta en medios alcalinos; sin embargo, el pH de la piel es cercano a 7, por tanto, formulaciones tópicas con este principio activo deben considerar dicho valor de pH.

Siraj, et al [20] en su propuesta acerca de la formulación y caracterización de piroxicam crean una formulación emulgel de este principio activo. La formulación fue evaluada en diversos parámetros como fotomicrografía, viscosidad, difusión en piel y estudios de liberación in vitro utilizando una membrana de celofán, evaluado después mediante modelos cinéticos de orden cero, primer orden, Higuchi y Peppas.

Los autores lograron demostrar que las formulaciones propuestas se ajustan a la modelo cinética de Peppas el cual indica que la liberación del principio activo de la formulación está regida por combinación de procesos físicos como hinchamiento, erosión y difusión. Esta conclusión es importante para los formuladores ya que conociendo los fenómenos de liberación se toman decisiones en términos de uso o no de ciertos excipientes en la formulación del producto en investigación.

Manian, et al.[21], en su investigación acerca de la liberación in vitro de productos tópicos que contienen diclofenaco, aplicaron un sistema de liberación vertical utilizando baño

de agua a 32 grados Celsius, en el cual cada celda de difusión se encontraba separada por una membrana sintética (Nylon y acetato de celulosa). Se usó una cámara receptora con buffer salino de fosfato pH 7.4 y se midió la cantidad de fármaco liberado por un rango de 6 h.

Además, el método de liberación de fármaco fue validado mediante la evaluación de la capacidad inerte de la membrana, linealidad, precisión, sensibilidad, especificidad y recuperación de principio activo. Esta validación fue importante dado que el método fue capaz de diferenciar los cambios de la composición de las formulaciones, principalmente a que existieron diferencias en la permeación en membrana artificial. Por otro lado, se menciona la relevancia de los estudios de permeabilidad del fármaco con el objetivo de comparar formulaciones; no obstante, estos estudios se limitan a resultados a nivel in vitro y se debe indagar más en estudios a nivel clínico.

En la investigación realizada por Iliopoulos et al., [22] se evalúa el perfil de difusión de diclofenaco in vitro e in vivo. Para el sistema in vitro se usó celdas de difusión de Franz usando una membrana de epidermis humana. Los experimentos además fueron realizados usando un buffer salino de pH 7.3 para la cámara receptora a 32 grados Celsius. Además, la cuantificación de diclofenaco se realizó mediante un sistema de HPLC. La integridad de la piel humana fue examinada constantemente para poder ser usada a través del estudio.

En términos generales, según los hallazgos obtenidos por los investigadores se encuentra que el método propuesto para evaluar la liberación de diclofenaco sódico demostró que las diferencias de difusión del fármaco a través de membrana están directamente relacionadas con la composición de los excipientes en las fórmulas. En este caso específico, la presencia de moléculas lipofílicas como oleato de decilo aumentan la difusión a través de la membrana de diclofenaco y dicha permeación también incrementa, significativamente, en cuanto a la concentración del oleato.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1.Productos farmacéuticos genéricos y originales

El mercado de productos farmacéuticos es un mercado competitivo y de constante actualización. Busca como objetivo ofrecer una diversidad de productos para el tratamiento de diversas enfermedades y dolencias en general, siempre enfocado en ofrecer productos de calidad y de efectividad asegurada. Las empresas farmacéuticas tienen los derechos y patentes aseguradas de aquellos productos que, por muchos años, han trabajado para su comercialización en el mercado, lo cual, en muchos casos, pueden tomar décadas pues se evalúa la seguridad del producto, inclusive en años posteriores a su liberación en el mercado, a estos productos se les llama productos originales o innovadores[23].

Una de las problemáticas en el desarrollo de productos farmacéuticos se da cuando las empresas desarrolladoras de estos productos originales cuentan con los derechos de las patentes y se les otorga los derechos exclusivos de producir el producto en un rango de tiempo específico, después de que pase este tiempo la patente es liberada y otras empresas farmacéuticas pueden desarrollar sus propias formulaciones basadas en el producto original. De esta manera, se logra la comercialización del producto, a estos productos se les conoce como genéricos [24].

Los productos genéricos son copias del producto original. Contienen el mismo principio activo, dosis, forma farmacéutica y bioequivalencia[23]. De acuerdo con la OMS[25], el uso de medicamentos genéricos reduce de manera efectiva el costo de medicinas tanto para los pacientes como para los países que lo comercializan. Un caso particular corresponde con la evolución de medicamentos retrovirales cuando el precio por paciente en los Estados Unidos cambió de 10 000 dólares americanos a 100 dólares americanos al año, este beneficio permite el acceso a este tipo de medicamentos para la población que lo requiera.

Los productos clasificados como medicamentos genéricos son más baratos debido a que no necesitan repetir el descubrimiento ni los estudios clínicos y preclínicos[26]. Sin embargo, aún después de la liberación de patentes de productos farmacéuticos y con la presencia en el mercado del producto original y del genérico, los pacientes suelen presentar cierta lealtad hacia el producto original ya que estuvo en el mercado con anterioridad y, por ende, genera confianza al paciente en términos de seguridad; inclusive, esto permite a las

empresas farmacéuticas subir los precios de sus productos originales y competir con los medicamentos genéricos[24].

Por otra parte, los productos genéricos necesitan ser aprobados para poder asegurar su calidad y su efectividad. Dicha aprobación requiere una demonstración de intercambiabilidad o también llamada equivalencia terapéutica ante el producto innovador[25]. Esta bioequivalencia se alcanza cuando la velocidad y el grado de absorción del fármaco, tanto en el producto original como en el genérico no presentan diferencias estadísticamente significativas, el rango porcentual aceptado por la FDA para que un genérico demuestre bioequivalencia es de 80 al 125% respecto del producto original[26].

2.2.Productos de uso tópico

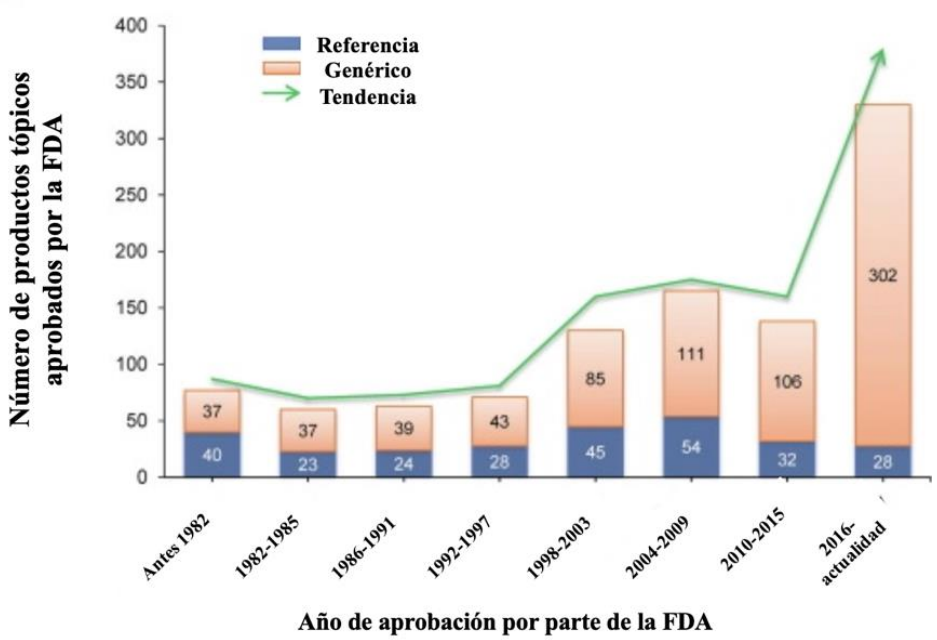
Los productos tópicos para uso dermatológico son aquellos formulados con el objetivo de ser aplicado en la superficie exterior de la piel para el tratamiento de enfermedades de la piel, y corresponden a los medicamentos más útiles en el área de la dermatología y farmacéutica[27]. Estos productos poseen la característica de poder ser usados fácilmente por el paciente y se encuentran en una gran variedad de presentaciones como cremas, ungüentos, geles, lociones y emulsiones. Por otra parte, este tipo de productos deben asegurar una correcta penetración de la piel para lograr su efecto terapéutico[28].

Los productos de uso tópico, al igual que aquellos productos farmacéuticos destinados para administración oral, se pueden encontrar en su forma genérica y original. No obstante, a diferencia de los productos de administración enteral, los de uso tópico no llevan los mismos estudios de bioequivalencia debido a que el sitio de administración es completamente diferente, aun así, la FDA establece que, en estos casos, los estudios in vitro entre productos representan una manera efectiva de comparación, y mitigan las probabilidades de falla terapéutica[27].

Los productos tópicos poseen un valor de mercado bastante elevado, solo en los Estados Unidos de América este tipo de productos poseen un valor de 92.4 mil millones de dólares y se espera que para el año 2027 alcance los 129.9 mil millones de dólares. Este mercado está dominado primordialmente por productos genérico. Como se logra observar en

la figura 1, casi un 74% de los productos son genéricos derivados de los denominados originales. Queda claro que lociones, cremas, ungüentos y espray dominan el mercado, y poseen diversidad de formulaciones desde combinaciones con agua, surfactantes, aceites entre otros y tienen rangos de viscosidad variados[29].

Figura 1. Uso del IVPT para diferenciar formulaciones de diversas proporciones de excipiente de un producto genérico contra el original



Fuente: modificado de la fuente Raney[30]

2.2.1 Tipos de productos tópicos

Los sistemas farmacéuticos de tipo semi-sólidos comprenden una gran variedad de productos y cuando se aplican en la piel o en una mucosa sensible tienden a aliviar alguna molestia o, más específicamente, tratan una condición patológica, también suelen usarse para proteger la piel de fuentes externas[30]. La variedad de estos productos y uso dependerá de su función y en el siguiente apartado se mencionarán algunos de los productos semisólidos más comunes.

2.2.1.1.Cremas y lociones

Tanto las cremas como las lociones son ejemplo de emulsiones farmacéuticas, es decir, sistemas de dos fases termodinámicante inestables que contienen al menos dos líquidos -aceite y agua- inmiscibles, donde uno de ellos se encuentra disperso en forma de gotas sobre el otro. La fase que presenta las gotas se llama interna y la matriz en la cual estas gotas se dispersan se llama externa. Para estabilizar estas formulaciones se necesita la adición de surfactantes para disminuir la tensión superficial entre ambas fases. En una emulsión, la sustancia activa puede estar presente ya sea en la fase oleosa o acuosa[31].

Una crema contiene en su fórmula más de un 20% agua y solventes volátiles, y menos de 50% corresponde a hidrocarburos y ceras. Además, las cremas pueden ser sistemas de aceite en agua o agua en aceite. Las lociones, por otro parte, tienden a ser más líquidas que las cremas con una menor viscosidad, la mayoría de las lociones en el mercado son del tipo aceite en agua[30]. Las emulsiones de agua en aceite suelen ser muy poco grasientas, se pueden dispersar fácilmente en la piel, promueven una capa protectora que permanece en la piel y provoca un efecto de enfriamiento[32].

2.2.1.2.Geles, ungüentos

Un gel consiste en partículas suspendidas en un medio de dispersión. Estas partículas llevan un gran grado de entrecruzamiento cuando se exponen en un medio hidratado, así forman una red tridimensional y otorgan rigidez a la dispersión[30]. Los geles suelen aplicarse fácilmente sobre la piel y se usan, por lo general, para tratamientos dérmicos, lubricación u otras aplicaciones como el uso vaginal[29].

Los ungüentos son preparaciones semi-sólidas más viscosas que contienen ingredientes suspendidos o completamente disueltos, la ventaja de los ungüentos es que la potencia del principio activo en la formula se incrementa debido al vehículo oleoso al permitir un aumento de la permeabilidad[32] Las bases más comunes de los ungüentos corresponden a petrolato y aceite mineral y las proporciones de estos suelen modificarse de acuerdo con el objetivo de la formulación[30]. Dada su naturaleza oleosa, estos productos

pueden manchar la ropa y debido a que muchos principios activos poseen solubilidad baja en aceite, los productos farmacéuticos en ungüentos suelen ser escasos[29].

2.2.2 Productos tópicos con antiinflamatorios no esteroideos

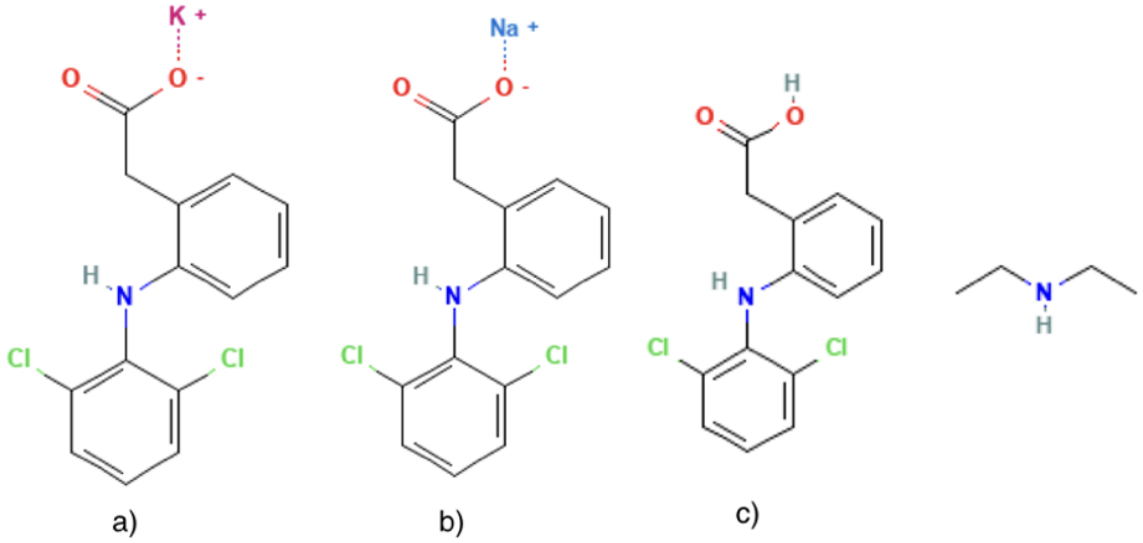
Los analgésicos tópicos incluyen una gran diversidad de productos de venta libre, así como también de prescripción. Solamente en los Estados Unidos, los medicamentos tópicos para el dolor representaban el 6% del mercado farmacéutico y gran parte de ese porcentaje se debe principalmente a antinflamatorios no esteroideos (AINEs). Los productos tópicos para el dolor poseen la ventaja de una marcada reducción de los típicos efectos adversos de los AINEs de uso oral, especialmente, la gastro-lesividad de la gran mayoría; no obstante, los productos tópicos igualmente poseen limitantes en cuanto a su farmacocinética[33].

La penetración de la droga es un factor importante para considerar en los productos tópicos, datos farmacocinéticos de AINEs tópicos demuestran niveles de droga en plasma de menos del 10% de su respectiva concentración en su forma oral, de ahí que sea importante tener en cuenta el equilibrio entre oleosidad de la formulación y niveles de solubilidad del fármaco en agua para asegurar una penetración adecuada en la piel[33].

Entre los AINEs más comunes en productos de uso tópico se encuentran geles, parches y soluciones de diclofenaco, ibuprofeno, ketoprofeno y piroxicam[33]. En Costa Rica, existen primordialmente una mayor variedad de productos con diclofenaco mientras que los antes mencionados se limitan solamente a una marca comercial presentes el mercado. Se ha demostrado una buena seguridad en el uso de AINES tópicos, inclusive, en pacientes adultos mayores y pacientes con comorbilidades[34]; no obstante, ante la presencia de información que respalda su seguridad, aún es necesario la inclusión de advertencia de riesgo cardiovascular, renal y gastrointestinal en el prospecto del producto[33].

El diclofenaco es un derivado del ácido acético similar a la indometacina y ketorolaco. La absorción del diclofenaco es relativamente rápida y con un tiempo de vida corto[33], se suele prescribir en diferentes sales como diclofenaco sódico, potásico[35], y dietilamonio[36], sus estructuras químicas se muestran en la siguiente figura:

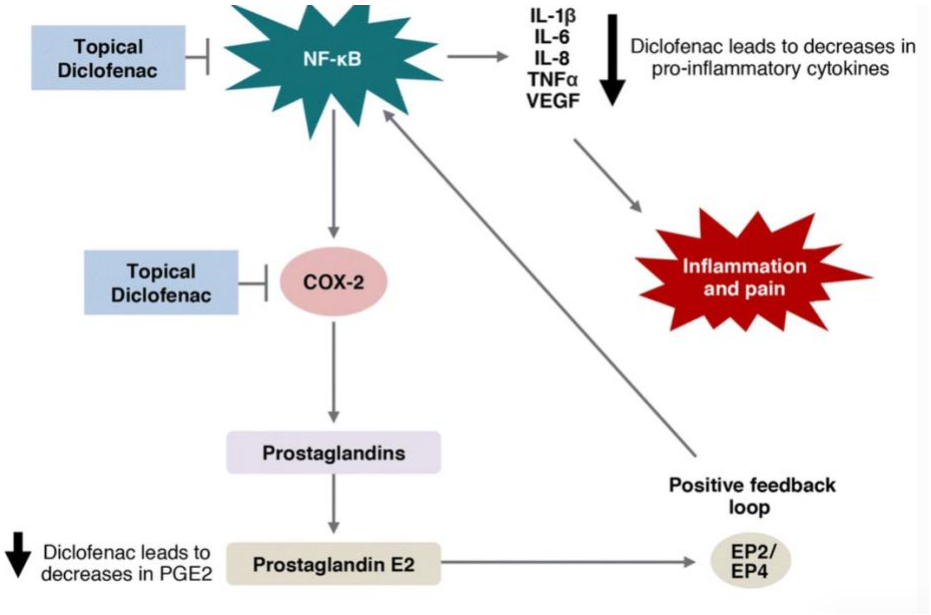
Figura 2. Estructuras químicas de a) diclofenaco sódico, b) diclofenaco potásico y c) diclofenaco dietilamonio



Fuente: imagen tomada de la referencia[37].

Por otra parte, el diclofenaco sin importar en qué tipo de sal esté presente, inhibe la enzima COX-2 más eficientemente que la enzima COX-1[35]. El diclofenaco tópico es absorbido a través de la piel y este penetrará entonces a los tejidos subdérmicos incluido el tejido sinovial, actuando directamente sobre el sitio del dolor. La enzima COX-2 es la responsable de convertir el ácido araquidónico en prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclinas, el diclofenaco inhibe selectivamente esta enzima de manera que se reduce la producción de prostaglandinas y, por tanto, limita la sensibilidad relacionada con prostaglandinas de los nociceptores periféricos del estímulo del dolor[38]. Ver figura.

Figura 3. Mecanismo de acción del diclofenaco



Fuente: imagen tomada de la referencia[37].

A nivel tópico, la permeación de diclofenaco se verá afectada por la formulación del producto y también por el tipo de sal utilizada. La permeación de diclofenaco dietilamonio es mucho mayor que la de diclofenaco sódico inclusive cuando la concentración de este último es mayor que la del primero. Esto se debe, principalmente, a que la absorción del principio activo en la piel no estará determinada por la concentración de diclofenaco, sino, más bien, por las propiedades fisicoquímicas diferentes de cada sal, pues el transporte a través de membranas se verá afectado por dichas propiedades[36].

Además, los excipientes de la fórmula afectan la absorción del diclofenaco a nivel tópico, el uso de propilenglicol, el cual incrementa la permeación, está presente en fórmulas farmacéuticas con diclofenaco dietilamonio, también el cocoil caprilocaprato y parafina son excipientes usados para mejorar la oclusión e hidratación de la piel y con ello a su vez, mejorar la absorción del fármaco[36].

2.2.3 Aprobación de productos farmacéuticos de uso tópico

Con el objetivo de comparar productos de uso tópico se recomienda realizar pruebas básicas de calidad como lo son la medición del pH, densidad y también propiedades reológicas. Para los geles, tanto la caracterización fisicoquímica como estructural son necesarias de realizar lo cual incluiría la apariencia física y examinación del tamaño de partícula. Además, se debe de evaluar el comportamiento reológico del producto que incluye fuerza de ruptura y viscosidad de la estructura polimérica del gel, la equivalencia terapéutica es necesaria para algunos de los geles incluidos los que llevan el diclofenaco como principio activo[39].

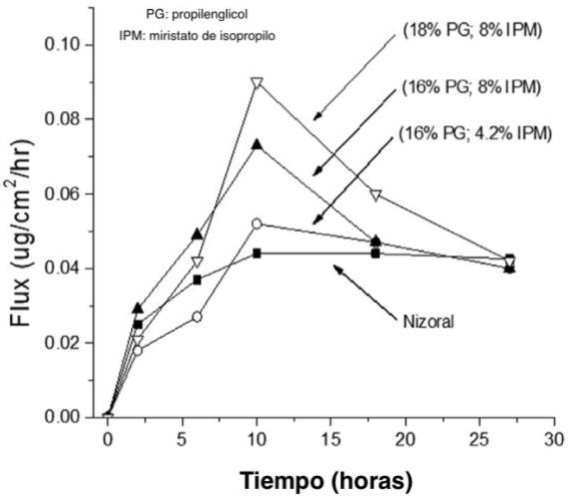
Para las cremas y ungüentos, es necesario llevar a cabo la caracterización de los componentes oleaginosos, determinación del tamaño de partícula, formas polimórficas del principio activo, similar a los geles es necesario también llevar a cabos estudios de equivalencia in vitro[39].

Una factor común en las pruebas necesarias para comparar productos tópicos corresponde a los estudios de permeación in vitro (IVPT) -por sus siglas en inglés, la cuál es una de las pruebas más útiles para evaluar diferencias entre productos farmacéuticos tópicos, debido a que provee información útil acerca de la velocidad y el grado de absorción del principio y así diferenciar entre productos genéricos y originales[28], discrepancias que a su vez pueden surgir debido a diferencias en la microestructura del principio que a simple vista resulta difícil de elucidar[27].

Una de las desventajas de los estudios IVPT consiste en que se busca simular de la forma más cercana la permeación del fármaco a través de una membrana y por ende esta membrana necesita ser un tejido de un animal o de cadáver humano. No obstante, una de las variaciones de estos estudios para evitar el uso de membranas de origen animal, implicaría el uso de aquellas de origen sintético, y así los estudios toman el nombre de estudios de liberación in vitro (IVRT) -por sus siglas en inglés. Los estudios IVPT son para productos en estado de desarrollo, mientras que los IVRT evalúan la calidad de los productos[40].

En la figura número 4 se muestra la capacidad de los estudios de permeación in vitro (IVPT) en discriminar entre proporciones de diversos excipientes y además se evidencia la diferencia en permeación del fármaco ketoconazol en el producto original Nizoral contra la formulación del producto genérico[40]. Estas diferencias permiten a los formuladores farmacéuticos la toma de decisiones de cual excipiente y en qué proporción beneficie más o no al paciente.

Figura 4. Uso del IVPT para diferenciar formulaciones de diversas proporciones de excipiente de un producto genérico contra el original



Fuente: modificado de Raney[41]

2.3.Estudios de permeación in vitro (IVPT) y estudios de liberación in vitro (IVPR)

Los estudios de permeación in vitro -de ahora en adelante, IVPT-se encuentran reconocidos a nivel mundial por los científicos como una técnica válida para realizar la cuantificación de sustancias químicas sobre y dentro de las capas de la piel. La técnica posee utilidad en la evaluación de toxicidad de sustancias químicas, exposición de pesticidas en piel, dermocosmética y sustancias químicas de uso industrial. En varios países, en especial los de Europa, América y los Estados Unidos, las pruebas de IVPT se toman en cuenta como información valiosa para validar los estudios de bioequivalencia de productos tópicos[30].

De acuerdo con Raney[41] el objetivo de los estudios IVPT consiste en la:

Dosificación de un producto semisólido bajo la evaluación de una membrana biológica colocada en la celda de difusión la cual contiene la solución receptora (también conocida como fluido receptor/recibidor). El propósito de la prueba es la evaluación de la permeación de la droga a través del estrato córneo de la piel y subsecuentes capas (distribución en piel), al igual que la cantidad de fármaco recolectado en la solución receptora (penetración en piel), permitiendo el cálculo del influjo de droga en piel[41].

Por otra parte, los estudios de liberación in vitro-de ahora en adelante, IVRT consisten en[42]:

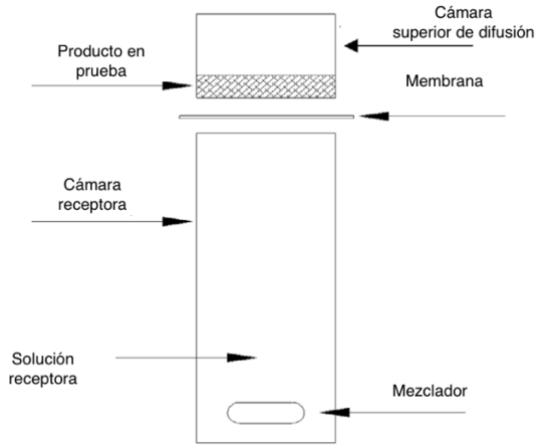
Los estudios de liberación in vitro se usan para monitorear la liberación y difusión de productos semisólidos y ha sido considerado como una herramienta útil en el desarrollo y evaluación de fórmulas. IVRT. Se usa para discriminar formulaciones entre productos y como requisito para cumplir la bioequivalencia de productos farmacéuticos tópicos.

Los estudios IVRT se encuentran reconocidos como una herramienta vital para poder asegurar la calidad de productos farmacéuticos semisólidos, ya que la liberación in vitro es un reflejo combinado de diversos factores tanto físicos como químicos de la sustancia en estudio. Por otra parte, los procesos de manufactura y las formulaciones utilizadas pueden afectar la liberación del principio activo y, por ende, su biodisponibilidad. En la actualidad, instituciones como EMA dictan como recomendación los estudios IVRT como parte de los requisitos por cumplir para obtener la bioequivalencia[43].

Los sistemas de IVPT e IVRT pueden ser llevados a cabo de diversas maneras, tal y como se muestra en la figura 5, este método se le conoce como celda de difusión vertical o celdas de Franz y corresponde a uno de los métodos más comúnmente utilizados. Tal y como se observa en la figura, se necesita una cámara receptora, otra cámara con el producto, la cual se conoce como cámara donadora y la membrana[42]; además, la cámara receptora tiene que estar a 32 grados Celsius y puede ser estática o estar en agitación mecánica[43]. Otros aspectos para considerar corresponden a los siguientes: el volumen en la cámara receptora, el método

de toma de muestras, el área efectiva de permeación, el fluido receptor y el tipo de membrana[44].

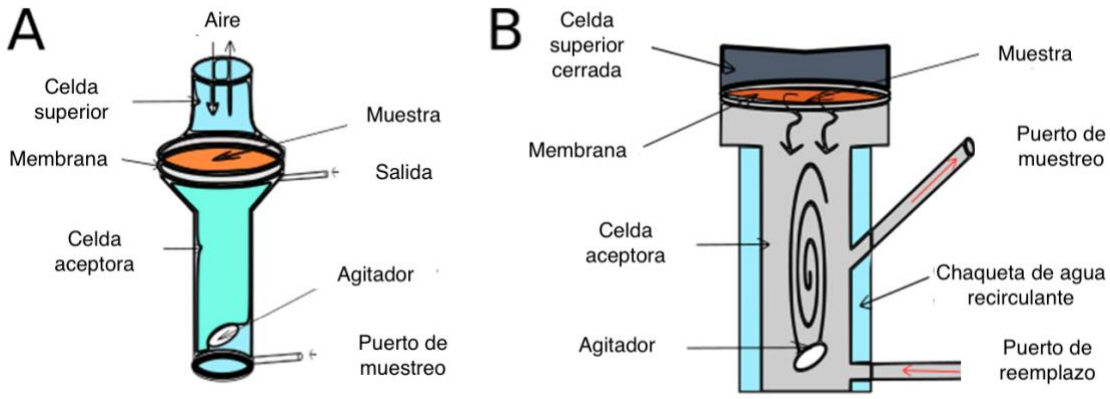
Figura 5. Esquema representativo de una cámara de difusión vertical con sus componentes. Fuente modificado de Santos[42].



Fuente: modificado de Santos[42].

Las celdas de difusión de Franz se pueden categorizar de varias maneras (figura 6), la más comunes son las llamadas estáticas y las de flujo. Estas celdas, por lo general, son de vidrio y en las celdas de difusión estáticas la membrana y la celda donadora se colocan de forma vertical u horizontal. También, las celdas pueden estar abiertas o cerradas en la parte superior, lo cual, en el primer caso no se podría controlar la presión; mas para el segundo caso la presión interna influye directamente en los valores de penetración[45]. En la actualidad, estos sistemas se han modificado para su uso en sistemas automáticos para reducir las implicaciones del error humano[46].

Figura 6. Esquema representativo de una cámara de difusión vertical abierto (A) y cerrado (B) con sus componentes



Fuente modificado de Zsikó[46]

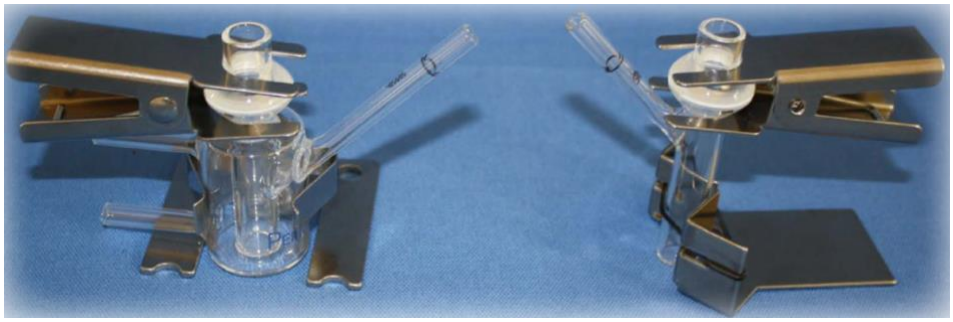
Las celdas automatizadas se les conoce como "side-bi-side cell" o celdas de lado-bi-lado dado que existen una cámara receptora y donadora separadas entre sí mediante una membrana colocada de manera vertical (ver figura 7), ambas se encuentran aisladas del medio ambiente externo. Entre las celdas de Franz más comunes se encuentran las que poseen chaqueta y las que no, las primeras permiten un control de la temperatura más adecuado pues el agua caliente entra y sale de la cámara en un sistema automatizado[47].

Figura 7. Celda de difusión "side-bi-side cell".

Fuente: imagen tomada de Permagear[48].

Las celdas más comunes son aquellas sin chaqueta y, por esta razón, ocuparán un sistema de calentamiento externo (ver figura 8). La decisión del uso específico de las celdas de Franz dependerá del objetivo de la investigación. La celda "side-bi-side cell" es usada para simular permeaciones entre membranas dentro del cuerpo, mientras que las celdas verticales con o sin chaqueta se usan para sistemas de liberación dérmica[47].

Figura 8. Celda de difusión a la izquierda con chaqueta y a la derecha sin chaqueta



Fuente: imagen tomada de Permagear[48].

2.3.1. Membranas utilizadas en sistema IVRT

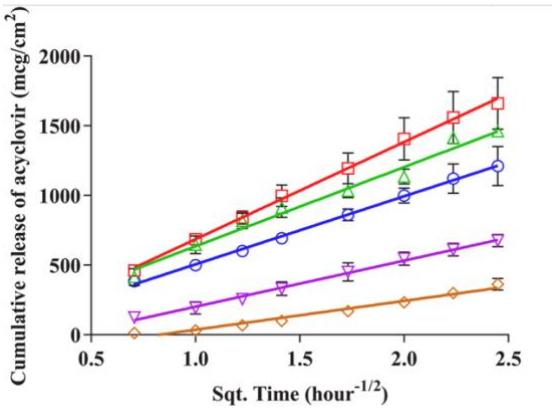
Las membranas son un componente esencial en los estudios IVRT, se usan para simular las barreras biológicas que el principio activo necesita atravesar para realizar su difusión[49]. El rango de membranas utilizadas en los estudios de IVRT van desde piel humana y animal hasta el uso de membranas sintéticas. No obstante, dado que en los estudios IVRT se busca evaluar la calidad de productos tópicos y, por lo general, se realizan múltiples estudios al mismo tiempo; la membrana se limita a aquellas denominadas de carácter artificial o sintético[33].

Las membranas naturales son aquellas obtenidas de fuentes biológicas y sus características permiten una simulación más cercana a la liberación de drogas en piel, entre las más utilizadas se encuentran la piel misma, membranas de las mucosas y membranas intestinales[49]. No obstante, el uso de membranas sintéticas permite su uso de manera más continua y; además, evitan las consideraciones éticas que implican el uso de aquellas de

fuente animal. Entre las membranas más utilizadas están aquellas conformadas por polímeros como esteres de acetato/nitrato de celulosa, polisulfonas, politetrafluoroetileno, nylon y policarbonato[32].

La escogencia de la membrana dependerá de muchos aspectos como el diámetro del poro y el grosor de la membrana ya que estos parámetros afectarán la liberación del fármaco a través de la membrana; además, la presencia de fuerzas intermoleculares entre el principio activo y la membrana pueden provocar una mayor o menor retención del fármaco en la misma, afectando la liberación del fármaco[50]. Sin embargo, como regla general, se espera que la naturaleza de la membrana no sea un factor limitante en la liberación del farmaco[51]. En la figura 9, se muestra cómo el tipo de membrana cambia la liberación de aciclovir presente en un producto de uso tópico[50].

Figura 9. Efecto de la membrana en la liberación in vitro del principio activo aciclovir.



Fuente: imagen tomada de la referencia[50].

2.3.2. Cámara donante en sistema IVRT

La cámara donadora en los sistemas de IVRT consiste en una cámara de volumen pequeño donde se coloca la muestra y se conecta con la cámara receptora. El diseño de esta cámara es esencial para asegurar una liberación del fármaco de la membrana en una forma

consistente y reproducible. La variable por considerar en la cámara donadora es la cantidad de muestra por utilizar o la ocupación total o no del volumen total de la cámara[49].

2.3.3. Cantidad de producto en la cámara donante en sistema IVRT

Por lo general, se debe aplicar no menos de 300 mg del medicamento en la cámara donante, esta masa es normalmente suficiente para cubrir completamente la superficie de la membrana expuesta[52]. Durante el experimento, la cinética de liberación del fármaco debe estar dentro de los requisitos de las suposiciones de Higuchi de una dosis infinita para garantizar un rendimiento óptimo del método. En términos generales, no se recomienda la liberación de más del 30 % del fármaco aplicado en el líquido receptor, esto para garantizar que se mantenga una dosis infinita en la cámara del donante; por lo tanto, se puede justificar cantidades superiores a 300 mg cuando es necesario garantizar que se mantenga una dosis infinita durante todo el experimento[53].

También, se pueden justificar cantidades inferiores a 300 mg siempre que la formulación cubra completamente la superficie de la membrana expuesta y se mantenga una dosis infinita en la cámara donante en el punto de muestreo final del experimento. Permitir la liberación de más del 30 % de la dosis aplicada puede dar lugar a una no linealidad del perfil de liberación, ya que la cantidad de sustancia farmacológica en la cámara del donante se vuelve limitante de la velocidad. La pendiente del perfil de liberación disminuirá dando lugar a la aparición de una saturación de liberación. La linealidad insuficiente puede contribuir a la variabilidad en los datos de la tasa de liberación y afectar la calidad general de los datos. Por tanto, se recomienda el límite de liberación del 30 % para garantizar datos precisos y reproducibles[53].

2.3.4. Cámara receptora en sistema IVRT

En el sistema de difusión vertical de Franz, la molécula en estudio, además de poder atravesar la membrana, debe ser recibida en un medio acuoso el cual posea la suficiente solubilidad para ser cuantificado, este medio acuoso se encontrará presente en la cámara receptora. Así, de esta manera, el pH y la composición del medio debe ser compatible con la droga en estudio y, además, debe ofrecer estabilidad acuosa para posibilitar el análisis durante

un tiempo especificado[54].Por otra parte, la solubilidad del principio activo corresponde al parámetro más relevante por considerar en los estudios IVRT.

El buffer salino de pH 7.4 es una de las soluciones buffer acuosas más comúnmente utilizadas en los estudios IVRT. Su uso ha sido documentado en diversos estudios que incluyen varios principios activos como diclofenaco sódico[22], en formulaciones de bloqueadores solares con oxybenzona como principio acitivo[54] y este buffer se utiliza en casos donde las sustancias por estudiar sean hidrofílicas, mientras que aquellos que sean hidrofóbicos se utiliza albúmina de suero bovino al 2 o al 5%[34]. El uso de polioxietileno al 0.1% suele ser más efectivo para sustancias hidrofóbicas debido a que la solución receptora debe ser lo más parecido a los fluidos biológicos[54].

Otro aspecto importante del medio acuoso receptor corresponde a evitar el uso de preservantes o antimicrobianos, se exceptúan aquellos casos donde la integridad de la membrana se encuentra en peligro por asuntos de estabilidad. Además, el volumen de la solución receptora debe estar basado en la capacidad de permeación del activo sobre la membrana, aquellos que permean fácilmente requieren de un volumen de líquido mayor que aquellos que lo hacen a una velocidad mucho menor[54].

2.3.5. Cuantificación del principio activo en la cámara receptora

La cuantificación del principio activo en el producto farmacéutico que se está evaluando en los estudios de IVRT, permite establecer los perfiles de liberación que después son usados para la comparación de qué tan semejantes son los productos entre sí. Diversas técnicas analíticas se pueden utilizar para lograr este objetivo, entre ellas: cromatográfica líquida de alta resolución, cromatografía de gases y espectroscopía ultravioleta-visible[56].

2.3.5.1.Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-vis)

La espectroscopia UV-vis es una técnica utilizada para medir la absorción de luz en las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético. Esta técnica analítica ha sido ampliamente utilizada para la identificación y cuantificación de compuestos químicos en una amplia gama de campos, incluida la química, la biología, la ciencia ambiental, la ciencia de los materiales y la medicina. El principio detrás de la espectroscopia UV-vis es que los

átomos, las moléculas y los iones pueden absorber luz de longitudes de onda específicas, y el grado de esta absorción está relacionado con la cantidad del analito presente en la muestra[57].

El espectro electromagnético se divide en varias regiones, incluidas las ondas de radio, las microondas, la radiación infrarroja, la luz visible, la radiación ultravioleta, los rayos X y los rayos gamma. Las regiones ultravioleta y visible son de particular interés para la espectroscopia UV-vis. La radiación ultravioleta tiene longitudes de onda entre 190 y 400 nm, mientras que la luz visible tiene longitudes de onda entre 400 y 700 nm. Cuando la luz pasa a través de una muestra que contiene un analito capaz de absorber radiación, la energía de la luz puede ser absorbida por el analito, provocando transiciones electrónicas dentro de la molécula. La energía de la luz absorbida corresponde a una longitud de onda específica, y esta longitud de onda se puede utilizar para identificar y cuantificar el analito[57].

La ley de Beer-Lambert es el principio fundamental de la espectroscopia UV-vis. De acuerdo con esta ley, la absorbancia de una muestra es directamente proporcional a la concentración del analito y la longitud del camino de la luz a través de la muestra. La ley se expresa como $A = \varepsilon lc$, donde A es la absorbancia, ε es el coeficiente de absorción molar, l es la longitud de la cubeta donde se coloca el analito y c es la concentración del analito. El coeficiente de absorción molar es una constante para un analito particular a una longitud de onda dada[58].

Una de las principales ventajas de la espectroscopia UV-vis es su versatilidad. Se puede utilizar para el análisis de una amplia gama de muestras, incluidas soluciones, gases y sólidos. Además, es una técnica no destructiva que requiere una preparación mínima de la muestra, esto la convierte en una opción popular en muchos campos. Además, la espectroscopia UV-vis es una técnica relativamente económica, accesible a investigadores con presupuestos limitados[58].

2.3.5.2.Equipos usados en espectroscopia UV-vis

Los componentes básicos de un espectrofotómetro UV-Vis incluyen una fuente de luz, un monocromador, un porta muestras o cubeta, un detector y un sistema de visualización y procesamiento de datos. La fuente de luz emite una amplia gama de longitudes de onda de

luz, posteriormente, el monocromador filtra y separa en sus longitudes de onda componentes. La muestra se coloca en la cubeta y el detector mide la intensidad de la luz que pasa a través de la muestra. El sistema de datos muestra y procesa los datos resultantes[57].

Los espectrofotómetros Vernier UV-Vis son un tipo de espectrofotómetro diseñado específicamente para usar en entornos educativos, como escuelas secundarias y universidades. Están fabricados por Vernier Software & Technology, una empresa que se especializa en la producción de equipos y software de ciencias educativas[58,59].

El espectrofotómetro Vernier UV-Vis es un instrumento compacto y accesible que puede medir la absorbancia de la luz en el rango UV y visible del espectro electromagnético. Utiliza una lámpara de tungsteno-halógeno como fuente de luz y un monocromador de rejilla de difracción para separar las diferentes longitudes de onda de la luz. La muestra se coloca en una cubeta, luego se inserta en el porta muestras y la intensidad de la luz que pasa a través de la muestra se mide con un detector de fotodiodo y los datos resultantes se muestran y analizan con el software Logger Pro de Vernier o una computadora[58,59].

Figura 10. Espectrofotómetro UV-vis marca Vernier.

Fuente: imagen tomada de la referencia[59].

2.3.5.3.Cuantificación de diclofenaco

Una forma de cuantificar el diclofenaco es mediante espectroscopia UV-Vis. El diclofenaco absorbe luz en la región UV con una absorción máxima a 276 nm. La intensidad de la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la muestra[60].

Para cuantificar el diclofenaco mediante espectroscopia UV-Vis, primero se prepara una curva de calibración utilizando soluciones estándar de concentraciones conocidas de diclofenaco. La absorbancia de cada solución estándar se mide a 276 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis y se genera un gráfico de absorbancia frente a concentración. A continuación, se puede determinar la concentración de una muestra desconocida midiendo su absorbancia a 276 nm y comparándola con la curva de calibración[60].

La espectroscopia UV-Vis es un método relativamente simple, rápido y económico para cuantificar el diclofenaco. Sin embargo, es importante tener en cuenta que otros compuestos en la muestra también pueden absorber luz a 276 nm, lo que genera interferencias y posibles imprecisiones en la medición. Por lo tanto, la preparación y la selectividad de la muestra son fundamentales para obtener resultados precisos y fiables[60].

2.3.6. Duración del estudio IVRT: tiempos de muestreo y número de réplicas

El tiempo de duración total de los estudios IVRT se establecen de acuerdo con los objetivos del estudio. Cuando se analizan formulaciones de productos farmacéuticos prototipo, es necesario realizar un estudio preliminar y definir el tiempo de duración. La integridad de la membrana suele limitar este tiempo, en el caso de membranas de origen animal o humano, los estudios suelen durar menos de 24 horas. Para los tiempos de muestro se tiene que utilizar por lo menos 8 tiempos después de la aplicación, incluido un tiempo inicial a los 30 minutos de iniciado el estudio[40].

Por lo general, para estudios IVRT, el tiempo se puede extender de 3 a 8 horas con un mínimo de cinco a seis alícuotas tomadas de cada celda. Los intervalos deben ser tal que no se haya liberado más del 30% de la cantidad especificada en la etiqueta, ya que la liberación del fármaco sigue una tendencia lineal antes de liberarse el 30% del contenido del fármaco. A su vez, se debe reponer el líquido correspondiente de la alícuota tomada y las

alícuotas deben tomarse a 2.5 cm por arriba de la superficie y en el centro de la cámara aceptora[40].

2.4.Permeación y liberación de fármacos tópicos

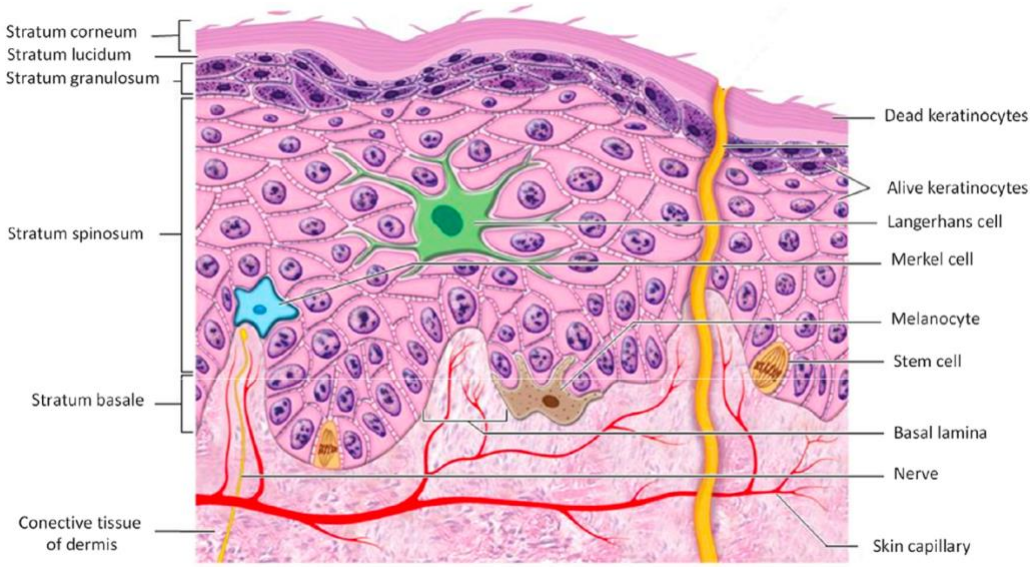
2.4.1. Aspectos generales del tejido de la piel

La administración tópica de medicamentos es de gran popularidad entre los pacientes debido a las ventajas y la versatilidad que presentan, el efecto de estos medicamentos puede ser no sistémico, es decir, el medicamento queda en las primeras capas de la piel o sistémico si por el contrario el medicamento penetra las capas de piel y llega al sistema circulatorio. Otra ventaja del uso de medicamentos tópicos es que estos evitan el metabolismo de primer paso y degradación intestinal[61].

La epidermis y la dermis son las dos capas estructurales más importantes en la piel, cada una con una función ya establecida. La epidermis es la capa más superficial y la dermis conecta con el tejido conjuntivo[61]. Cada capa de la piel posee funcionalidades diferentes: la epidermis está compuesta por epitelio queratinizado y escamoso carente de vascularización de cuatro a cinco capas dependiendo del área del cuerpo donde este localizada[41], mientras que la dermis se compone de tejido conjuntivo con un grosor de mil a mil doscientos micrómetros[61,62].

La epidermis es la capa más externa de la piel y actúa como una barrera protectora contra factores externos como la radiación UV, los patógenos y el daño físico. Se subdivide en varias capas clasificadas de acuerdo con las características de las células epiteliales en estrato córneo, estrato granular, estrato espinoso y estrato basal (figura 11)[62]. Sin embargo, es el estrato córneo, desde el punto de vista de la administración de productos tópicos, la capa epidérmica es más relevante dado que es la primera capa que se expone a los componentes de la fórmula del producto tópico[62].

Figura 11. Ilustración de los componentes de la epidermis



Fuente: imagen tomada de la referencia[62].

El estrato córneo es la capa más superficial de la epidermis y está compuesto por células muertas de la piel que han pasado por un proceso llamado queratinización, donde se llenan de una proteína llamada queratina. Esta capa de la epidermis ayuda a prevenir la pérdida de agua del cuerpo y protege la piel del daño externo. El estrato córneo está conformado por un sistema llamado "martillo y mortero" en donde las células externas son constantemente remplazadas por internas, todas juntas en una matriz de bicapa lipídicas multilaminar[62].

Es esta bicapa lipídica multilaminar del estrato córneo la que actúa y evita la entrada de sustancias ajenas al organismo, protege en contra de agresiones mecánicas y es la primera defensa ante la radiación del tipo ultravioleta[61]. La liberación de sustancias activas o drogas en la piel va a estar limitada por la solubilidad de la sustancia, la composición del estrato córneo y la formulación del producto[63].

La capa granular se encuentra debajo del estrato córneo y está compuesta por células que contienen gránulos que ayudan a impermeabilizar la piel. La capa basal es la capa más profunda de la epidermis y es responsable de producir nuevas células de la piel a través de un proceso llamado mitosis. Las células de la capa basal se dividen y migran hacia arriba a

través de las otras capas de la epidermis y llegan finalmente al estrato córneo, donde se convierten en células muertas de la piel[62].

La dermis es la segunda capa de la piel, se ubica directamente debajo de la epidermis y sobre el tejido subcutáneo. Está compuesta de tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervios, folículos pilosos y glándulas sudoríparas. La dermis es responsable de proporcionar a la piel fuerza, flexibilidad y elasticidad, así como de sostener las estructuras que se encuentran en su interior. Los principales componentes de la dermis son las fibras de colágeno y elastina, que dan a la piel su fuerza y elasticidad, respectivamente. Los vasos sanguíneos de la dermis proporcionan nutrientes y oxígeno a la piel, mientras que los vasos linfáticos ayudan a eliminar los productos de desecho y las células inmunitarias de la piel[62].

La dermis también contiene células especializadas como fibroblastos, estos producen fibras de colágeno y elastina, así como células inmunitarias como macrófagos y linfocitos, que ayudan a proteger el cuerpo de infecciones y enfermedades. Los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas también se encuentran en la dermis. Los folículos pilosos producen cabello, lo que ayuda a regular la temperatura corporal al atrapar el calor cerca de la piel. Las glándulas sudoríparas producen sudor, el cual ayuda a regular la temperatura corporal al evaporarse y enfriar la piel[62].

2.4.2. Transporte de drogas a través de la piel

El estrato córneo de la epidermis sirve como una barrera de muchas drogas usadas a nivel tópico y es la principal limitante de la permeabilidad de la droga[64] . La hidratación del estrato córneo incrementa drásticamente la permeabilidad de esta capa; inclusive, la remoción completa del estrato córneo posee el mismo efecto que su hidratación[65]. Así entonces, los modelos de transporte transdérmico de drogas se deben enfocar en esta capa de la epidermis para entender y justificar de manera correcta la permeación del fármaco.

El transporte de drogas a través de la piel implica diversos pasos, a saber: disolución y liberación de la droga en la fórmula del producto, partición en el estrato córneo, difusión de la droga a través del estrato córneo, partición de la droga del estrato córneo a las otras

capas de la epidermis, difusión a través de las capas de la epidermis y absorción de la droga en los vasos capilares para su llegada al sistema circulatorio[66].

El primer paso para lograr el transporte de la droga hacia el estrato córneo está limitado por la calidad de la formulación del producto farmacéutico. Esta formulación debe ser tal que permita mantener un medio estable para el principio activo, contenga los excipientes necesarios para lograr la liberación del fármaco y, además, el producto debe ser de fácil aplicación y cosméticamente elegante para el consumidor[49].

Por otra parte, la absorción de la droga en la epidermis depende de diversas características fisicoquímicas que incluyen la dosis del fármaco, peso molecular, lipofilicidad y el punto de fusión[67]. Considerando estos parámetros, se recomienda que la dosis diaria sea menor o igual a 20 miligramos al día, que el peso molecular del principio activo sea menor a 500 Da, y con valores de lipofilicidad medido como log p entre 1 y 3, con un punto de fusión menor a doscientos grados Celsius.

2.4.3. Cinética de permeación de fármacos a través de membrana

La cinética de permeación de membrana se refiere al estudio de los mecanismos y velocidades a las que los fármacos penetran a través de las membranas biológicas, incluidas las membranas celulares y la piel. La cinética de la penetración de la membrana es importante porque determina la velocidad y el grado de absorción, distribución, metabolismo y eliminación del fármaco[68].

La cinética de permeación de la membrana se puede describir utilizando varios modelos matemáticos, incluido el modelo de difusión clásico, el cual supone que las moléculas del fármaco se difunden pasivamente a través de la membrana a favor de un gradiente de concentración. Otros modelos tienen en cuenta factores más complejos, como la estructura de la membrana, las propiedades del fármaco y los transportadores[67,68].

La penetración del fármaco a través de la piel es particularmente compleja debido a la presencia del estrato córneo, una gruesa capa rica en lípidos de células muertas que sirve como barrera principal para la absorción del fármaco. La permeabilidad del estrato córneo

está influenciada por varios factores, que incluyen la hidratación, la temperatura y el uso de potenciadores de penetración[68].

La permeación en piel se explica mayoritariamente por la ley de Fick, ésta indica que el flujo representado como J, o también llamado relación de absorción entre el fármaco y la membrana, está relacionado con su difusión la cual, a su vez, es directamente proporcional a la concentración de gradiente. Ver ecuación 1. Para aquellas drogas administradas de forma tópica, este gradiente de concentración dependerá de las diferencias que se observen entre la concentración de la droga y el vehículo, C_v y la capa de piel[68].

$$J = K_p C_v \qquad \textit{ecuación Nº1}$$

Kp representa la constante de proporcionalidad relacionada con el flujo J y el gradiente de concentración, Cv. esta constante se verá afectada por los parámetros fisicoquímicos del principio activo que se explicaron con anterioridad. De manera que, si se consideran estos parámetros, la ecuación Nº1 se convierte en la ecuación Nº2, en donde se debe considerar el coeficiente de partición, Km, el coeficiente de difusión, D, la longitud de la trayectoria de difusión, L; todos estos parámetros influenciarán la penetración de la droga en la piel[68].

$$J = \frac{DK_m C_v}{L} \qquad \textit{ecuación Nº2}$$

2.5.Evaluación de la cinética de permeación de fármacos a través de membrana

Con el objetivo de conceptualizar la cinética de liberación de fármacos y con ello evaluar la información obtenida de estos estudios, es necesario la utilización de procedimientos matemáticos para obtener una ecuación matemática capaz de predecir, de forma correcta, la liberación de drogas a nivel tópico. Las ecuaciones de orden cero, primer orden, Higuchi, Hixson-Crowell, Peppas y Korsmeyer-Peppas se usan para calcular la cinética de liberación de droga permeada en sistemas de dosificación de tipo tópica[68].

2.5.1. Cinética de orden cero

En los sistemas de liberación de drogas que sigan una cinética de orden cero existe una liberación constante del fármaco a través del tiempo. Es importante indicar que, en estas cinéticas, la eliminación del fármaco está en equilibrio con la liberación de este, así se alcanza una concentración en plasma constante, por ende, una disminución de los efectos secundarios[69]. La ecuación para describir el comportamiento de un fármaco en cinéticas de orden uno está dado por la ecuación número 3, donde Q_0 corresponde a la concentración inicial del fármaco, Q la concentración del fármaco en tiempo t, y k_o la constante de liberación de orden cero[70].

$$Q = Q_0 - k_0 t \qquad \textit{ecuación Nº3}$$

2.5.2. Cinética de orden uno

En las cinéticas de orden uno, la liberación de la droga se predice a consecuencia de la disolución del principio activo seguido de una difusión de las moléculas a través de membrana[49]. Este tipo de cinética describe la liberación de fármacos donde la concentración depende del tiempo, y se puede representar mediante la ecuación número 4, donde $\ln(Q_o\text{-}Q)$ representa el cambio en concentración de la droga con respecto al tiempo, $\ln Q_0$ es el logaritmo natural de la concentración inicial y k1 la constante de liberación de orden uno[71].

$$\ln(Q_0 - Q) = \ln Q_0 - k_1 t \qquad \text{ecuación } \textit{Nº4}$$

2.5.3. Cinética de Higuchi

El modelo de Higuchi se usa a menudo para analizar datos de liberación de fármacos de estudios de disolución in vitro, donde la tasa de liberación del fármaco se mide a lo largo del tiempo en un fluido fisiológico simulado. El modelo puede proporcionar información sobre el mecanismo de liberación del fármaco a partir de la forma de dosificación, así como la velocidad y el alcance de la liberación del fármaco[68].

Uno de los principios de difusión del fármaco señala que cuando un producto tópico entra en contacto con la piel forma una especie de película líquida delgada en la cual la superficie de la piel es más grande en comparación con el grosor de esta y, por ende,

despreciable[49]. La cinética de Higuchi intenta relacionar la liberación de fármacos en matrices insolubles descritas en la ecuación número 5, donde Q es la concentración del fármaco en tiempo t, y k_H la constante de liberación de fármaco de Higuchi[68].

$$Q = k_H t^{\frac{1}{2}} \qquad \text{ecuación } Nº5$$

Para aplicar el modelo matemático de Higuchi se debe considerar diversas suposiciones las cuales incluyen: la transferencia de principio en el producto tópico es lento pero dentro de la piel es rápido, de manera que la difusión es estable, la piel actúa como un reservorio donde la concentración del fármaco es despreciable, la velocidad de disolución de la droga es mucho más rápido que la velocidad de difusión, así entonces, las partículas difundidas siempre serán reemplazadas por otras nuevas y, finalmente, como se mencionó antes, el área superficial de la piel es mucho mayor que el grosor de la capa de producto en la piel de manera que la difusión ocurre en un solo sentido[72].

Una limitación del modelo de Higuchi es que supone un coeficiente de difusión constante y una concentración de fármaco uniforme en toda la matriz o membrana. En realidad, la concentración del fármaco y el coeficiente de difusión pueden variar con el tiempo debido a diversos factores, como cambios en el pH, la temperatura y la hidratación[72].

2.5.4. Cinética de Korsmeyer-Peppas

El modelo de Korsmeyer-Peppas describe la liberación de una droga de un sistema polimérico representado por la ecuación número 7, donde Qt/Q∞ es la fracción de la droga liberada en tiempo t, y k es la constante de liberación de Korsmeyer-Peppas[72] y n toma un valor de 0.45 en casos donde la liberación de la sustancia sigue las leyes de Fick y 0.89 si son liberaciones de orden cero[68].

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = kt^n \qquad \text{ecuación } Nº6$$

Una ventaja del modelo de Korsmeyer-Peppas es su versatilidad, ya que puede usarse para describir una amplia gama de mecanismos de liberación de fármacos, desde la simple difusión de Fick hasta mecanismos más complejos como la erosión de polímeros. Sin embargo, el modelo asume que la concentración del fármaco en la forma de dosificación es

uniforme y es posible que no describa con precisión la liberación del fármaco a partir de formas de dosificación que muestran una distribución no uniforme del fármaco[72].

2.5.5. Cálculo de cantidad acumulada de fármaco en el tiempo

Tanto la cinética de Higuchi, Hixson-Crowell y Korsmeyer-Peppas requieren, antes de realizarse, la linealización, la cantidad de principio activo liberado en tiempo t por unidad de área. La ecuación por utilizar para dicho propósito corresponde a[73]:

$$Q_n = C_n \frac{V_c}{A_c} + \frac{V_s}{A_c} \sum_{i=1}^{n} C_{i-1} \qquad \text{ecuación } N^o 7$$

En donde Q_n es la cantidad de fármaco acumulado en tiempo t por unidad de área en µg cm^{-2}, C_n es la concentración de la droga en el medio receptor a los distintos tiempos de muestreo en µg cm^{-3}, V_s es el volumen de la alícuota tomada desde la cámara receptora en cm^3, V_c es el volumen de la celda de difusión de Franz en cm^3 y Ac el área del orificio de la celda en cm^2. El término, en la sumatoria correspondiente a $C_{i-1,}$ se refiere a la suma de las concentraciones anteriores al muestreo n[73].

2.6.Estudios de liberación in vitro con membrana de cáscara de huevo

La primera evidencia del uso de la membrana de cáscara de huevo en estudios de liberación de fármacos como parámetro de evaluación de calidad fue realizada por el investigador Washitake, et al.[74]. Él usa la membrana para evaluar la difusión del fármaco betametasona -17-valerato. En la actualidad, el uso de esta membrana sigue en uso para evaluar la liberación de drogas en productos tópicos, donde se pone en prueba la calidad de las formulaciones en cuanto a la liberación del fármaco de la fórmula[11, 75].

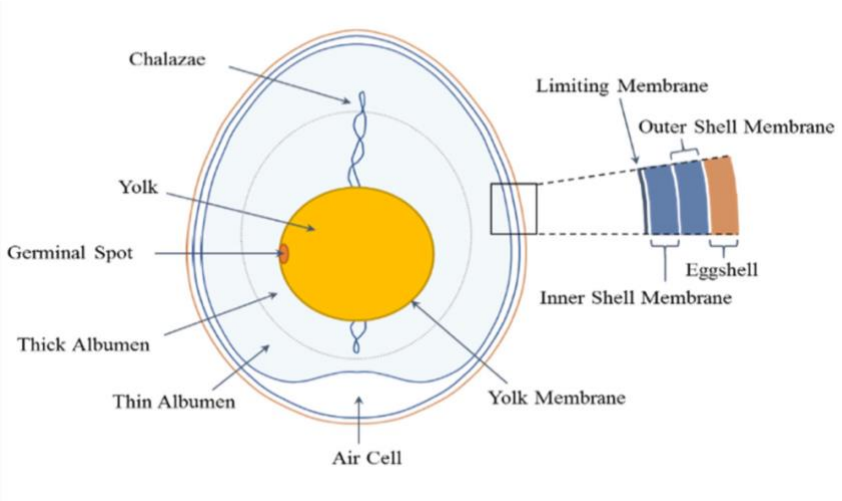
2.6.1. Composición de la membrana de la cáscara de huevo

El huevo de las aves está compuesto por la cáscara cuya constitución predominantemente es de carbonato de calcio-95%-y una matriz del tipo orgánico constituido por proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos[4]. La membrana de la cáscara de huevo (MCH) contiene, primordialmente, colágeno reticulado del tipo I, II, III, IV, y V[76], glucosaminoglicanos (sulfato de condroitina, glicoproteínas sulfatadas), proteínas de clara de

huevo (ovotransferina, lisozima), proteínas de la matriz de la cáscara (ovocalixina-36) y otros componentes como ácido hialurónico, ácido siálico, desmosina, isodesmosina, y 6-N-acetilglucosaminonidasa[77]. El uso de la membrana de cáscara de huevo incluye tanto la industria farmacéutica como alimentaria, y permite el intercambio de sustancias gaseosas, protege el embrión y posee un rol específico en la biomineralización de la cáscara de huevo [4,76].

A su vez, la MCH está dividida en tres capas, una capa interna, una capa externa y una membrana limitante. La estructura como tal se puede observar en la figura 12. La capa externa permite la unión estrecha entre la membrana y la cáscara del huevo, esta capa es la más gruesa con un grosor de 50 a 7 micrómetros. La capa interna interacciona con la externa mediante fibras que se entrelazan entre sí y ocurre la unión de estas, corresponde a la membrana limitante, una estructura delgada que cubre la clara del huevo[4].

Figura 12. Anatomía de un huevo y membranas del huevo.



Fuente: imagen tomada de la referencia, Shi[4].

La MCH es rica en fibras proteínicas (cerca de un 80 a 85% de proteínas)[4], de todas estas, es el colágeno la proteína que se encuentra en mayor proporción. Existen diversos tipos de colágeno, pero los encontrados en la MCH corresponden a: el tipo I, es el componente principal de hueso, piel, tendones, etc., el colágeno tipo II es de tipo cartílago, el de tipo III reticular, comúnmente encontrado unido al tipo I, el tipo IV forma la lámina basal la cual es

capa que separa el epitelio del tejido conectivo, y la de tipo V se encuentra en cabello y placenta[77]. La proporción de colágeno tipo I contra el V es de 100 a 1, en donde la capa externa contiene solo colágeno tipo I, la capa interna contiene colágeno tipo I y tipo V[4].

Entre las otras proteínas presentes en la MCH se encuentra la fibronectina, es una glicoproteína dimérica cuya función es activar proteínas de unión, la osteopontina posee numerosos puntos de unión entre las células y el calcio, además de estas proteínas también existen minerales de carbonato de calcio, sacáridos y otras sustancias como ácido urónico y siálico[4].

2.6.2. Extracción y separación de la membrana de la cáscara de huevo

En la separación y extracción de la MCH de la cáscara de huevo se pueden utilizar diversidad de métodos tanto físicos como químicos, gracias a estos se obtiene la membrana y luego se utiliza para diversos usos ya sea como membrana en estudios de liberación de fármacos o como suplementos alimenticios, entre otros. Los métodos de extracción se detallan a continuación.

2.6.2.1. Métodos no-químicos de extracción de la MCH

Los métodos de separación de la MCH de la cáscara de huevo se basan principalmente en las diferencias en fuerza mecánica y gravedad específica de la membrana y la cáscara. El método consiste en triturar el huevo (excluyendo su contenido interno) en su totalidad, luego, mediante la adicción de agua la separación puede ocurrir[78]. El grado de recuperación de membrana triturada es de un 85 a 95 % una vez que esta se separa de la mezcla basado en las diferencias de gravedad específica y utilizando técnicas como irradiación de ultrasonido y separación de partículas mediante filtrado[68]. El otro método físico consiste en usar un sistema de flotación de aire disuelto, donde la mezcla con la membrana y cáscara triturada es expuesta al aire a diferentes presiones, así las burbujas de aire se adhieren a las partículas y se pueden separar, el rendimiento del proceso suele ser de un 96%[78].

Otra manera de lograr la separación de la MCH de la cáscara de huevo es utilizando un método asistido con microondas. Dado que el contenido de agua de la MCH es mucho mayor que la de la cáscara, la membrana absorbe más radiación de microondas y se separa

la cáscara por un diferencial de calor y debilitación de las conexiones entre ambas. Después de este proceso, la membrana se puede terminar de separar de la cáscara mediante métodos manuales[80].

2.6.2.2.Métodos químicos de extracción de la MCH

Los métodos de separación química consisten en romper las interacciones fibrosas entre la membrana externa de la MCH y la capa mineralizada de la cáscara del huevo[67]. La ventaja de usar el método químico es que permite separar tanto la capa interna y externa de la MCH lo cual solo se alcanza usando ácidos o quelantes de calcio como el EDTA. Existen dos maneras de lograr la separación en medio ácido, uno es logrando la disolución de la cáscara mineral al sumergir la totalidad del huevo o las cáscaras del huevo en ácido por 24 horas mínimo y la MCH queda libre de la cáscara, o sumergir las cáscaras por un tiempo menor en el ácido seguido de su neutralización con una base fuerte para separar la MCH de la cáscara se usan métodos manuales[80].

El método más comúnmente utilizado es mediante la utilización de ácido clorhídrico, en concentraciones de 3.68 mol L^{-1} se obtiene una recuperación de la membrana de un 97.81. Con estos métodos, ya sea usando una sustancia ácida o alcalina se obtienen buenos rendimientos de recuperación, pero a costa de una posible pérdida de la bioactividad de la membrana y remoción de componentes solubles en ácido; incluido el hecho de usar sustancias químicas que impliquen un tratamiento ambiental posterior[78,81].

El uso de sustancias ácidas-alcalinas corresponde al proceso químico más utilizado. Sustancias ácidas como ácido clorhídrico y ácido acético, el primero es un ácido inorgánico fuerte y el segundo un ácido orgánico débil, no obstante, ambos ácidos son capaces de disolver el carbonato de calcio de la cáscara, así, la MCH se puede separar de la cáscara y con lavados posteriores limpiar los excesos de ácido utilizado[80]. El ácido posee la capacidad de romper los enlaces disulfuro y peptídicos presentes en la estructura proteínica de la membrana, el uso de ácido posee un efecto directo en la composición final de las proteínas presentes en la membrana lo cual limitaría su uso en otras áreas[78].

Las concentraciones de ácido utilizado en el método químico de separación de la MCH de la cáscara de huevo varían de autor a autor. Es posible la utilización de ácido acético al 10.0% y dejar las cáscaras en reposo por 48 horas[17], ácido clorhídrico con una concentración del 0.03 mol L^{-1} se lleva a ebullición por 10 minutos y se deja en reposo en agua destilada por una hora[72], ácido clorhídrico a una concentración de 0.5 mol L^{-1} se deja en reposo con la cáscara de huevo y se obtiene un rendimiento de 89.21%, ácido clorhídrico a una concentración de 3.68 mol L^{-1} por 40 minutos a 50º C se obtiene un rendimiento de 96.52%[71] y Manzanilla y Delgado-Mejia[13] recomiendan considerar el porcentaje de carbonato de calcio en la cáscara de huevo y la masa usada de cáscara para así usar una concentración de ácido tres veces mayor a la cantidad presente de carbonato de calcio para lograr una reacción estequiométrica completa. A su vez, Köse y Bayraktar[82] resumen ventajas y desventajas del uso de ácido y otras sustancias como EDTA y NaOH en la extracción de MCH, estas se resumen en el siguiente cuadro:

Tabla 1. Resumen de métodos químicos de la extracción de la MCH de la cáscara de huevo.

Método en resumen	**Desventajas**
Mantener la cáscara de huevo en HCl 0.5 mol L^{-1} seguido de separación manual.	Desnaturalización de colágeno y pérdida de colágeno soluble en ácido.
Mantener en solución de EDTA 5% a temperatura ambiente por 1 hora, seguido de separación manual.	Necesita separación manual complementaria, la membrana no se separa completamente.
Mantener la cáscara de huevo en HCl 0.5 mol L^{-1} seguido de la inmersión en NaOH 0.5 mol L^{-1} ambos por una hora	Desnaturalización de colágeno y pérdida de colágeno soluble en ácido.
Tratar la cáscara con NaOH o KOH al 3% a 80ºC en constante agitación seguido de neutralización con HCl 1-3 mol L^{-1}	Desnaturalización de colágeno y pérdida de colágeno soluble en ácido, útil para obtener

	la cáscara de huevo, pero no así la membrana.
Mantener en una solución de EDTA al 5% a 26ºc por 24 horas seguido de hexano por 3 minutos.	Sin afectación de la calidad de las proteínas, mínima contaminación de las partículas provenientes de la cáscara de huevo.

Fuente: elaboración propia con base en la referencia[82].

2.6.2.3.Métodos enzimáticos de extracción de la MCH

El principio de separación enzimático de la MCH de la cáscara de huevo consiste en la ruptura de los enlaces peptídicos entre las conexiones fibrosas de la membrana y las conexiones de la capa mineral de la cáscara. Las enzimas, usualmente utilizadas, son proteasas alcalinas y papaína obteniéndose un rendimiento de recuperación de un 98.9%. El método enzimático posee los mejores rendimientos que los otros métodos antes descritos, pero tiene el inconveniente de ser más caro por el uso de las enzimas[82].

2.6.3. Caracterización de la MCH

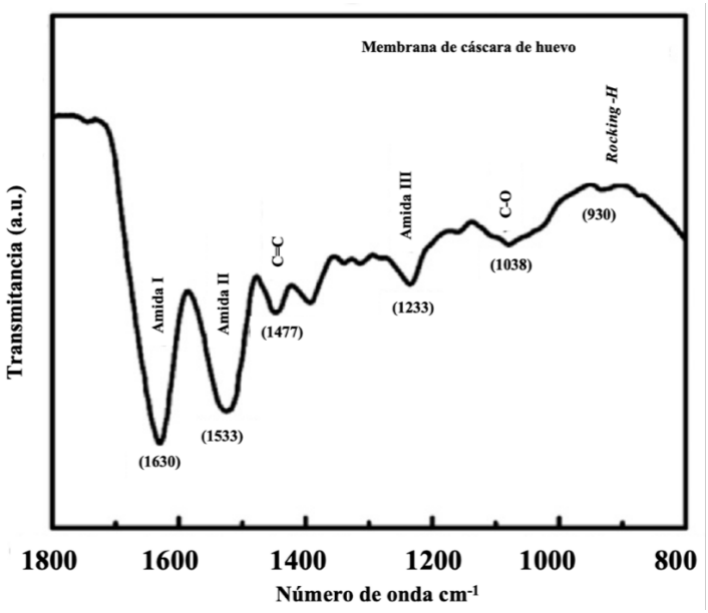
Una vez obtenida la MCH mediante los métodos anteriormente descritos, se tiene que caracterizar la membrana con el objetivo de evaluar el efecto de los diferentes métodos aplicados. Existe una diversidad de técnicas tanto físicas como químicas que se suelen utilizar para evaluar las características y el efecto de los métodos de extracción de la MCH. En los siguientes apartados se presentarán algunas de estas técnicas.

2.6.3.1.Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

Uno de los métodos analíticos más comúnmente utilizados es la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR por sus siglas en inglés). El FT-IR mide las bandas características de absorción vibracional para determinar características químicas estructurales, es decir, con esta técnica se puede diferenciar entre diversos tipos de grupos funcionales orgánicos. Dada a su versatilidad, el FT-IR se usa en una amplia variedad de escenarios incluida la evaluación de calidad de productos alimenticios como los huevos[83].

El espectro infrarrojo de la MCH presenta bandas de absorción vibracional específicas en la región de 800-1800 cm^{-1}. En el espectro en la figura 13, se observan varios picos de absorción a 1630, 1523 y 1233 cm^{-1} correspondientes a los enlaces amida I, II y III, resultantes del estrechamiento y acoplamiento de enlaces de hidrógeno del grupo carbonilo C=O con carboxilato COO^-, grupo amino N-H. El pico observado a 1477 cm^{-1} se asigna al estrechamiento del enlace C=C y la banda cerca de 1078 cm^{-1} se asigna a la vibración del enlace C-O. Respecto del pico en 930 cm^{-1} se asigna a la vibración tipo *rocking* del enlace C-H[85].

Figura 13. Espectro infrarrojo de la membrana de cáscara de huevo de 1660 a 800 cm^{-1}.

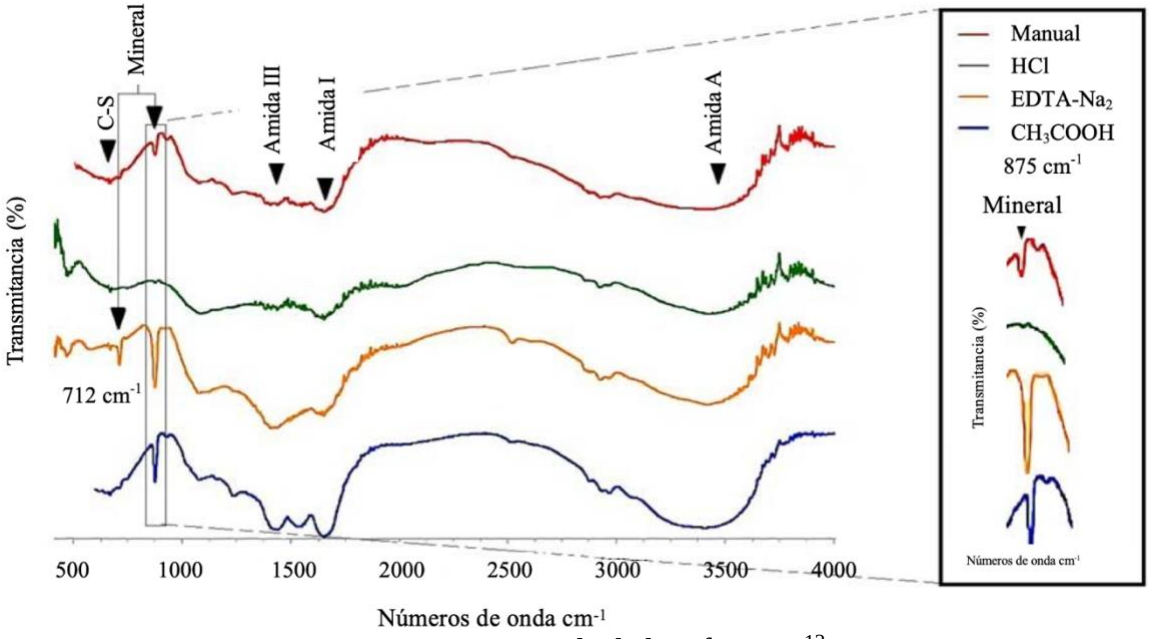


Fuente: imagen tomada de la referencia[82].

Como se mencionó con anterioridad, la MCH está compuesta por dos membranas una interna y otra externa, en la investigación de Mensah et al[84]., se observa que las membranas son similares ya que se presentan similitudes en las bandas del espectro infrarrojo. También, en la región de 4000 a 1660 cm^{-1} se pueden observar bandas características, la banda de Amida A se identifica en 3325 cm^{-1} correspondiente al estrechamiento de los enlaces N-H y O-H, no obstante, la absorción de agua en este rango es más notable que los enlaces antes mencionados; el pico a 2977 cm^{-1} representa a la amida B asociada con vibraciones del enlace C-H encontrados en grupos como =CH[84].

El tratamiento de separación de la MCH de la cáscara mineral posee un efecto directo sobre la composición de la membrana. El ácido acético es el ácido que logra el menor cambio en la composición de la membrana en comparación con la separación de membrana de forma manual, en cambio, el ácido clorhídrico es el ácido que mayor cambio provoca ya que el pico característico de amida III no es posible de identificar con el uso de este ácido. Tanto los espectros infrarrojos de las MCH obtenidas mediante el uso del ácido acético y el EDTA presentan la señal ubicada a 875 cm-1 característica de la capa mineral del huevo esto implica un daño mínimo en la membrana[13].

Figura 14. Efecto del tipo de ácido usado sobre la cáscara de huevo



Fuente: imagen tomada de la referencia[13].

2.6.3.2.Adsorción con azul de metileno e isotermas de adsorción

El azul de metileno es un indicador ácido-base utilizado en estudios de adsorción en equilibrio de sustancias porosas. La MCH es un material poroso capaz de adsorber pigmentos en medio acuoso debido a que las proteínas fibrosas poseen una gran área superficial con grupos hidroxilo, sulfhídrico, hidroxilo y amino los cuales pueden interaccionar mediante fuerzas intermoleculares con otras sustancias incluido el azul de metileno[85].

Adsorción se describe mediante el uso de isotermas, funciones que relacionan la cantidad de adsorbato (sustancia adsorbida) con el adsorbente (solución pigmento). Una de las isotermas más comúnmente utilizadas corresponde a la de Langmuir la cual asume una adsorción en monocapa a la superficie que contiene un número de sitios de adsorción y en donde no existe transmigración del adsorbato, es decir, una vez ocupados todos los espacios disponibles de adsorción, el material adsorbente se satura[85]. La isoterma de Langmuir se puede expresar de acuerdo con la ecuación no linealizada 8 y linealizada 9, donde C_e es la concentración en equilibrio en mg L^{-1}, q_e la cantidad, en mg, de adsorbato adsorbido en equilibrio, K_L es la constante de Langmuir en L mg^{-1} y que refleja la intensidad de adsorción, y q_m es la constante que refleja la capacidad de adsorción en mg g^{-1}.

$$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{(1+ K_L C_e)} \text{ ecuación } N^o 8$$

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{q_m K_L C_e} \quad \text{ecuación } N^o 9$$

Utilizando la forma linealiza de Langmuir (ecuación 9) se puede obtener q_m con el intercepto y K_L con la pendiente cuando se grafica q_e^{-1} y C_e^{-1} estos valores representarán la cantidad máxima de adsorbato adsorbido por gramo de adsorbente y la constante de Langmuir, respectivamente[87]. La ecuación número 9 muestra una de las cuatro maneras en las cuales la isoterma de Langmuir puede ser linealizada, la indicada en ecuación Nº10 corresponde en aquellos casos donde la concentración en equilibrio y la concentración del adsorbente inicial suelen ser muy cercanas entre sí[86]. Las otras maneras de linealización de Langmuir corresponden a graficar C_e/q_e vs C_e, q_e vs q_e/C_e, q_e/C_e vs q_e; la escogencia del método de linealización estará determinado de acuerdo con las propiedades del adsorbente y del adsorbato[87].

De acuerdo con el modelo de Freundlich, la adsorción tiene lugar en una superficie adsorbente, que es de naturaleza heterogénea y, posteriormente, se forma una cobertura multicapa sobre la superficie. En este caso, los sitios activos de adsorción tienen diferentes valores de energía. Por lo tanto, la distribución de la adsorción sobre la superficie no es uniforme y los centros de adsorción activos asociados con la máxima energía adsorben

primero las moléculas y luego los centros con cada vez menos energía. La ecuación que refleja la naturaleza de la isoterma de Freundlich linealizada se muestra a continuación[87]:

$$ln\ q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \qquad \text{ecuación } N^o10$$

Al igual que en la isoterma de Langmuir, q_e representa la cantidad de fármaco en equilibrio y C_e la concentración en equilibrio, K_F (L/mg) es la constante de equilibrio y está relacionada con la capacidad de adsorción. Aquí, la intensidad de la interacción adsorbente-adsorbato se puede determinar mediante el factor de heterogeneidad superficial 1/n. Cuando el valor 1/n se encuentra entre $0 < 1/n < 1$, indica una adsorción favorable. Además, si su valor es cercano a 0, la superficie puede ser de naturaleza más heterogénea. Nuevamente, si el valor es $n < 1$, se dice que el proceso es químico, mientras que sería adsorción física si $n > 1$[88].

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

El siguiente apartado posee como objetivo establecer y explicar la manera cómo se realizará la presente investigación. El apartado incluiría las diversas fuentes de información, así como también el análisis de su validez de acuerdo con los niveles de evidencia los cuales son necesarios para confirmar la veracidad de la información por analizar.

Este capítulo está conformado por el enfoque de investigación, el tipo de estudio y las fuentes de información para la investigación. Por otra parte, se analizará cual pieza de información posee relevancia para el trabajo y, finalmente, construir de manera específica la metodología experimental, incluyendo los materiales de laboratorio por usar.

3.1 Tipo de investigación

El presente trabajo se clasifica como una investigación de tipo experimental desde el punto de vista de su diseño. Este tipo de investigaciones se caracterizan por someter un objeto o un grupo de individuos en ciertas condiciones o tratamientos para lograr observar que sucede o cuáles cambios se esperan obtener[89]. Este tipo de investigaciones seguirán los principios de las investigaciones científicas las cuales buscan verificar hipótesis o teorías que no están lo suficientemente probadas[90].

Las investigaciones de carácter experimental son trabajos de carácter explicativo, puesto que se busca el porqué de hechos, eventos y fenómenos. Estará enfocado en cómo ocurre un fenómeno y en qué condiciones este se manifiesta y así entonces tratará de relacionar una o más variables entre si[89]. El investigador buscará realizar experimentos para lograr probar hipótesis y con ello llegar a las conclusiones de la investigación.

Respecto al alcance explicativo, Galarza[91] hace referencia al siguiente punto

> En el contexto cuantitativo se pueden aplicar estudios de tipo predictivo en donde se pueda establecer una relación causal entre diversas variables... Por otro lado, los estudios experimentales, en los cuales se pueda generar una manipulación intencionada de la variable independiente, pueden permitir comprobar hipótesis que expliquen el comportamiento de un determinado fenómeno.

De acuerdo con lo citado anteriormente, esta investigación pretende evaluar la liberación in vitro de diversos productos farmacéuticos de uso tópico que contienen el principio activo de diclofenaco, así entonces, la variable independiente de la investigación será el producto farmacéutico y la cantidad de fármaco que permea a través de la membrana de cáscara de huevo será la variable dependiente dado que conocer cuantitativamente este valor permitirá resolver los objetivos de la investigación.

3.2 Fuentes de información

Campos[92], aclara que las fuentes de información son aquellas obtenidas ya sea de primera mano o mediante otro medio. Con el uso de las fuentes se pretende obtener los datos a primera mano y con estos resultados analizar las variables que lleven a las conclusiones del proyecto. También, existe información de tipo secundaria que corresponde a investigaciones bibliográficas anteriormente realizadas y que una u otra forma poseen una similitud con la actual investigación.

3.2.1. Fuentes de información primaria

Las fuentes de información primaria proporcionan datos de primera mano, que en investigaciones cualitativas corresponderán a resultados de estudios anteriores. No obstante, en investigaciones cuantitativas, la información obtenida corresponderá a aquella que resulte de un experimento como tal, es decir, aquellos resultados que se obtengan de la investigación[90]. Las fuentes de información primaria del proyecto corresponderán a los diversos experimentos que se realizaron de primera mano.

En el presente estudio, se pretende estudiar la liberación del fármaco diclofenaco a través de la membrana de huevo. Este principio activo estaría disuelto en un medio acuoso a un pH de 7.0 tal y como se explicó en el marco teórico. De manera que la cantidad de fármaco disuelto con respecto al tiempo sería la fuente de información primaria y la correcta manipulación de esta bajo modelos matemáticos y científicos permitirán la resolución de los objetivos de la investigación.

3.2.2. Fuentes de información secundaria

Las fuentes de información secundaria remiten a documentos primarios en donde se ha mencionado o comentado de forma breve dichos documentos[91]. En la presente investigación, las fuentes de información secundaria corresponderán a otras investigaciones en donde se obtuvieron datos de primera mano y permitirán comparar o evaluar los resultados que se obtendrán en la investigación.

3.3 Criterios de búsqueda de información

En la siguiente tabla, se recopilan los criterios de búsqueda de información para cada uno de los objetivos de la investigación.

Tabla 2. Criterios de búsqueda de información consultados para la investigación.

Objetivo	**Descriptores**	**Motores de búsqueda**	**Periodo de estudio**	**Idioma**
Establecer las condiciones óptimas de obtención de la membrana de cáscara de huevo natural mediante la manipulación de variables experimentales asociadas al proceso.	Membrana de cáscara de huevo Extracción de cáscara de huevo	Google academic Science direct Springer link PubMed	2017-2023	Español e inglés
Optimizar los parámetros experimentales	Parámetros de estudios de liberación in	Google academic Science direct	2017-2023	Español e inglés

de los estudios de liberación in vitro (IVRT).	vitro de fármacos tópicos	Springer link PubMed		
Determinar si existen diferencias en el comportamiento de liberación del fármaco en las distintas formulaciones de diclofenaco gel, mediante el análisis de las curvas de concentración de fármaco liberado en función del tiempo de las formulaciones analizadas	Dermocinética Curvas de liberación in vitro de fármacos	Google academic Science direct Springer link PubMed	2017-2023	Español e inglés

Fuente: elaboración propia, 2023.

3.4 Criterios de exclusión e inclusión

Dentro de la investigación es importante discernir entre aquella información que genera un aporte y aquella que, aunque parezca tener relación con los objetivos del trabajo no está ciertamente alineado con estos y, por ende, no es correcto utilizar. Los criterios de inclusión de la investigación son aquellas características que necesitan tener el sujeto o las variables de investigación para poder ser investigados, por el contrario, los criterios de

exclusión corresponderán a las características de las variables que pueden modificar o alterar resultados y por ende, no son consideradas para el estudio[93].

En la siguiente tabla, se muestran los criterios de inclusión y exclusión basados en los objetivos de la investigación:

Tabla 3. Criterios de inclusión y exclusión considerados en la investigación

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Artículos relacionados con el uso de membrana de cáscara de huevo en estudios de permeabilidad y difusión.	Artículos relacionados con el uso de membranas artificiales diferentes a las de cáscara de huevo o aquellas de origen animal o humano.
Artículos relacionados con la evaluación de permeabilidad y/o liberación in vitro de diclofenaco sódico, etilamina y potásico.	Artículos relacionados con la evaluación de permeabilidad y/o liberación in vitro de fármacos diferentes al diclofenaco.
Artículos relacionados con estudios de liberación in vitro de fármacos tópicos	Artículos relacionados con estudios de liberación in vivo de fármacos tópicos
Artículos relacionados con el uso de métodos cinéticos para la evaluación de las curvas de liberación de fármacos tópicos incluidos cinéticas orden cero, de orden uno, de Higuchi, de Hixson-Crowell, de Peppas y de Korsmeyer-Peppas.	Artículos relacionados con el uso de métodos cinéticos para la evaluación de las curvas de liberación de fármacos tópicos diferentes a los siguientes modelos cinéticos de orden cero, de orden uno, de Higuchi y de Korsmeyer-Peppas.

Fuente: elaboración propia, 2023.

3.5 Clasificación de información según el nivel de evidencia

Para poder realizar la clasificación de los artículos consultados en el capítulo IV, es necesario utilizar el sistema propuesto por Sackett. De acuerdo con Mella et al[94], el sistema de Sackett busca crear una jerarquización en cinco niveles, en donde en el nivel cinco la información será menos precisa dado que esta información carece de justificación científica. Por otra parte, en el nivel uno se ubica todo aquel estudio que posee revisiones sistemáticas, como ensayos clínicos controlados y estudios de cohortes.

En la siguiente tabla se recopila los artículos encontrados y designados de acuerdo con el sistema de Sackett.

Tabla 4. Cuadro de evidencias según Sackett

Nivel de evidencia	Tipo de estudio	Cantidad según tipo	%
3	Revisión sistemática de estudios observacionales	5	35.7
4	Estudios transversales	4	28.6
4	Estudios de caso	1	7.1
5	Revisión bibliográfica	6	28.6
Total		15	100

Fuente: elaboración propia, 2023.

3.6 Variables de la investigación

De acuerdo con Espinos[95] las variables en una investigación corresponden:

> Al resultado del proceso de operativización desde el plano teórico al plano empírico, son las manifestaciones de los constructos, y a las que se les puede asignar valores o

palabras, que el investigador va a relacionar o contrastar…una variable experimental explica los detalles de las manipulaciones que el investigador hará con ellas.

La tabla siguiente muestra la operacionalización de las variables correspondientes a la definición conceptual, indicadores y la escala utilizada considerando que la presente investigación posee una naturaleza experimental.

Tabla 5. Operacionalización de las variables

Objetivo	Variable	Definición conceptual	Indicador	Escala
Establecer las condiciones óptimas de obtención de la membrana de cáscara de huevo natural mediante la manipulación de variables experimentales asociadas al proceso.	Membrana de cáscara de huevo (MCH)	Matriz del tipo orgánico constituido por proteínas, glicoproteínas y proteoglicanos[4]	Características fisicoquímicas Capacidad de adsorción	Nominal
Optimizar los parámetros experimentales de los estudios de liberación in vitro (IVRT).	Intervalo de muestreo	El tiempo de duración total de los estudios IVRT se establecen de acuerdo con los objetivos del estudio.	Linealidad de la cinética de Higuchi	Nominal

	Tipo de análisis	Cuantificación del principio activo	Absorbancia del principio activo	Nominal
Determinar si existen diferencias en el comportamiento de liberación del fármaco en las distintas formulaciones de diclofenaco gel, mediante el análisis de las curvas de concentración de fármaco liberado en función del tiempo de las formulaciones analizadas.	Cantidad de fármaco liberado	Microgramos de fármaco que logra difundir a través de la membrana desde la cámara donante a la receptora	Absorbancia de la muestra	Nominal
	Cinéticas IVRT	Cinética de liberación de fármacos en matrices poliméricas	Valores de coeficiente de determinación Ajuste lineal	Nominal

Fuente: elaboración propia, 2023.

3.7 Procedimiento de recolección y análisis de datos

La recolección y análisis de los datos de la investigación se realizará mediante el uso de técnicas analíticas que incluyen el uso de celdas de difusión de Franz y un espectrofotómetro ultravioleta-visible. La celda de difusión de Franz se utilizará para realizar los estudios de liberación in vitro mediante el muestreo continuo de muestra con respecto al tiempo al utilizarse una cantidad de muestra en específico.

El espectrofotómetro es el equipo que permitirá la obtención de los valores de absorbancia que serán utilizados posteriormente para la obtención de las curvas de liberación de fármaco con respecto al tiempo. Con los valores obtenidos de absorbancia, es posible obtener los datos de concentración al utilizarse una curva de calibración de diclofenaco sódico y convertir la concentración de fármaco a microgramos de muestra.

Los datos de cantidad de muestra liberada con respecto al tiempo serán utilizados para obtener las diferentes cinéticas de liberación de fármaco y así, analizar la variaciones o diferencias entre los productos tópicos en estudio.

3.8 Instrumentos y técnicas

Por lo general, cada instrumento de la investigación cumple una función específica y el investigador opta por uno de ellos debido a las ventajas que ofrece en comparación con la observación sin instrumentos. Estas ventajas incluyen la capacidad de registrar de manera constante y uniforme los fenómenos bajo observación, lo que mejora la precisión de las observaciones y el instrumento en sí.

Los instrumentos utilizados en este trabajo investigativo son las observaciones de los datos y la experimentación. Con estos instrumentos se pretende recolectar la información necesaria para obtener los resultados de la investigación.

3.9 Materiales, reactivos, equipos y condiciones

En el siguiente apartado, se adjuntarán los distintos materiales, equipos y las condiciones para el desarrollo de la práctica experimental y así obtener los perfiles de liberación de diclofenaco en diversos productos tópicos.

3.9.1. Extracción de la membrana de la cáscara de huevo

Para la extracción de la membrana de la cáscara de huevo se necesitarán los siguientes materiales e instrumentos de laboratorio.

Tabla 6. Materiales necesarios para la extracción de la membrana de la cáscara de huevo y su descripción

Materiales	Descripción
Ácido acético glacial 100%	Acido orgánico utilizado para realizar la disolución de la cáscara de huevo y con ello obtener la membrana de la cáscara. Se utilizará concentraciones variadas para la optimización de las condiciones de extracción.
Huevos de Gallus gallus	Se utilizarán los huevos de gallina Gallus gallus obtenidos de un supermercado local
Beaker	Material de vidrio que posee como función contener soluciones acuosas y orgánicas. Se utilizarán para contener las soluciones de ácido acético con las cáscaras de huevos.
Colador y pinzas	Materiales que se utilizarán para completar la remoción de la membrana de cáscara de huevo.
Buffer salino de pH 7.0	Solución salina para contener y preservar las membranas de cáscara de huevo y evitar su descomposición. Su preparación se describe en siguientes secciones.

Fuente: elaboración propia, 2023.

3.9.2. Estudios de liberación in vitro

Para llevar a cabo los estudios de liberación in vitro se necesitarán los siguientes materiales y condiciones.

Tabla 7. Materiales para realizar los estudios de liberación y su descripción

Materiales	Descripción
Buffer salino de pH 7.0	El buffer salino será utilizado como medio de disolución para la cámara receptora del sistema modificado de Franz.
Sistema difusión de Franz.	Se utilizará una celda de difusión de Franz adquirida mediante el proveedor Permagear. La celda es de 5 mL de volumen, sin chaqueta y con un área de orificio de 0.64 cm^2.
Beaker	Los beaker serán utilizados para contener las soluciones salinas receptora.
Sistema de agitación-calentador	La solución receptora necesita estar en constante agitación la cual se definirá de acuerdo con los objetivos y la temperatura, necesita mantenerse a 32 grados Celsius.
Termómetro	Se utilizará termómetro para llevar el control de la temperatura en el baño de agua

Fuente: elaboración propia, 2023.

3.9.3. Componentes reactivos

En la siguiente tabla, se resume los reactivos por utilizar en la presente investigación y así poder llevar a cabo los objetivos experimentales.

Tabla 8. Lista de reactivos necesarios para la realización de los estudios de liberación

Reactivo	Descripción

Diclofenaco sódico	Estándar secundario de diclofenaco sódico utilizado para la elaboración de la curva de calibración
Cloruro de sodio	Sales inorgánicas utilizadas para la preparación del buffer pH salino (Buffer pH 7.0)
Cloruro de potasio	
Fosfato monobásico de sodio	
Fosfato dibásico de sodio	

Fuente: elaboración propia, 2023.

3.9.4. Equipos electrónicos

En la siguiente tabla, se resume los equipos utilizados en la presente investigación para obtener la data cuantitativa por analizar.

Tabla 9. Lista de equipos electrónicos necesarios para obtener la data necesaria para la investigación

Equipo	Descripción
Espectrofotómetro infrarrojo Agilent Cary 630 FTIR	Equipo necesario para obtener los espectros infrarrojos de las membranas de cáscara de huevo secas.
Colorímetro Vernier	Colorímetro que trabaja con 4 longitudes de ondas (430, 470, 565 y 635 nm) para el estudio de adsorción con azul de metileno.
Espectrofotómetro UV-Vis Vernier	Espectrofotómetro ultravioleta que trabaja en el rango de 220 a 900 nm.

Fuente: elaboración propia, 2023.

3.10 Diseño de Experimentos

En los siguientes apartados se establecerán los procedimientos realizados que se siguieron para el cumplimiento de cada objetivo.

3.10.1 Extracción de la membrana de la cáscara de huevo

Para la extracción y separación de la MCH de la cáscara de huevo se siguió la siguiente metodología. Como observación, la compra de los huevos se realizó en el supermercado Masxmenos ubicado en Santa Ana, 300 metros norte de la Cruz Roja de Santa Ana, San José. No obstante, puede existir variabilidad en los huevos dado que se desconoce el origen exacto de los mismos.

3.10.1.1 Preparación de las soluciones acuosas de ácido acético

1. En una capilla de extracción colocar en un beaker de 150±12.5 mL, 100 mL de ácido acético glacial concentración 17.4 mol L^{-1}.[96]
2. En un balón de 500.00±0.25 mL colocar cerca de 200 mL de agua destilada con ayuda de una probeta de 250.0±0.5 mL.
3. Del beaker preparado en el punto 1, tomar un volumen de 43 mL utilizando una probeta de 100.0±0.5 mL, y transferir al balón de 500 mL.
4. Llevar el balón hasta la marca y agitar vigorosamente. (concentración aproximada 1.5 mol L^{-1}).
5. Transferir el contenido del balón a un beaker de 500±50 mL.
6. Repetir el paso 3 utilizando volúmenes de 36, 29, 22 y 14 mL utilizando una probeta de 100±0.5 mL, y transferir a sendos balones de 500 mL que contienen 200 mL de agua destilada para obtener concentraciones de 1.25, 1.00, 0.75 y 0.50 mol L^{-1}.

3.10.1.2 Separación del contenido interno del huevo

1. Realizar un pequeño orificio en uno de los extremos del huevo y proceder a extraer la clara y yema en un recipiente aparte.
2. Lavar el interior del huevo con abundante agua caliente hasta que el contenido interno salga como un líquido transparente.

3. Extraer todo el líquido interior y dejar secar por lo menos 12 horas.

3.10.1.3 Separación de la MCH de la cáscara de huevo

1. En una balanza analítica con precisión de ±0.1 mg, pesar un vidrio de reloj.
2. Colocar el huevo sin contenidos y seco en el vidrio de reloj, reportar esta masa como masa de vidrio de reloj más cáscara de huevo seco.
3. En un baño maría a 50 ºC colocar las soluciones de diversas concentraciones de ácido acético antes preparadas en el punto 3.10.1.1.

Figura 15. Calentamiento de las disoluciones de ácido acético de varias concentraciones a

Fuente: elaboración propia, 2023.

4. Una vez alcanzada la temperatura deseada, colocar una cáscara de huevo por cada solución de ácido acético y dejar en constante agitación por 20 minutos a 150 rpm.
5. Una vez transcurrido el tiempo, retirar la cáscara de las soluciones y colocar en una servilleta seca.

Figura 16. MCH obtenidas después del proceso de extracción en medio ácido

Fuente: elaboración propia, 2023.

6. Retirar manualmente la MCH de las cáscaras anteriormente tratadas y sumergir en un en volumen de agua destilada suficiente para cubrir en su totalidad las membranas recién extraídas. Se recomienda un volumen de 200 mL de agua destilada.
7. Después de cinco minutos, colocar las MCH en una servilleta y dejar secar por 24 horas a temperatura ambiente en un lugar abierto para la evaporación completa del agua.

3.10.2 Evaluación de la capacidad adsorbente de la MCH

1. Las membranas obtenidas en el punto 3.10.1.3 se secan en un horno con una temperatura por debajo de 100ºC, el tiempo necesario hasta que las membranas estén completamente secas.
2. En una balanza analítica con precisión de ±0.1 mg, pesar un Erlenmeyer de 125 mL.
3. En el mismo recipiente, pesar con exactitud 0.1 g de MCH seca y determinar la masa obtenida por diferencia.
4. Para el estándar de azul de metileno (AM), pesar en un balón de 100 mL 0.500 gramos de AM y disolver con agua destilada hasta la marca. De este balón, tomar una alícuota de 2.5 mL en un balón de 100 mL y diluir hasta la marca con agua destilada. Concentración (500 mg mL^{-1})
5. Del estándar diluido preparar seis soluciones de concentraciones de 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mg mL^{-1}.
6. Leer cada muestra en un colorímetro anteriormente calibrado con agua a 635 nm y reportar las absorbancias.
7. Adicionar a un Erlenmeyer obtenido en el paso 3, 50 mL de la solución de AM de concentración de 1 mg mL^{-1}. Repetir el proceso para los otros seis recipientes que contienen las membranas.
8. Dejar reposar los recipientes por 2 horas, y transcurrido este tiempo leer cada muestra en un colorímetro anteriormente calibrado con agua a 635 nm y reportar las absorbancias.

3.10.3 Caracterización de la MCH por espectroscopía infrarroja (IR)

1. Las membranas obtenidas en el punto 3.10.1.3 se secan en un horno con una temperatura por debajo de 100ºC, el tiempo necesario hasta que las membranas estén completamente secas.
2. Para la obtención de los espectros infrarrojos de las muestras utilizar el espectrofotómetro IR marca Agilent technologies mostrado en la siguiente figura.

Figura 17. Espectrofotómetro infrarrojo Agilent Cary 630 FTIR utilizado en la investigación

Fuente: elaboración propia, 2023.

3. Limpiar el portaobjetos del equipo utilizando un poco de acetona y secar con una toalla limpia y seca.
4. Realizar el barrido inicial del blanco de 1000 a 4000 cm^{-1} para la remoción de las señales generadas por la humedad del aire.

5. Colocar una pequeña cantidad de muestra en el portaobjetos y prensar la muestra con el botón de presión de muestra hasta escuchar un “click”.
6. Realizar el barrido de la muestra y guardar la información obtenida.

3.10.4 Optimización de las condiciones experimentales de los perfiles de liberación

Para lograr la optimización de los parámetros experimentales se llevaron a cabo diversas pruebas que determinaron el procedimiento a seguir para el cumplimiento del objetivo 2. Estos procedimientos se detallan a continuación.

3.10.4.1 Evaluación de la linealidad del sistema

1. En una balanza analítica con precisión de ±0.1 mg, pesar un balón aforado de 100.0 ±0.1 mL.
2. Por diferencia, adicionar con exactitud 5±0.1 mg del estándar de diclofenaco sódico.
3. Adicionar una alícuota de 5.00±0.1 mL de etanol al 80% para disolver el estándar. Aforar el balón hasta la marca con buffer pH 7.0. Concentración (0,05±0.01 mg mL^{-1})
4. De la solución madre preparada en el punto 3, tomar alícuotas de 1.00,2.00,3.00 y 4.00 usando una pipeta graduada de 5.00±0.05 mL. Adicionar las correspondientes alícuotas en sendos balones de 25.00±0.04 mL y aforar hasta la marca con buffer de fosfatos de pH 7.0. Concentraciones (0.0020±0.0004, 0.0040±0.0008, 0.006±0.001 y 0.008±0.002 mg mL^{-1})
5. Leer los puntos de la curva de calibración en el espectrómetro UV-Vis marca Vernier a una longitud de onda de 275 nm utilizando blanco buffer de pH 7.0.
6. Determinar la desviación estándar (SD) de los valores de “y” y calcular el límite de detección y cuantificación usando la fórmula 3.3*SD y 10*SD respectivamente.
7. Se repite el paso 1, 2 y 3 pero usando una masa de 10.0±0.1 mg del diclofenaco sódico en un balón de 100 mL. Concentración (0.10±0.01 mg mL^{-1})
8. De la solución madre preparada en el punto 5 tomar alícuotas de 1.00,2.00,3.00 y 5.00 usando una pipeta graduada de 5.00±0.05 mL. Adicionar las correspondientes alícuotas en sendos balones de 25.00±0.04 mL y aforar hasta la marca con buffer pH

7.0. Concentraciones (0.0040±0.0008, 0.0080±0.002, 0.010±0.005 y 0.020±0.001 mg mL^{-1})

9. Leer los puntos de la curva de calibración en el espectrómetro UV-Vis marca Vernier a una longitud de onda de 275 nm utilizando blanco buffer de pH 7.0.
10. Determinar la desviación estándar (SD) de los valores de "y" y calcular el límite de detección y cuantificación usando la fórmula 3.3*SD y 10*SD, respectivamente.

3.10.4.2 Evaluación del tiempo de remojo de la MCH en buffer pH 7.0

1. Colocar cerca de 25 mL de buffer de fosfatos pH 7.0 en un baño maría a 32±1 ºC el tiempo necesario para que la solución alcance esta temperatura.
2. Utilizar las membranas secas obtenidas en el punto 3.10.1.3.
3. Preparar dos placas de Petri, cada una con suficiente cantidad de buffer y en cada placa colocar las MCH y establecer el cronómetro en 15 minutos para una placa y 30 minutos para la segunda.
4. Pasados los tiempos respectivos, se coloca la membrana en la cámara donante y se realiza un estudio de liberación por 15 minutos.
5. La cámara se llena con 1 ml de un estándar de diclofenaco sódico 0.020 mg mL^{-1}.

3.10.4.3 Determinación del tiempo total del estudio de liberación

1. Colocar cerca de 25 mL de buffer pH 7.0 en un baño maría a 32±1 ºC el tiempo necesario para que la solución alcance esta temperatura.
2. Una vez alcanzada la temperatura llenar por completo la celda de difusión de Franz de 5 mL. El líquido debe rebalsarse para asegurar que la celda esté completamente llena. Adicionar la pastilla magnética a la cámara receptora.
3. Utilizar el producto tópico Voltaren® emulgel como muestra referencia.
4. Colocar la membrana de cáscara de huevo-previamente remojada por 30 minutos en buffer pH 7, en la parte superior de la celda de difusión de Franz.

5. Con ayuda del tubo dispensador del producto, colocar dos dosis equivalentes a 100-300 mg de producto sobre la membrana y con ayuda de una espátula pequeña dispersar la muestra uniformemente sobre la membrana.
6. Colocar el anillo de teflón sobre la membrana y sobre este, colocar el disco de soporte.
7. Prensar el disco de soporte con la cámara receptora con ayuda de la prensa de metal.
8. Colocar la celda de Franz en el baño maría a 32 ºC por 90 minutos. Tomar alícuotas de la muestra en intervalos de 15 minutos.
9. Leer las muestras en el espectrómetro UV-Vis marca Vernier a una longitud de onda de 275 nm utilizando como blanco el buffer de fosfatos de pH 7.0.
10. Repetir los pasos anteriores hasta el 8, pero se tomando alícuotas cada 30 minutos hasta alcanzar un tiempo total de 180 minutos.
11. Repetir los pasos anteriores hasta el 8, pero se toman alícuotas cada 60 minutos hasta alcanzar un tiempo total de 360 minutos.

3.10.5 Obtención de las absorbancias para la construcción de los IVRTs de los productos tópicos

El presente procedimiento hace referencia a los pasos seguidos en la obtención de los perfiles de IVRT de los cuatro productos tópicos en estudio. Al final del procedimiento, se adjunta un diagrama de flujo que explica los aspectos más relevantes de la metodología propuesta.

1. Colocar un sistema de baño maría a una temperatura de 32 ºC,, para ello se puede colocar una bandeja pírex con suficiente agua sobre una plantilla y mantener a la temperatura deseada.
2. Para la preparación de la membrana anteriormente extraída de la cáscara de huevo dejarla en remojo en al menos 15 mL de buffer de fosfatos de pH 7.0 por lo menos 30 minutos.
3. Llenar la cámara receptora de la celda de difusión de Franz con buffer de pH 7.0 hasta que el líquido rebalse un poco a través del orificio de la cámara receptora.
4. Adicionar la pastilla de agitación magnética a través del canal de muestreo.

5. Colocar sobre la parte superior de la cámara receptora la MCH previamente remojada en el buffer pH 7.0. Asegurarse de que la membrana cubra en su totalidad la parte superior de la cámara receptora.

Figura 18. Membrana de la cáscara de huevo colocada sobre el orificio de la cámara receptora de Franz

Fuente: elaboración propia, 2023.

6. Secar ligeramente la membrana con una servilleta para permitir una mejor aplicación del producto.
7. Colocar una cantidad de muestra equivalente a 100 mg de producto en el borde de la parte superior de la membrana y con ayuda de una espátula distribuir la totalidad del producto por toda el área de la membrana.

Figura 19. Aplicación de la muestra sobre la MCH una vez fijada sobre la cámara receptora.

Fuente: elaboración propia, 2023.

Figura 20. Distribución de la muestra sobre la MCH situada sobre la cámara receptora.

Fuente: elaboración propia, 2023.

8. Colocar el anillo de teflón encima de la membrana y sobre este colocar la cámara donante. Con ayuda del anillo de metal, se prensa la cámara donante con la cámara receptora.

Figura 21. Colocación del anillo de teflón sobre la cámara receptora de Franz que dispone de la MCH con la muestra aplicada del fármaco.

Fuente: elaboración propia, 2023.

Figura 22. Colocación de la cámara donante sobre el anillo de teflón y membrana

Fuente: elaboración propia, 2023.

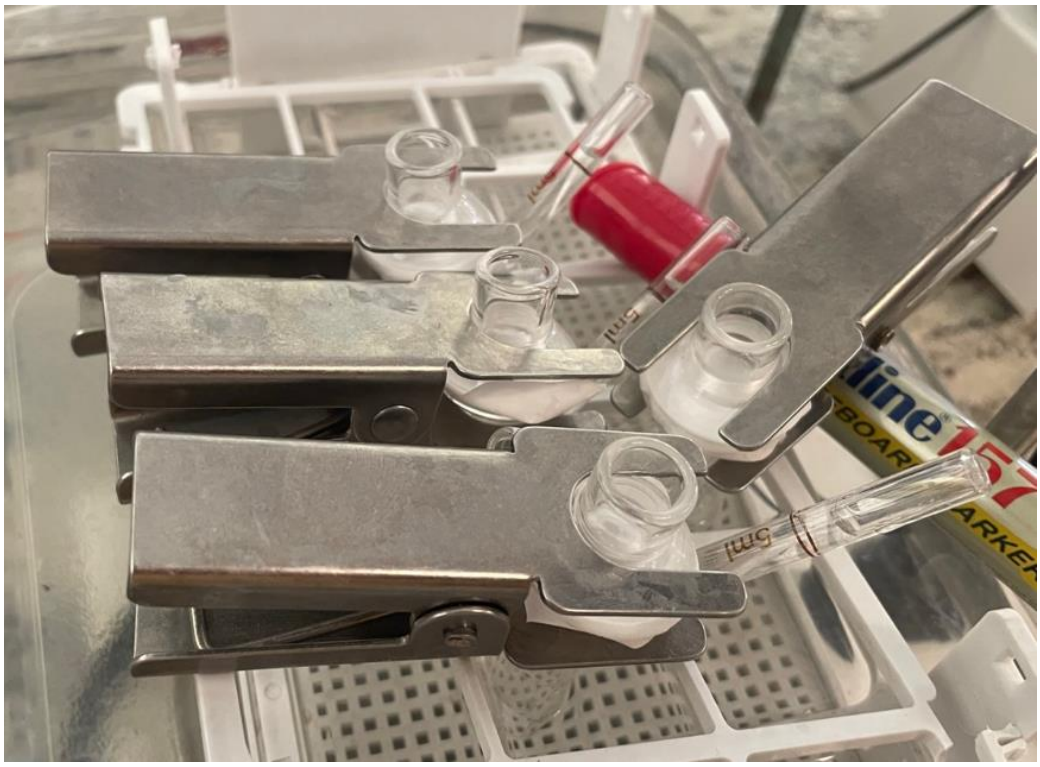
9. Tapar la parte superior de la cámara donante con papel parafina y sellar por completo.

Figura 23. Celda de Franz ensamblada

Fuente: elaboración propia, 2023.

10. Asegurase que no haya gotas atrapadas en ninguna sección de la cámara receptora, si la hubiera, inclinar ligeramente la celda de Franz y permitir la salida de burbujas de aire a través del canal de muestreo.
11. Colocar la celda de difusión de Franz en el baño maría a 32 ºC y activar la agitación magnética.

Figura 24. Celdas de difusión de Franz colocadas en el baño maría



Fuente: elaboración propia, 2023.

12. Poner un cronómetro por 3.5 horas y muestrear una cantidad cercana a 2 cm^3 a través del canal de muestreo a los 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 minutos.
13. Luego de cada muestreo rellenar la cámara receptora con buffer pH 7.0. De ser necesario, inclinar ligeramente la cámara para liberar las posibles burbujas a través del canal de muestreo.
14. Leer cada muestra obtenida en el espectrofotómetro UV-vis marca Vernier a una longitud de onda de 275 nm, usando buffer pH 7.0 como blanco.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este apartado, se discutirá y analizará los distintos resultados obtenidos de manera experimental fundamentados, cuando corresponda, con sustentos teóricos y científicos correspondientes a los artículos obtenidos de algunas revistas de los últimos cinco años, con el fin de responder los objetivos específicos de la presente investigación.

4.1 Establecer las condiciones óptimas de obtención de la membrana de cáscara de huevo natural mediante la manipulación de variables experimentales asociadas al proceso.

Para responder al objetivo específico número uno se establecieron una serie de experimentos para, primeramente, obtener la MCH y a partir de ahí, lograr la caracterización de las membranas. Tal y como se describió en el capítulo III, se realizaron diversos experimentos para lograr la extracción de la MCH de la cáscara de huevo que incluyeron:

- Se utilizó ácido acético de diversas concentraciones molares con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración para facilitar el retiro de la MCH de la capa mineral del huevo
- Se determinó el porcentaje de recuperación de MCH de la cáscara con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración de ácido acético sobre esta variable.
- Se utilizó espectroscopia infrarroja para evaluar la integridad de la MCH después de cada extracción con ácido acético.
- Se realizaron pruebas de capacidad de adsorción de la MCH con azul de metileno (AM) evaluado tanto con la isoterma de Freundlich como la de Langmuir.

Para la primera aproximación correspondiente a la extracción química de la MCH, se aplicó la extracción y separación de la membrana de su cáscara con el método recomendado por Mensah[84], en donde se utiliza ácido acético 0.5 M y se dejan los huevos en reposo por un tiempo de 44 horas. Las limitaciones de este método implican un elevado tiempo de reposo para lograr la desintegración completa de la cáscara; sin embargo, con tiempos de reposo menores a lo recomendado por Mensah, es posible la separación de la membrana de la cáscara con ayuda de métodos manuales[13].

De acuerdo con la literatura[84],[13] es posible utilizar el ácido acético como fuente para la extracción y separación de la membrana. No obstante, en ningún artículo o procedimiento consultado, se logra establecer cual concentración de ácido acético es la más adecuada, por ello se decidió evaluar el efecto de un intervalo de concentraciones que resulten fáciles de preparar y que el método sea práctico en términos de seguridad y tiempo.

En la siguiente tabla, se muestran las masas de cáscara de huevo utilizadas, así como la masa de MCH obtenida usando variadas concentraciones de ácido acético en intervalos de 0.5 a 1.5 molar.

Tabla 10. Masas y porcentaje de recuperación de la MCH obtenidas a partir de diversas concentraciones de ácido acético, en la primera determinación.

Repetición Nº1			
Concentración ácido acético mol L^{-1}	Masa cáscara de huevo / ±0.0001 g	Masa membrana seca/ ±0.0001 g	% Recuperación / ±0.002%
0,50	6.4661	0.1612	2.493
0,75	6.2822	0.1651	2.628
1,00	5.9928	0.1344	2.243
1,25	6.1343	0.1365	2.225
1,50	6.1348	0.1641	2.675

Fuente: elaboración propia, 2023.

Tabla 11. Masas y porcentaje de recuperación de la MCH obtenidas a partir de diversas concentraciones de ácido acético, en la segunda determinación.

Repetición Nº2			
Concentración ácido acético mol L^{-1}	Masa cáscara de huevo / ±0.0001 g	Masa membrana seca ±0.0001 g	% Recuperación / ±0.002%
0,50	5.5720	0.1672	3.001
0,75	6.2292	0.1685	2.705
1,00	6.1477	0.1841	2.995
1,25	5.5044	0.1682	3.056
1,50	6.4400	0.2300	3.571

Fuente: elaboración propia, 2023.

Tabla 12. Masas y porcentaje de recuperación de la MCH obtenidas a partir de diversas concentraciones de ácido acético, en la tercera determinación.

Repetición Nº3			
Concentración ácido acético mol L^{-1}	Masa cáscara de huevo / ±0.0001 g	Masa membrana seca ±0.0001 g	% Recuperación / ±0.002%
0,50	6.1497	0.2300	3.740
0,75	6.9415	0.1742	2.507
1,00	6,4569	0.2011	3.113
1,25	5.8499	0.1583	2.701
1,50	6.5939	0.1756	2.663

Fuente: elaboración propia, 2023.

Tal y como se puede observar en las tablas 10, 11 y 12, la concentración de ácido acético utilizado en el experimento no posee un efecto significativo en el porcentaje de recuperación de la MCH. Además, al analizar los coeficientes de variación (CV) calculados al obtener la desviación estándar de las tres muestras de porcentaje de recuperación obtenidos a la misma concentración y dividido por el promedio de estos tres datos, es posible indicar que se obtienen valores muy similares cercanos al 20%, exceptuando la concentración de ácido de 0.5 M que presenta el valor de coeficiente más bajo. Estos valores de CV se tabulan en la siguiente tabla 13.

Tabla 13. Coeficientes de variación (CV) para los porcentajes promedio de recuperación de MCH obtenidas a partir de diversas concentraciones de ácido acético.

Concentración ácido acético mol L^{-1}	Coeficiente de variación / %
0,50	20.4
0,75	3.80
1,00	17.0
1,25	15.7
1,50	17.5

Fuente: elaboración propia, 2023.

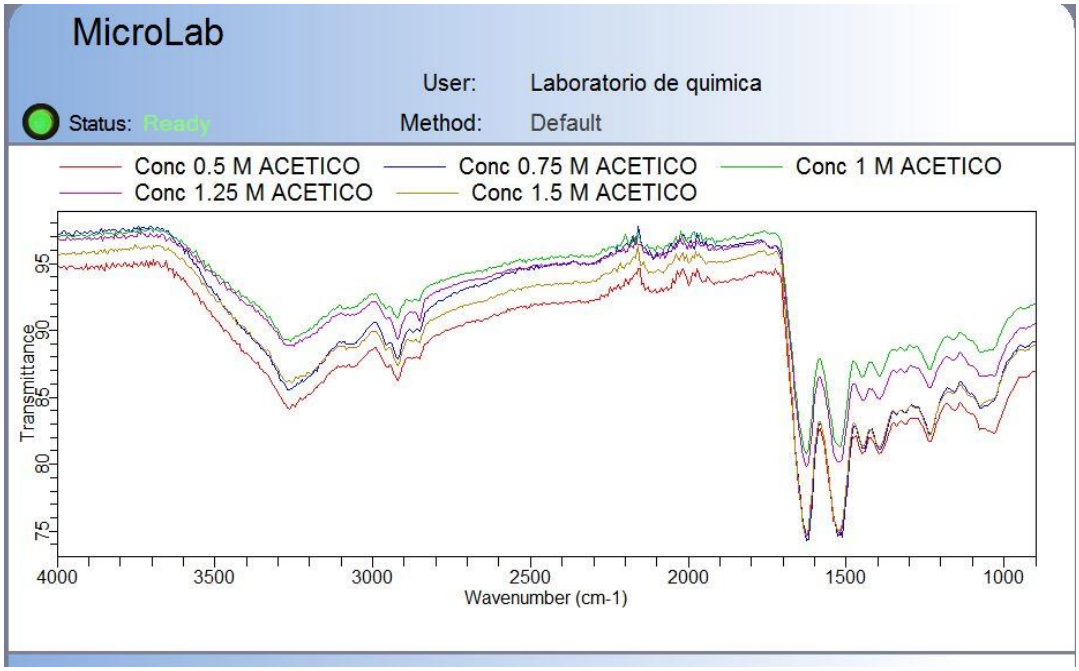
Continuando con el análisis antes descrito, es posible mencionar que estos resultados son esperables ya que la función del ácido es debilitar o, en dado caso, disolver, en gran medida, la capa mineral de carbonato de calcio[84] y no así modificar la composición de la membrana, pues no se observan cambios apreciables en las masas obtenidas. Otra observación importante es que a mayor concentración de ácido débil más rápido se disuelve la cáscara, lo cual es respaldado porque reaccionan más iones hidronio con el carbonato de calcio presente en la cáscara de huevo. La reacción entre el ácido acético y carbonato de calcio se muestra a continuación:

$$2CH_3COOH(aq) + CaCO_3(s) \rightarrow (CH_3COO)_2Ca(aq) + CO_2(g) + H_2O(l)$$

De acuerdo con la ecuación química mostrada anteriormente, cuando el ácido acético reacciona con carbonato de calcio, se da la formación de dióxido de carbono gaseoso. Durante el proceso y tratamiento de las cáscaras con el ácido acético, fue posible observar un burbujeo correspondiente a la liberación del dióxido de carbono y, además, visiblemente se observó un deterioro significativo de la cáscara de huevo en especial a concentraciones mayores a 1 M.

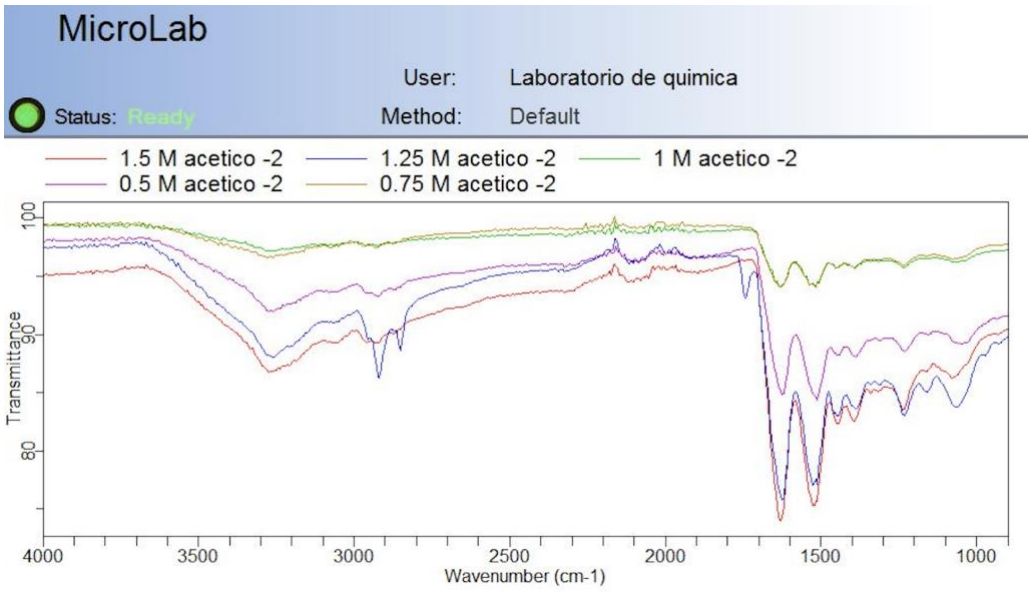
Otra de las pruebas realizadas para evaluar las condiciones óptimas de extracción de la MCH correspondió a el análisis por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier para cada membrana obtenida bajo el uso de cada concentración de ácido acético anterior. Para verificar el posible daño o afectación que el ácido acético puede tener sobre la composición de la membrana, se obtuvieron los espectros IR se muestran y analizarán a continuación:

Figura 25. Espectro IR de la MCH obtenido en la primera extracción mediante extracción con disoluciones de ácido acético a distintas concentraciones en un intervalo de 0.5 a 1.5 M.



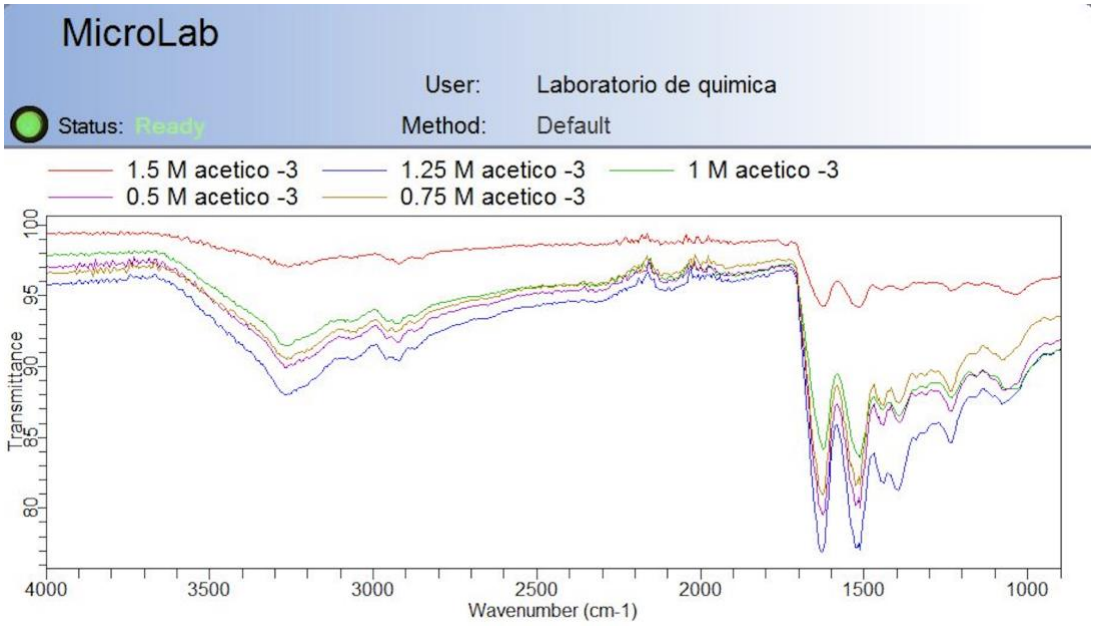
Fuente: elaboración propia obtenida a partir de los experimentos, 2023.

Figura 26. Espectro IR de la MCH obtenido en la primera extracción mediante extracción con disoluciones de ácido acético a distintas concentraciones en un intervalo de 0.5 a 1.5 M.



Fuente: elaboración propia obtenida a partir de los experimentos, 2023.

Figura 27. Espectro IR de la MCH obtenido en la primera extracción mediante extracción con disoluciones de ácido acético a distintas concentraciones en un intervalo de 0.5 a 1.5 M.



Fuente: elaboración propia obtenida a partir de los experimentos, 2023.

El ácido acético es el ácido que menores modificaciones causa sobre la MCH[13], dado que las sustancias ácidas son capaces de disolver componentes solubles de la membrana y de esta manera generar cambios estructurales en las mismas. En las figuras anteriores, todos los espectros infrarrojos obtenidos poseen las bandas características y esperadas de acuerdo con lo citado por Joshi, et al[83]., en donde se puede observar la banda de amida I por arriba de 1600 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones del grupo funcional carbonilo (enlace C=O) de la amida, la banda de amida II por arriba de 1500 cm^{-1} que corresponde a la vibración del enlace C-N del grupo funcional amida y la banda del enlace correspondiente a C=C cercana a los 1500 cm^{-1}.

Estos espectros infrarrojos ofrecen información acerca de la integridad de la membrana después de su respectiva extracción. Más relevante aún es que no se observan modificaciones significativas en las bandas anteriormente descritas cuando se modifica la concentración de ácido acético. La concentración del ácido acético posee un efecto mínimo en la integridad de la membrana y en el porcentaje de recuperación, de manera que la concentración de ácido por usar solo tendrá un efecto en la velocidad de desintegración de la membrana mineral de la cáscara; por lo que cualquier concentración resulta útil para extraer la MCH.

Otro de los experimentos realizados para lograr la correcta extracción y evaluación de la MCH correspondió a la prueba de adsorción de membrana mediante el uso de azul de metileno, un indicador ácido-base de gran utilidad en laboratorios de química. Se ha demostrado, experimentalmente, la capacidad de la MCH de adsorber pigmentos y otras sustancias, debido a la presencia de grupos funcionales como hidroxilo, amino y carboxilo en su superficie los cuales, mediante fuerzas intermoleculares, permiten atrapar otras sustancias químicas[97].

El experimento de adsorción de azul de metileno demostró las cualidades de adsorción de la membrana y para ello se realizó una evaluación en el cambio de concentración del azul de metileno (AM) antes y después de su exposición a una masa fija de 0.100 g de MCH. En el siguiente cuadro, se resume la información de la concentración inicial y en equilibrio del azul de metileno, así como la cantidad en equilibrio.

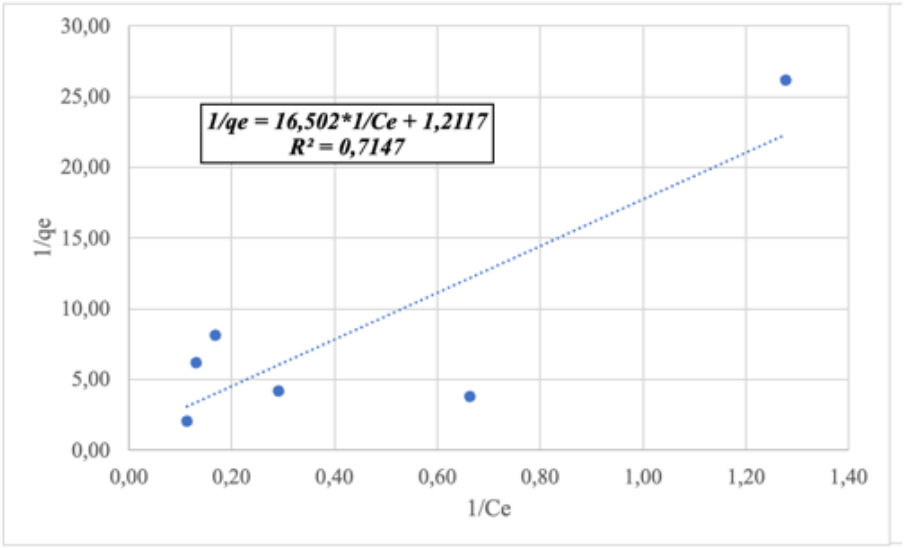
Tabla 14. Datos de concentración inicial y en equilibrio en conjunto con la cantidad de AM en equilibrio

Concentración inicial (Co) de AM mg mL^{-1}	Concentración en equilibrio (Ce) de AM mg mL^{-1}	Cantidad de AM en mg en equilibrio (Qe)
0.865	0.784	0.0382
2.078	1.512	0.2589
3.939	3.454	0.2380
6.205	5.962	0.1226
8.066	7.742	0.1602
9.846	7.581	1.0998

Fuente: elaboración propia a partir de la obtención de los datos experimentales, 2023.

Al graficar el recíproco de la concentración de AM en equilibrio (C_e^{-1}) contra el recíproco de la cantidad de AM en equilibrio (Q_e^{-1}), se obtiene la gráfica 1.

Gráfica 1. Isotermas de Langmuir obtenidas para la adsorción de AM con la MCH



Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

El gráfico 1 representa la isoterma de Langmuir, ésta explica el tipo de relación de adsorción entre el analito y la membrana, en este caso, sí existiera una adsorción de monocapa. La isoterma de Langmuir se puede explicar mediante las ecuaciones Nº9 y Nº10 presentadas a continuación:

$$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{(1 + K_L C_e)} \quad \text{ecuación } Nº9$$

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{q_m K_L C_e} \qquad \text{ecuación } Nº10$$

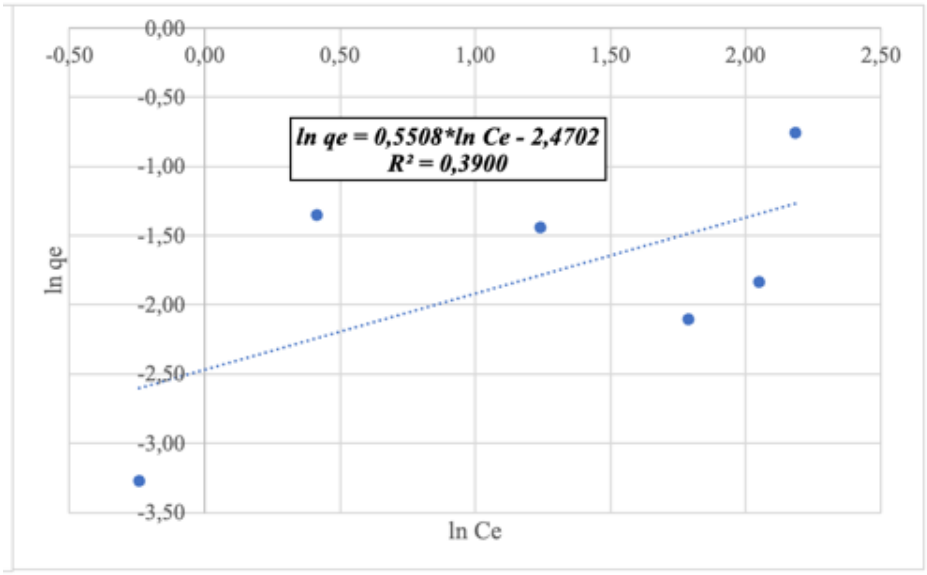
La ecuación Nº10 es la forma linealizada de la isoterma de Langmuir, en donde es necesario obtener los datos de concentración de AM en equilibrio, concentración que corresponde a la cantidad remanente en disolución de AM, mientras que la cantidad en equilibrio se obtuvo al calcular la cantidad de AM adsorbido por la membrana. Con el dato de la pendiente de la curva se puede obtener el valor de K_L (constante de Langmuir en L mg^{-1}), pero antes es necesario obtener el valor de q_m (capacidad de adsorción) del intercepto de la curva.

Por otra parte, al graficar ln C_e contra ln q_e , se obtiene la gráfica 2, la cual representa la isoterma de Freundlich la cual explica que la adsorción entre el analito y membrana es de multicapas[87]. Esta gráfica se obtiene al utilizar la ecuación linealizada de Freundlich que corresponde a la ecuación Nº11

$$ln\ q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \qquad \text{ecuación } Nº11$$

En la ecuación de Freundlich el valor de Ce corresponde a la concentración de AM en equilibrio (concentración remante en solución), y el valor de q_e a la relación de mg adsorbidos de AM sobre gramos de MCH utilizados. El valor de la pendiente corresponde a 1/n que al obtenerse el reciproco de este dato se puede analizar el valor de n y con ello definir el fenómeno de transporte que ocurre entre el adsorbato y adsorbente. En el caso del intercepto de la curva se puede utilizar para determinar el valor de K_F (constante de Freundlich).

Gráfica 2. Isotermas de Freundlich obtenidas para la adsorción de AM con la MCH



Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023

Al analizar las gráficas 1 y 2, es posible deducir que la adsorción del pigmento AM no posee un buen ajuste a las isotermas consideradas, pero que de seleccionarse una de ellas correspondería a la isoterma de Langmuir debido a que el coeficiente de correlación de esta isoterma presentó mayor valor que la de Freundlich. Sin embargo, la poca linealidad presentada en la isoterma de Langmuir se puede deber a que la MCH es una membrana de origen biológico, sujeta a variaciones; además, en los estudios realizados anteriormente por otros autores, se suele utilizar la membrana en forma de polvo granulado para mejorar las características de adsorción, pues al disminuir el tamaño de la partícula aumenta el área superficial y, por ende, las interacciones de fuerzas intermoleculares entre el analito y la membrana. Se puede indicar la posibilidad de que exista una saturación rápida de la membrana dada la baja correlación obtenida entre cantidad adsorbida y la concentración en equilibrio.

Por otra parte, en la figura 1, es posible observar que en valores de $1/C_e$ de 0.1 a 0.3 aproximadamente existe un mejor ajuste lineal, es decir a valores de concentración más estrechos. Este fenómeno se debe a que, a concentraciones más altas, la membrana de cáscara de huevo se encontrará saturada con el adsorbato.

Con la isoterma de Langmuir se puede obtener la cantidad máxima que la membrana es capaz de adsorber de analito al analizar lo valores de la pendiente de la gráfica linealizada. Se reportan valores de 0.24 mg de AM adsorbido por cada gramo de MCH[85], este valor no es muy cercano al obtenido experimentalmente de 0.8 mg g^{-1}; sin embargo, es necesario aclarar que el azul de metileno se utilizó únicamente para demostrar la capacidad de adsorción de la membrana y no así determinar la cantidad de este analito en específico que la MCH pueda adsorber.

Considerando las capacidades adsorbentes de la membrana, es de esperar que, durante los estudios IVRT realizados con los productos tópicos, exista una interacción física entre la membrana y los componentes de la fórmula, incluido el principio activo. De acuerdo con Klein[52], la membrana no debería ser un factor limitante en los estudios de liberación ni tampoco en la cuantificación del analito. Para demostrar la posible interacción entre el diclofenaco y la MCH se aplicó el mismo procedimiento en donde se expuso la membrana ante concentraciones variadas del principio activo.

En la siguiente tabla (tabla 15), se detallan las concentraciones iniciales utilizadas de diclofenaco, así como las concentraciones en equilibrio y cantidad de fármaco en equilibrio, datos necesarios para poder llevar a cabo los análisis de las isotermas de Langmuir y Freundlich similares a los realizados entre la MCH con AM.

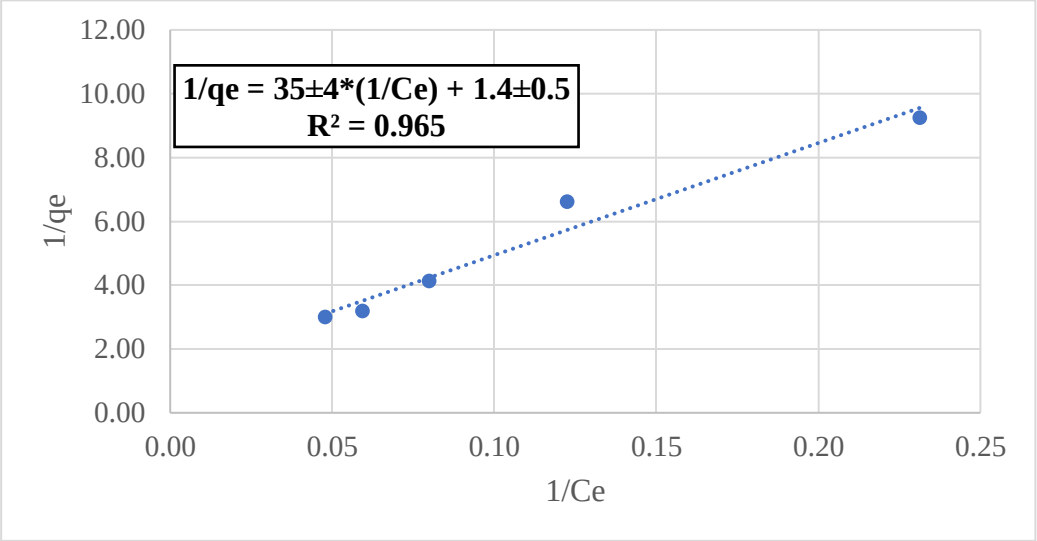
Tabla 15. Datos de concentración inicial y en equilibrio en conjunto con la cantidad de diclofenaco dietilamonio en equilibrio

Concentración inicial (Co) de diclofenaco mg L^{-1}	**Concentración en equilibrio (Ce) de diclofenaco mg mL^{-1}**	**Cantidad de diclofenaco dietilamonio en mg en equilibrio (Qe)**
3,7	3,3	0,093
7,0	6,5	0,131
10,8	9,9	0,209

14,5	13,4	0,271
18,0	16,8	0,288
3,7	3,3	0,093

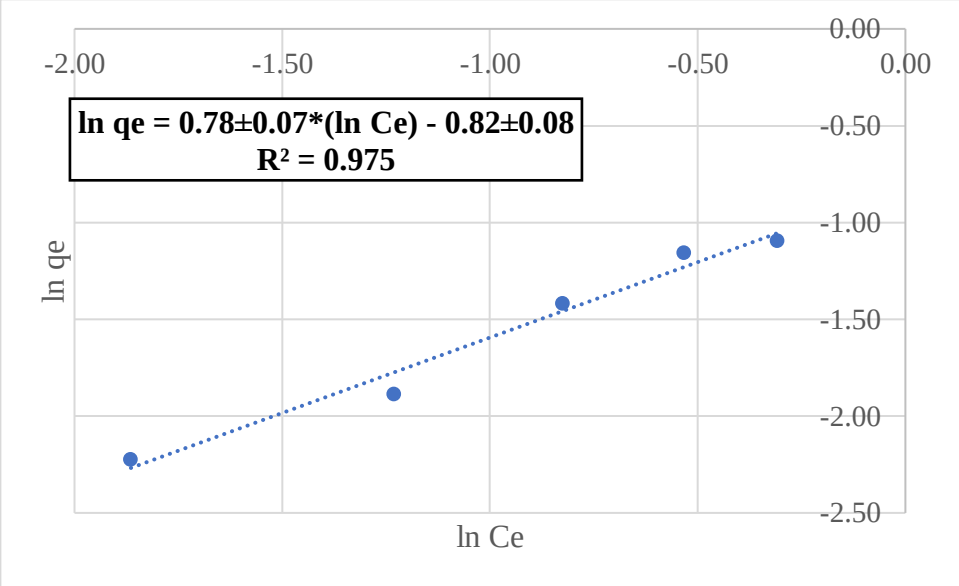
Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023

Gráfica 3. Isotermas de Langmuir obtenida para la adsorción de diclofenaco sódico con la MCH



Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023

Gráfica 4. Isotermas de Freundlich obtenida para la adsorción de diclofenaco sódico



Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023

De las gráficas anteriores (gráfica 3 y 4) no es posible deducir por completo si la adsorción entre la MCH y el diclofenaco sódico sigue una isoterma de adsorción de Langmuir o Freundlich pues no existe una diferencia significativa entre los coeficientes de correlación obtenidos en ambas isotermas.

Por otra parte, con el intercepto de la isoterma de Langmuir y considerando que se obtuvo una buena linealidad, es posible identificar la cantidad máxima de analito que se puede adsorber al utilizarse el dato del intercepto en el gráfico 3 y calculando el reciproco de 1.4 en este caso se obtiene 0.7 mg de diclofenaco por gramo de MCH (q_m cantidad máxima adsorbida). Este dato es de importancia porque indicaría cuanta cantidad de analito está siendo adsorbido por cada gramo de membrana, entonces, el diclofenaco podrá atravesar la MCH durante los estudios de liberación y no quedar atrapado en la misma en su totalidad.

Con los datos de la regresión de la isoterma de Freundlich se puede usar la pendiente cuyo valor es 0.78 (1/n), de manera que al obtener el reciproco de la pendiente se puede calcular el valor de n el cual corresponde a 1.3. Considerando que, cuando n>1 se puede indicar que la adsorción es de tipo física[88] y no química. Este parámetro es de relevancia porque, como se mencionó con anterioridad, la membrana no debería ser un parámetro que limite la liberación del fármaco, y al existir interacción física entre la membrana y el analito, este último se podría difundir a través de la membrana, ya que como se mencionó en el párrafo anterior el diclofenaco no quedará "atrapado" por completo en la MCH y así podrá moverse a través de la membrana.

4.2 Optimización de los parámetros experimentales de los estudios de liberación in vitro.

Para poder responder al objetivo número dos de la investigación, fue necesario considerar aquellas variables analíticas que se cree tienen un efecto en la obtención de los perfiles de liberación in vitro de diclofenaco. Entre esas variables están las siguientes: la saturación de la MCH en el buffer de pH 7.0, la temperatura de análisis del experimento y la cantidad de muestra en la cámara donadora. Además, es necesario considerar el método de cuantificación del analito, en este caso, el diclofenaco dietilamonio. De esta manera se y bajo las premisas antes descritas se desarrollaron los siguientes experimentos:

- Se evaluaron diversas pruebas que incluyeron la cantidad de muestra a utilizar en la cámara donante ya sea en su aplicación directa o una dilución.
- Se evaluó la linealidad del sistema analítico en términos de los límites de detección y cuantificación.

- Se estudió el efecto de dejar en reposo la MCH sobre el buffer de fosfato de pH 7.0.
- Se determinó los tiempos de muestreo del estudio IVRT que representaran de mejor manera la cinética de Higuchi.

Las pruebas anteriores fueron elaboradas tomando en cuenta que el producto referencia es el Voltaren y todo ajuste o resultado obtenido fue en base a este producto. El primer reto encontrado en la optimización del procedimiento resultó la toma de muestra desde la cámara receptora de la celda de difusión de Franz. La cámara receptora posee un volumen de 5 mL, y considerando la necesidad de la toma de muestras cada cierto intervalo de tiempo para la cuantificación, se debía buscar la manera más adecuada de la toma de muestra o la alícuota respectiva.

Para la prueba 1 se utilizó siempre analito para la optimización muestras provenientes del producto referencia (Voltaren). Se prepararon 4 celdas de Franz, cada una con aproximadamente 0.200 g de producto aplicado únicamente en el área donde entra en contacto la membrana y el medio receptor, cada una de las celdas representaba un tiempo de muestreo, es correspondientes a 15 minutos, 30, 45 y 60 minutos. No obstante, las absorbancias obtenidas durante la prueba no presentaban un aumento gradual como se esperaba, sino que más bien presentaban una elevada dispersión, por lo que se consideró que estas condiciones no fueron las adecuadas para el muestreo.

En la segunda aproximación, en lugar de utilizar una masa de peso conocido en la cámara donante, se preparó una solución muestra de concentración conocida (0.100 g de producto en 25 mL de buffer pH 7.0). A partir de esta muestra, se toma una alícuota de 0.5 mL transferida a la cámara donante. Similar a la prueba 1, se prepararon 4 celdas de difusión de Franz, cada una representado un tiempo de muestreo correspondientes a 15, 30, 45 y 60 minutos. Sin embargo, los resultados obtenidos en este ensayo tampoco fueron los esperados debido a una falta de significancia analítica y lejanía a la tendencia esperada.

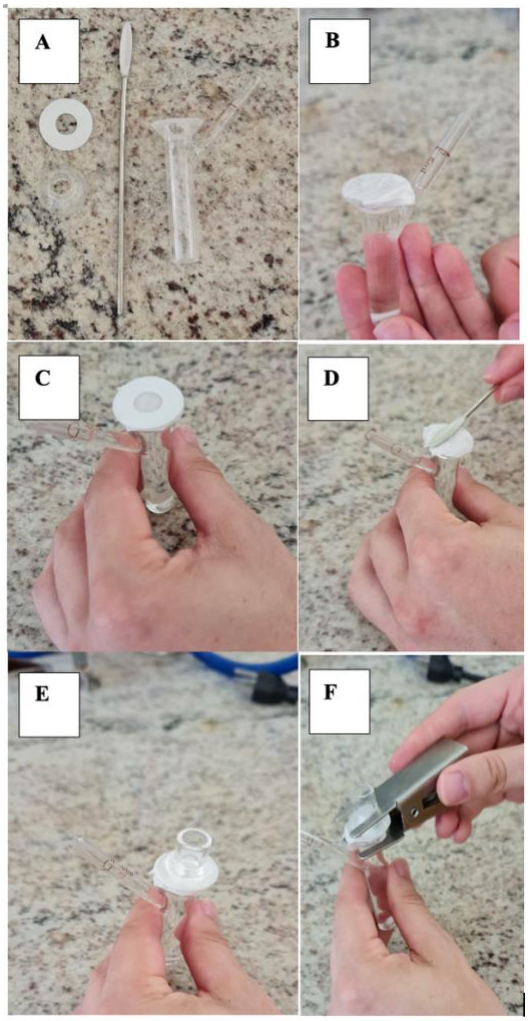
En la prueba 3, se realiza el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior, pero utilizando una alícuota de 1 mL en la cámara donante. Para esta prueba se llenó por completo la cámara donante en su totalidad con la solución de producto antes descrita. El objetivo era

lograr una saturación completa de la membrana y también de la cámara. La cámara donante, al estar completamente llena de producto, permitía tomar alícuotas cada cierto tiempo desde la cámara receptora y así también reemplazar el volumen tomado al inclinarse levemente la celda y proceder de nuevo a su llenado, sin embargo, similar a los resultados anteriores no hubo reproducibilidad analítica y se descarta la prueba.

En la prueba 4 se utilizó en esta ocasión el producto referencia Voltaren sin diluir y se llenó la cámara donante en su totalidad con producto. Esto permitió usar una celda de Franz como una muestra individual y de esta se tomaron alícuotas de esta celda a los 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 minutos en donde se lograron obtener valores de absorbancias del analito las cuales iban aumentado con respecto al tiempo hasta llegar un punto donde gradualmente empezaban a disminuir. Sin embargo, la prueba no es válida del todo porque durante los estudios de IVRT se pretende simular el uso del producto a nivel tópico, y es necesario considerar que es recomendable colocar una pequeña cantidad del producto y distribuirlo por la piel, a pesar de esto, la prueba arrojó una condicionante válida para el experimento: aplicar una pequeña cantidad de producto sobre la membrana.

La cantidad de muestra para aplicar sobre la membrana no debe ser mayor a 300 mg, ya que esta cantidad es suficiente para cubrir por completo el área de la membrana, dicha aplicación se considera de muestra infinita[53]. La forma en que la muestra se aplica sobre la membrana posee un efecto directo en la variabilidad del experimento. Para aquellos experimentos donde la cámara donadora y receptora están separadas por el anillo de teflón se recomienda colocar el producto por toda la membrana y distribuirlo con ayuda de una espátula, luego se coloca el anillo de teflón y el disco de soporte para ocluir la muestra y delimitar el área de contacto entre el producto y la membrana[53,98]. En la siguiente figura, se muestra un esquema del ensamblaje propuesto para la celda de difusión de Franz con la aplicación del producto que se realizaría para la obtención de los perfiles de liberación in vitro.

Figura 28. Ensamblaje de la cámara de difusión de Franz: A) equipo necesario, B) colocación de la membrana, C) anillo de teflón, D) aplicación de la muestra, E) cámara donante y F) prensa de bloqueo de cámaras

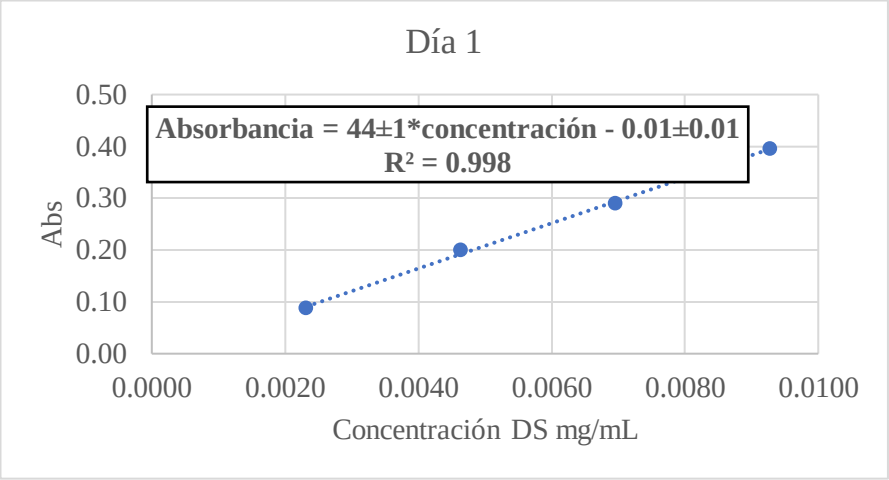


Fuente: elaboración propia, 2023.

Continuando con el análisis de la prueba realizadas en la presente investigación, la cuantificación del analito se consideró para optimizar los estudios IVRT. En las siguientes gráficas 5 y 6, se muestra dos curvas de calibración preparadas en dos días diferentes, también, los valores obtenidos de los límites de cuantificación y detección a una longitud de onda de 275 nm. Este valor de longitud de onda se obtuvo al realizar un barrido del estándar de

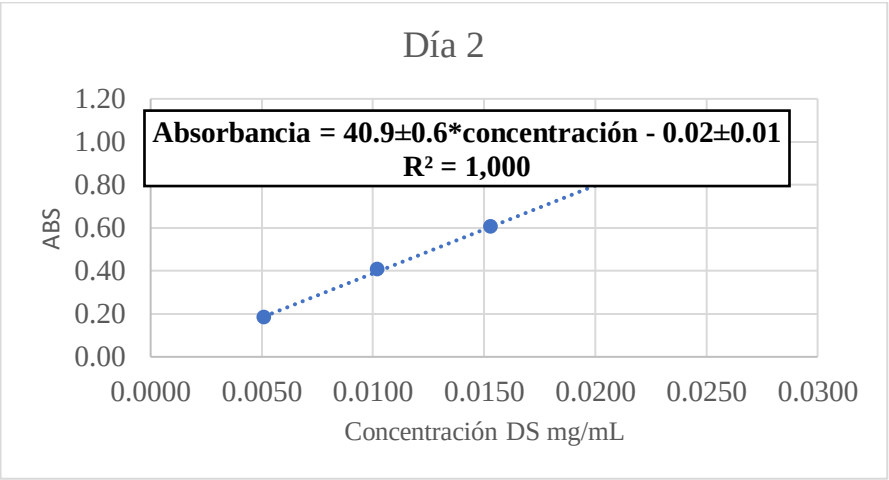
diclofenaco de 220 a 900 nm. Además, las concentraciones evaluadas de diclofenaco en un rango de 0.002 a 0.025 mg mL^{-1} demuestran una linealidad con valores de coeficientes de correlación mayores a 0.98 esto implica que la absorbancia de diclofenaco sodio es directamente proporcional a su concentración. Se puede observar que la concentración determinada como límite de cuantificación correspondiente a 10 veces la desviación estándar de los valores "y" es de aproximadamente 0.002 mg mL^{-1}.

Gráfica 5. Curvas de calibración de diclofenaco sódico (DS) obtenidas a 275 nm en el día 1.



Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Gráfica 6. Curvas de calibración de diclofenaco sódico (DS) obtenidas a 275 nm en el día 2.



Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Las curvas de calibración mostradas en la gráficas 5 y 6 anteriores denotan varios aspectos: el método escogido para la cuantificación del analito posee una adecuada linealidad demostrada por los límites de detección y cuantificación obtenidos (ver tabla). Estas curvas denotan la sensibilidad del espectrofotómetro ultravioleta en términos de detección y cuantificación.

Tabla 16. Datos de concentración inicial y en equilibrio en conjunto con la cantidad de diclofenaco dietilamonio en equilibrio

Día de análisis	**Límite de cuantificación en mg mL^{-1}**	**Límite de detección en mg mL^{-1}**
Día 1	0.0013	0.00043
Día 2	0.0017	0.00060

Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

La tercera determinación realizada para lograr la optimización de los parámetros de los estudios IVRT corresponde a la evaluación del efecto del remojo o reposo de la MCH en el buffer. Las membranas, previamente extraídas con la metodología descrita en el capítulo III, se expusieron a dos tiempos de remojo en el buffer de pH 7.0, a saber 15 y 30 minutos debido a que la membrana necesita estar humectada con el medio de la cámara receptora. El volumen de buffer pH 7.0 fue de aproximadamente 20 mL suficiente para mantener la membrana en el líquido.

Con el objetivo de evitar la posible variabilidad de los productos tópicos, a la cámara donadora se le agregó un volumen de 1.0 mL de una solución estándar, solución previamente preparada de diclofenaco sódico con una concentración aproximada de 0.02 mg mL^{-1}. Las absorbancias de solución de diclofenaco que logró atravesar la membrana a los 15 y 30 minutos de iniciado el análisis fue obtenidas para cada tiempo en remojo que se muestran a continuación.

Tabla 17. Valores de absorbancia de diclofenaco sódico que logró atravesar la MCH obtenido durante la prueba de remojo de membrana a los 15 y 30 minutos de muestreo

Tiempo en remojo en buffer 7.0	**Absorbancia a 275 nm (4 muestras)**			
15 min	0.088	0.061	0.037	0.057
30 min	0.054	0.060	0.051	0.050

Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Con los datos obtenidos de la tabla 17, se puede observar la reproducibilidad de los datos de absorbancia al tiempo de muestreo de 15 minutos cuando la membrana es expuesta en remojo por 15 y por 30 minutos. Con un tiempo de remojo de 15 minutos, la desviación estándar de las muestras de diclofenaco sódico es de 0.02, mientras que cuando se deja en reposo por 15 minutos más, la desviación estándar es de 0.008. La humectación de la membrana es importante pues, aunque la membrana no debería ser un factor limitante en la liberación del principio activo, esta podría o no interaccionar con el analito. Según los datos de la tabla, un tiempo cercano a 30 minutos es suficiente para que la membrana esté "adecuada" al medio escogido de buffer pH 7.0.

Para definir la duración total del estudio de liberación, se desarrollaron tres experimentos con tiempos finales distintos utilizando la muestra de referencia. El primer experimento (prueba 1), correspondiente a 90 minutos con intervalos de muestreo de cada 15 minutos, el segundo, hasta 240 minutos (prueba 2) con intervalos de muestreo de cada 30 minutos y el tercero, hasta 5 horas (prueba 3) con intervalos de muestreo de cada 60 minutos. Aunque es recomendable para los estudios IVRT llevar el análisis hasta un mínimo de 3 horas[53], la determinación de la duración de los estudios de liberación se tiene que realizar de manera experimental.

Los datos de absorbancia de diclofenaco sódico obtenidos fueron convertidos en concentración usando la curva de calibración y mediante la ecuación Nº9 descrita en el capítulo II, se determinaron las cantidades de principio activo acumulado en el tiempo en µg m^{-2} (Q_n), una vez identificados estos datos, se grafica la raíz cuadrada del tiempo contra Q_n

la cual representa la linealización de la cinética de Higuchi. Se escogió este tipo de cinética al considerar lo propuesto por Rath y Kanfer[73] para definir cuál fue la velocidad de liberación del fármaco y el porcentaje de liberación, éste se calculó según la cantidad de fármaco acumulado liberado hasta último tiempo de muestreo divido entre la cantidad de principio activo aplicado (aproximadamente 1000 µg)

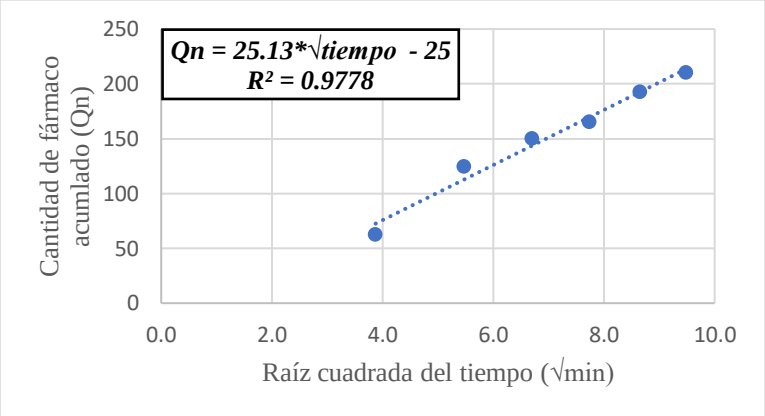
En la siguiente tabla (tabla 18), se muestran los valores de Q_n promedio obtenidos en los distintos tiempos de muestreos, gracias a ellos se diseñan las gráficas 7, 8 y 9 presentadas a continuación, donde se muestra la cantidad de fármaco liberado acumulado contra la raíz cuadrada del tiempo, correspondiente a la cinética de Higuchi.

Tabla 18. Valores de Qn y raíz cuadrada del tiempo, necesario para obtener las cinéticas de Higuchi

Prueba 1 90 min		Prueba 2 240 min		Prueba 3 300 min	
√Tiempo / $min^{½}$	Q_n promedio / µg m^{-2}	√Tiempo / $min^{½}$	Q_n promedio / µg m^{-2}	√Tiempo / $min^{½}$	Q_n promedio / µg m^{-2}
3,9	62	5,5	52	7,7	72
5,5	125	7,7	154	11,0	192
6,7	150	9,5	184	13,4	276
7,7	166	11,0	210	15,5	350
8,7	193	12,2	262	17,3	362
9,5	210	13,4	307	19,0	346

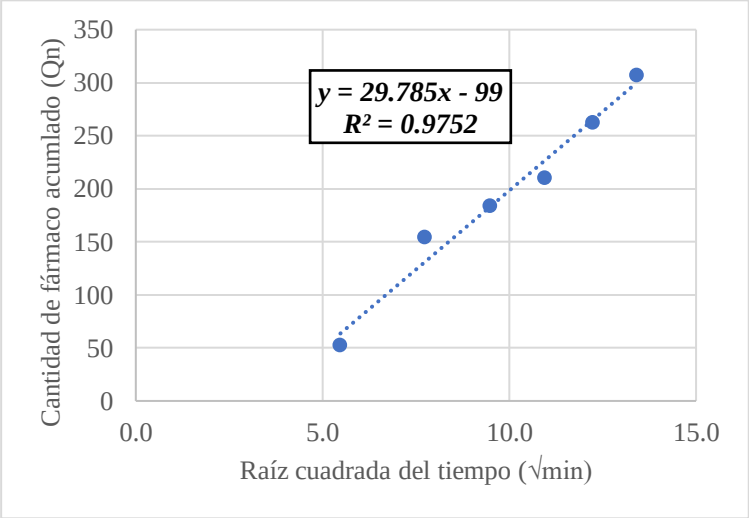
Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Gráfica 7. Cinética de Higuchi del Voltaren® obtenida hasta los 90 minutos de muestreo.



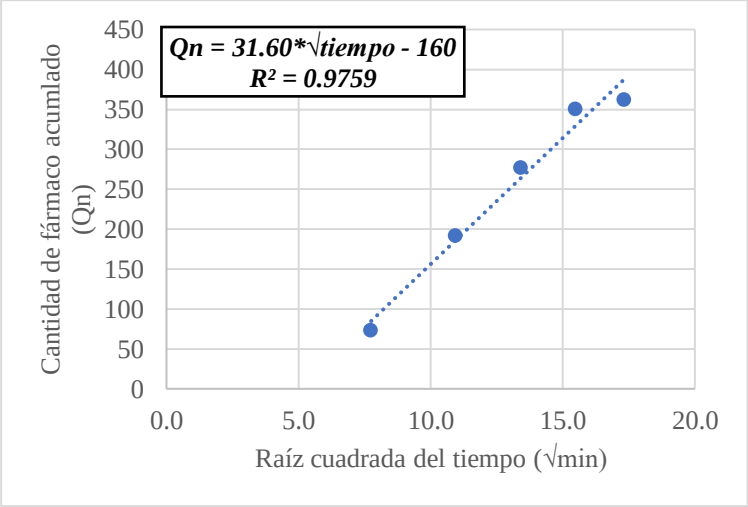
Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Gráfica 8. Cinética de Higuchi del Voltaren® obtenida hasta los 240 minutos de muestreo.



Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Gráfica 9. Cinética de Higuchi del Voltaren® obtenida hasta los 300 minutos de muestreo.



Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

De acuerdo con los gráficos 7, 8 y 9, la mejor linealidad se obtuvo cuando se completaron los tiempos de muestreo del análisis hasta los 90 min o el equivalente a 1 h 30 min, ya que el valor del coeficiente de determinación hasta este tiempo fue de 0.9778, mientras que si se detiene el análisis hasta las tres horas de empezado el R^2 posee un valor

ligeramente menor de 0.9752, y después de 6 horas el valor de R^2 es de 0.9759; es decir, que el valor de coeficiente de determinación no es un valor contundente para saber hasta qué tiempo se puede detener el análisis.

No obstante, la pendiente representa la velocidad de liberación del fármaco en µg cm^{-2} $min^{-1/2}$ y, como se puede evidenciar en los tres casos, los valores están muy cercanos entre sí. En la siguiente tabla (tabla 19), se resumen estos datos y se presenta el valor aproximado de fármaco liberado, éste se identificó al dividir la cantidad máxima liberada en el último tiempo de muestreo divido entre la cantidad aproximada usada que fue de 0.100 g de producto.

Tabla 19. Datos de velocidad de liberación, valor de R^2 y % recuperación obtenida para el Voltaren® a tres tiempos finales diferentes

Tiempo / min	Velocidad de liberación / µg cm^{-2} $min^{-1/2}$	Valor de R^2	% Recuperación
90	25.13	0.9778	21%
240	29.80	0.9752	31%
300	31.60	0.9759	35%

Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

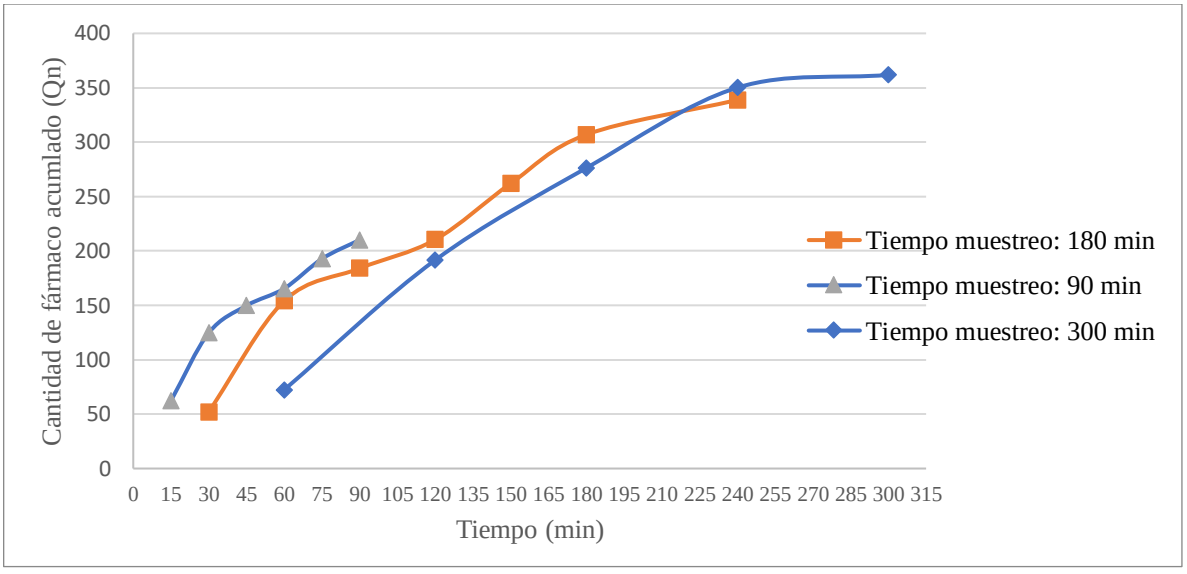
En la tabla 19, es posible observar cómo al aumentar el tiempo de muestreo total se obtiene un porcentaje de recuperación ligeramente mayor. De acuerdo con Klein, este porcentaje no debería ser mayor a un 30% para asegurar la permanencia de una dosis infinita en la cámara donante[53]. No obstante, no se menciona un valor mínimo por recuperar. Es de esperar que, para los tiempos de muestreo superiores a tres horas, los valores del porcentaje de recuperación sean mayores que los obtenidos a los 90 minutos, pero, como se puede observar en la tabla 19, no se obtuvo un aumento considerable los porcentajes de recuperación cuando se extiende el análisis hasta 300 minutos.

Con los datos de la tabla 19, se puede señalar que es recomendable terminar los estudios de muestreo antes de las 4 horas, pero no antes de 3 horas para obtener un valor

adecuado de liberación de diclofenaco, es decir no superior al 30% recomendado. Durante el experimento, se identificó la necesidad de incluir un muestro antes a los 30 minutos y mayor a los 10 minutos para observar, de manera más clara, la variación de la cantidad acumulada de diclofenaco con respecto al tiempo considerado y es de esperar que en los primeros tiempos de muestreo exista mucha variabilidad debido a la baja concentración liberada del fármaco.

En la siguiente gráfica 10, se muestra cómo la liberación del fármaco está presente desde los 15 minutos ya que se obtiene 62 µg m^{-2} de diclofenaco, sin embargo, a los 240 minutos se observa que no se ha logrado obtener una meseta en términos de la cantidad de fármaco liberado. Este comportamiento tiene ciertas implicaciones: un análisis de IVRT se pueden extender hasta 6 horas inclusive; sin embargo, en casos prácticos esto representa una magnitud de tiempo elevada y en casos de querer aplicar la metodología propuesta en la presente investigación, por ejemplo, en laboratorios de docencia, un tiempo tan elevado no resulta tan práctico.

Gráfica 10. Curva de liberación de diclofenaco en Voltaren® realizado en 90 y 240 minutos respectivamente



Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

4.3 Determinación de las posibles diferencias en el comportamiento de liberación del fármaco en las distintas formulaciones de diclofenaco gel, mediante el análisis de las curvas de concentración de fármaco liberado en función del tiempo de las formulaciones analizadas.

En el siguiente apartado, se realizará el análisis respectivo de los perfiles de liberación in vitro obtenidos para el producto referencia y los productos genéricos. Para los cuatro productos con diclofenaco dietilamonio como principio activo se utilizaron las celdas de difusión de Franz con un volumen de 5 cm^3 y un área de orificio de 0.64 cm^2. Tal y como se expuso en el apartado 4.2, existieron dificultades en la optimización de la metodología, principalmente, en la toma de muestras, de tal manera que, para la realización de los perfiles de liberación se siguieron los resultados obtenidos anteriormente descritos.

Los perfiles de liberación in vitro de los cuatro productos tópicos se llevaron a cabo bajo los siguientes supuestos y optimizaciones:

- El tiempo total de cada estudio se estableció hasta las tres horas y media, tiempo adecuado para obtener menos del 30% de recuperación del fármaco y una correcta linealidad en la cinética de Higuchi.
- Se realizaron en total 8 tiempos de muestreos iniciando a los 15 minutos y luego a los 30 minutos con muestreos cada 30 minutos hasta los 210 minutos.
- Se montaron cuatro celdas de difusión de Franz simultáneamente para conseguir datos más reproducibles al promediarse los datos obtenidos para cada celda.
- El volumen de la alícuota tomada para cada tiempo de muestreo fue de aproximadamente 2.5 mL. Este volumen se considera aproximado y constante por lo que el error obtenido del mismo se considerará como el mismo para todas las muestras.
- Cada muestra fue analizada mediante espectroscopia UV-vis usando el equipo marca Vernier. Las muestras fueron leídas a 275 nanómetros como longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del diclofenaco sódico. Los datos de absorbancia fueron corregidos utilizando el factor gravimétrico necesario para convertir el diclofenaco sódico en dietilamonio.
- Cada absorbancia mediante el uso de una curva de calibración fue convertida en concentración en µg cm^{-3} y con la ayuda de la ecuación Nº7 se convirtió en cantidad de fármaco liberado por unidad de área.

$$Q_n = C_n \frac{V_c}{A_c} + \frac{V_s}{A_c} \sum_{i=1}^{n} C_{i-1} \qquad \text{ecuación } N^o 7$$

La ecuación Nº7 refleja la relación entre la cantidad de fármaco liberado µg por unidad de área del orificio de la celda de Franz. De acuerdo con las especificaciones de la celda, el área del orificio corresponde a 0.64 cm^2. C_n, es la cantidad de fármaco en el tiempo t, V_c es el volumen de la celda que en este caso corresponde a 5 cm^3, Ac el área del orificio de la celda que sería[99] 0.64 cm^2, V_s el volumen de la muestra tomado de la celda de Franz asumiendo para cada una un valor de 2.5 mL, y el término de sumatoria aplica a partir de la muestra número dos y es la suma de las concentraciones acumuladas en tiempo t.

Como se mencionó con anterioridad, aunque la cantidad de fármaco depende del volumen tomado durante el análisis, también dependerá de otros aspectos como el área del orificio y, en cierta medida, de la cantidad de muestra aplicada sobre la membrana. No obstante, es necesario indicar que la cantidad de muestra aplicada se debe asumir como constante para todas las muestras, dado que se considera la formación de una película infinita sobre la membrana.

Para la correcta evaluación de los perfiles de liberación y la comparativa entre los productos probados, diversos autores recomiendan llevar a cabo estudios cinéticos que se describieron en el capítulo II. En la evaluación y posible comparación de los perfiles de liberación in vitro, es necesario evaluar diversas cinéticas o modelos matemáticos que permitirán describir, de mejor manera, la liberación del fármaco a través de la membrana. Las cinéticas evaluadas en la investigación fueron a saber: cinética de orden cero tabulando la cantidad de fármaco liberado acumulado contra el tiempo, cinética de orden uno tabulando el logaritmo natural de la cantidad remanente de fármaco contra el tiempo, cinética de Higuchi tabulando la cantidad en microgramos de muestra liberado por unidad de área contra la raíz cuadra del tiempo y cinética de Korsmeyer-Peppas tabulando el logaritmo en base 10 de la fracción de fármaco liberado contra el logaritmo del tiempo.

Para la evaluación de la primera cinética estudiada, cinética de orden cero, se necesita graficar los valores de Q acumulados obtenidos y calculados con anterioridad con su

variación en el tiempo. En el siguiente cuadro, se muestran los valores de Q y tiempo para los cuatro productos en estudio necesarios para la obtención de las gráficas.

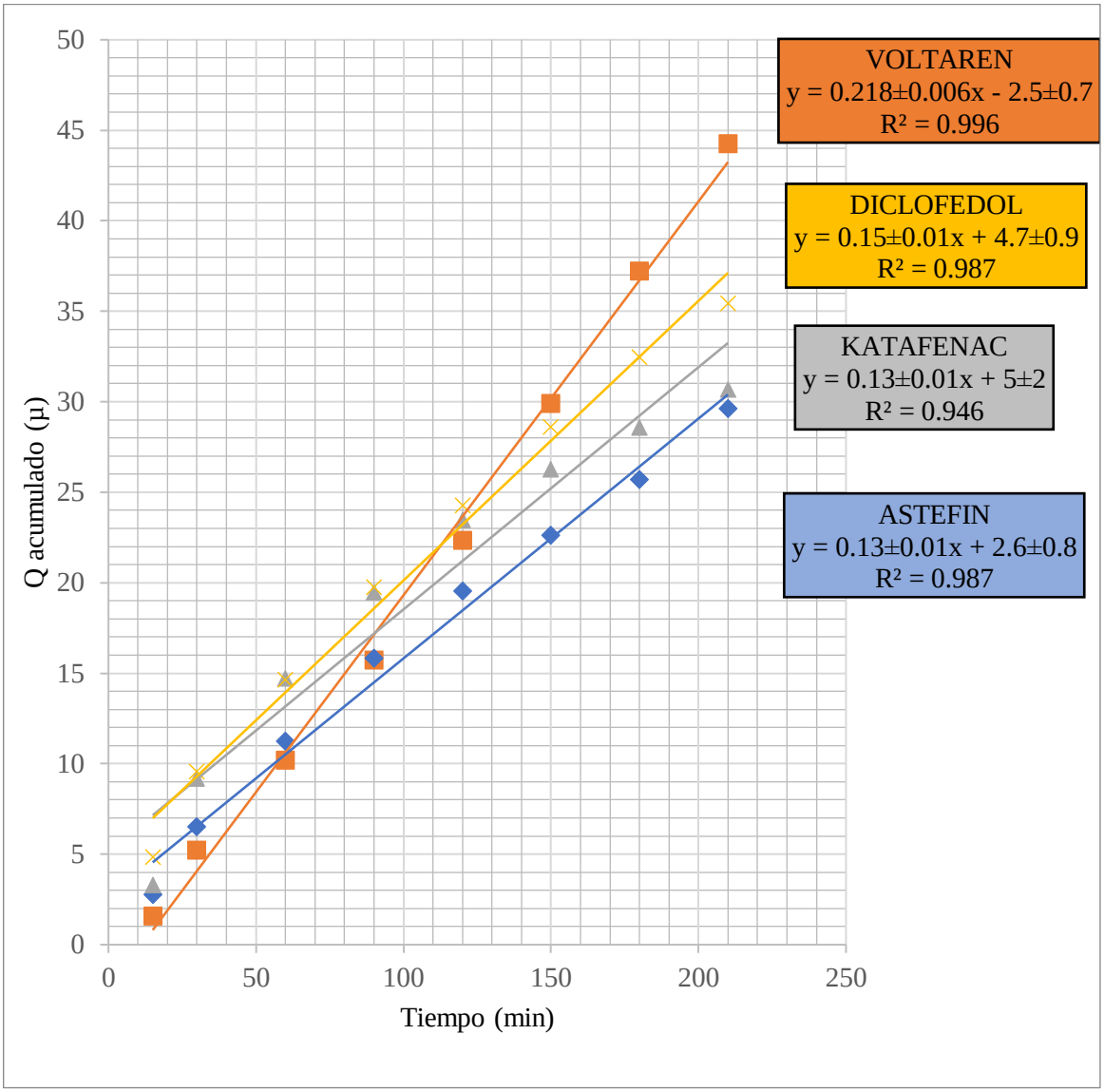
Tabla 20. Valores de Q acumulado liberado promedio obtenidos en los estudios IVRT con respecto al tiempo para Voltaren, Astefin, Katafenac y Diclofedol.

	Voltaren	**Astefin**	**Katafenac**	**Diclofedol**
Tiempo / min	**(Q) / µg**	**(Q) / µg**	**(Q) / µg**	**(Q) / µg**
15	2	3	3	5
30	5	7	9	10
60	10	11	15	15
90	16	16	19	20
120	22	20	23	24
150	30	23	26	29
180	37	26	29	32
210	44	30	31	35

Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Al graficarse en el eje “x” tiempo y en el eje “y” el valor promedio de Q para cada tiempo de muestreo resultante para los productos en estudio, se puede reconocer la forma linealizada de las cinéticas de orden cero. En la gráfica 11, se muestra las gráficas de orden cero obtenidas para los cuatro productos.

Gráfica 11. Cinéticas de orden cero para los cuatro productos evaluados



Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

De acuerdo con la gráfica 11, el producto farmacéutico que posee la mejor correlación de datos entre el tiempo y la cantidad liberada acumulada corresponde al producto referencia, seguido de Diclofedol y Astefin y por último, Katafenac. Esto quiere decir que el producto referencia sigue una cinética de orden cero y, por tanto, la cantidad de fármaco liberado por unidad de área es independiente de la dosis. Esto se puede corroborar con el estudio realizado por Pradal et al.,[36] donde se ratifica que la concentración de fármaco o su potencia no posee un efecto apreciable en los efectos farmacológicos. Además, se ha reportado que las

formulaciones emulgel de diclofenaco sódico suelen seguir cinéticas de orden cero y Higuchi[100].

No obstante, sí se logra apreciar, con este primer ajuste cinético, diferencias claras entre los productos: uno de ellos no sigue una cinética similar al producto referencia y se reflejan los posibles contrastes en cuanto a formulación por parte de los productos. El producto referencia lleva consigo en la etiqueta la palabra "emulgel" es un tipo de formulación en donde la estabilidad del producto es mayor que en los geles convencionales y la gran red cristalina del emulgel permite una mayor "descarga" del principio activo[101]. Existe evidencia de que en la fórmula cualitativa de emulgel se utiliza alcohol oleico, es un alcohol graso insaturado utilizado como un potenciador de permeación y se ha demostrado su uso en la investigación de Miranda, et al[102]., donde se realizan fórmulas piloto con estos excipientes y los perfiles IVRT se asemejan al producto referencia que también contiene dicho excipiente.

También existe evidencia que diferentes agentes gelificantes como carbomero e hipromelosa se comportan muy diferente. La viscosidad creada por ambos excipientes es diferente, por ejemplo, hipromelosa crea una red polimérica más densa y puede limitar la liberación del fármaco. Pradal et al.,[36] en su investigación, afirma que el Voltaren® presenta carbomero como parte de su formulación, lo cual podría explicar la mayor liberación de diclofenaco comparado con los demás productos. Sin embargo, se ha reportado disminución de la liberación de diclofenaco cuando la concentración de carbomero aumentó, debido a un aumento de la viscosidad de la fórmula[103].

Con respecto a la evaluación de la cinética de orden uno de los productos tópicos, se necesita graficar los valores de Ln Q_n remanente contra su variación en el tiempo, tal y como se muestra en la siguiente ecuación

$$\ln(Q_0 - Q) = \ln Q_0 - k_1 t \quad \text{ecuación Nº4}$$

La ecuación número cuatro corresponde a la función lineal y graficando el logaritmo neperiano de la cantidad de fármaco remante contra el tiempo debería resultar en una línea recta. Muchos productos farmacéuticos suelen seguir este tipo de cinética, en especial

aquellos donde el principio activo es soluble en la matriz, por tanto, es de esperar que la cantidad de producto liberado sea proporcional a la cantidad de producto remanente en la matriz[104].

En las siguientes tablas, se muestran los valores de ($Q_{remanente}$), ln de Q remanente y tiempo para los cuatro productos en estudio necesarios para la obtención de las gráficas que representarían las cinéticas de orden uno.

Tabla 21. Valores de (Q remante), ln (Q remante) obtenidos con el tiempo para el producto Voltaren.

Voltaren		
Tiempo / min	**($Q_{remanente}$) / µg**	**ln ($Q_{remante}$) / µg**
15	359	5,88
30	297	5,69
60	245	5,50
90	202	5,31
120	144	4,97
150	81	4,40
180	39	3,67
210	0	

Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Tabla 22. Valores de (Q remante), ln (Q remante) obtenidos con el tiempo para el producto Astefin.

Astefin		
Tiempo / min	**($Q_{remanente}$) / µg**	**ln ($Q_{remante}$) / µg**
15	200	5,30
30	147	4,99
60	102	4,63
90	76	4,33
120	67	4,20
150	57	4,05
180	38	3,63
210	0	

Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Tabla 23. Valores de (Q remante), ln (Q remante) obtenidos con el tiempo para el producto Katafenac.

Katafenac		
Tiempo / min	**($Q_{remanente}$) / µg**	**ln ($Q_{remante}$) / µg**
15	170	5,13
30	76	4,33
60	46	3,83
90	28	3,35
120	16	2,77
150	17	2,82
180	10	2,30
210	0	

Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

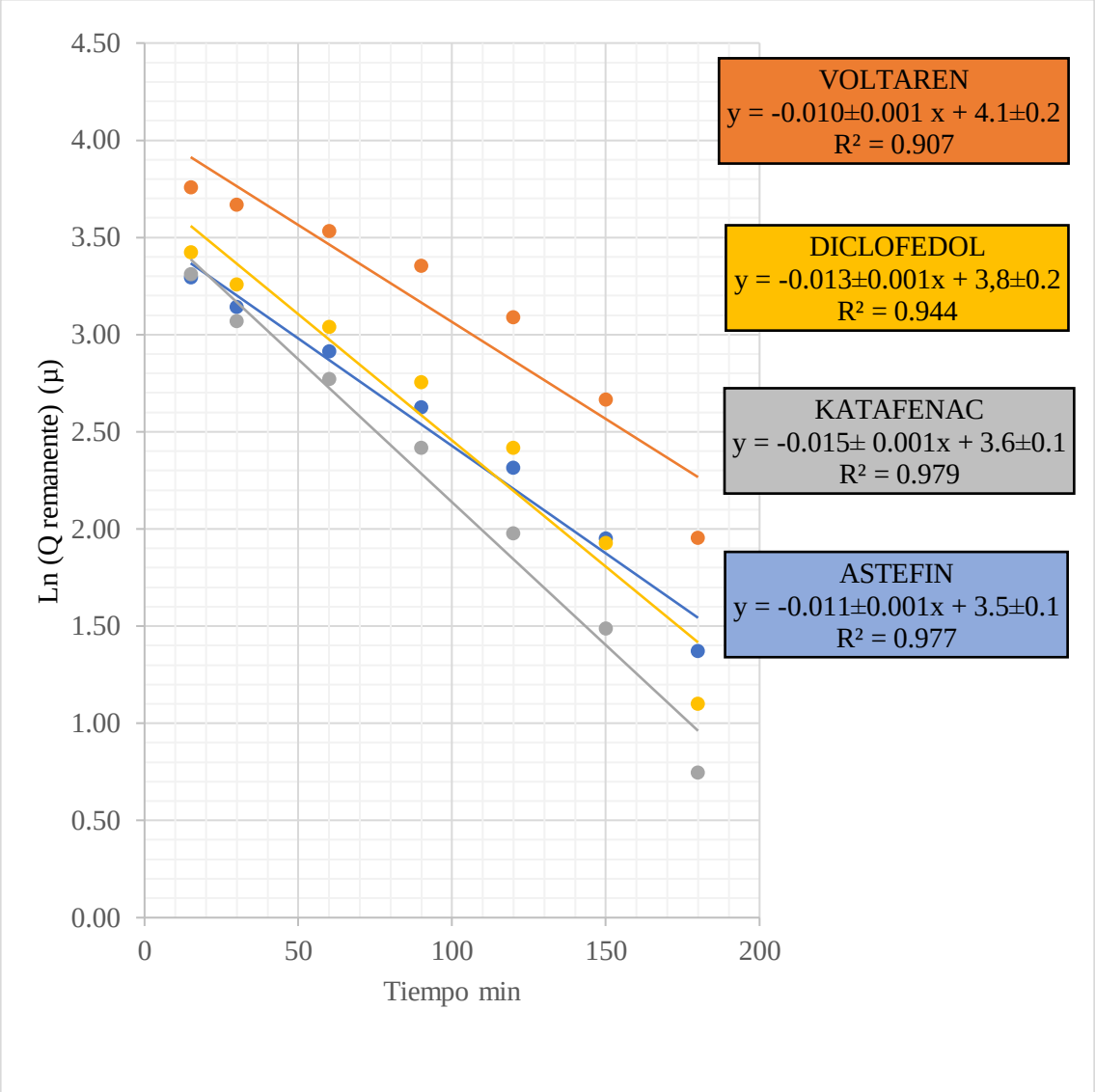
Tabla 24. Valores de (Q remante), ln (Q remante) obtenidos con el tiempo para el producto Diclofedol.

Diclofedol		
Tiempo / min	**($Q_{remanente}$) / µg**	**ln ($Q_{remante}$) / µg**
15	190	5,25
30	135	4,90
60	98	4,58
90	65	4,17
120	46	3,83
150	22	3,10
180	5	1,64
210	0	

Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Para conocer los datos de las tablas anteriores se debe realizar la suposición de que al tiempo 210 se ha alcanzado la cantidad máxima de fármaco liberado, si fuera lo contrario no podría obtenerse los datos para el análisis. Al graficarse en el eje “x” tiempo y en el eje “y” el valor promedio de ln ($Q_{remanente}$) para cada tiempo de muestreo obtenido para los productos en estudio, se puede conocer la forma linealizada de las cinéticas de orden uno. En la gráfica 12, se muestran las gráficas de orden uno resultantes para los cuatro productos.

Gráfica 12. Cinéticas de orden uno para los cuatro productos evaluados



Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Como se observa, dos de los productos evaluados no siguen una cinética de orden uno considerando que en ninguno de los casos el valor de R^2 posee un valor mayor a 0.98 (Voltaren y Diclofedol); los únicos productos que se encuentra cerca de este tipo de ajuste cinético corresponden al Astefin cuyo R^2 es de 0.977 y el Katafenac con un R^2 es de 0.979. Sin embargo, el valor de R^2 del Astefin en la cinética de orden cero es más cercano a un valor de uno (un valor R^2 0.987) que en la cinética de orden uno. Bajo este modelo, solamente el Katafenac sigue una cinética de orden uno. Esto significaría que la liberación de la droga se predice a consecuencia de la disolución del principio activo seguido de su difusión a través

de la membrana[68], así, para el Katafenac, la cantidad de producto que se vaya a aplicar sobre la piel tendrá más impacto, pues la liberación de la droga dependerá de la cantidad de producto aplicado.

En la siguiente tabla (tabla 25), se resumen los valores de coeficiente de determinación, R^2, obtenidos en las cinéticas de orden cero y orden uno para los productos evaluados, así como también se ofrece la cinética que genera más ajuste basado en el valor de R2 más cercano a uno.

Tabla 25. Valores de coeficiente de determinación, R^2, obtenidos en las cinéticas de orden cero y orden uno para Voltaren, Astefin, Katafenac y Diclofedol.

Producto	R^2 cinética orden cero	R^2 cinética orden uno	Observación
Voltaren	0.996	0.907	Cinética de orden cero
Astefin	0.987	0.977	Cinética de orden cero
Katafenac	0.946	0.979	Cinética de orden uno
Diclofedol	0.987	0.944	Cinética de orden cero

Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Este modelo de cinética de orden uno deja en claro las diferencias en términos de la formulación de los productos; sin embargo, es necesario considerar el análisis de ajuste cinético bajo los otros modelos descritos en el capítulo II para realizar un análisis más exhaustivo de las posibles diferencias entre los productos.

El modelo matemático que suele ajustarse de mejor manera para productos tópicos corresponde al modelo de Higuchi, este se ajusta tanto para principios activos poco solubles y muy solubles en matrices más complejas como para los productos tópicos. En el modelo de Higuchi, se necesitan seguir ciertas suposiciones, a saber:

1- La matriz contiene una concentración inicial del principio activo mucho mayor que su solubilidad
2- La difusión es una sola dirección

3- El grosor de la aplicación de la muestra es mucho más grande que el tamaño de las moléculas
4- No existe hinchamiento de la matriz
5- La difusión de la droga es constante

Cuando se grafica la cantidad de droga liberada por unidad de área con la raíz del tiempo, se obtiene una regresión lineal representativa de la cinética de Higuchi, en donde la pendiente representa la velocidad de liberación del fármaco de la matriz que podrá utilizarse para comparar los productos tópicos. En el siguiente cuadro, se muestran los datos necesarios para obtener la cinética de Higuchi respectiva para cada producto.

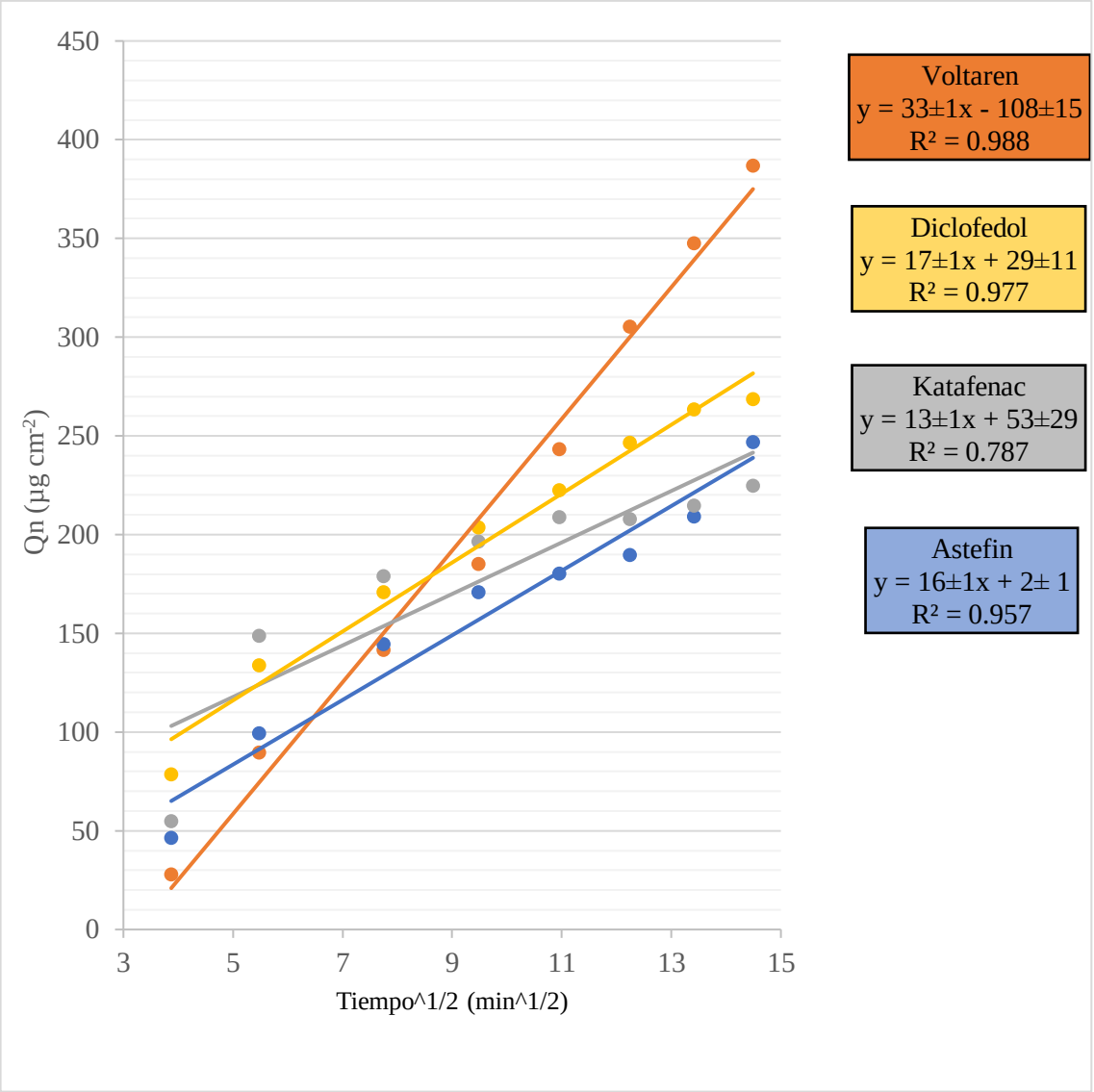
Tabla 26. Valores de cantidad de fármaco µg liberado por unidad de área obtenidos con el tiempo para Voltaren, Astefin, Katafenac y Diclofedol.

	Voltaren	**Astefin**	**Katafenac**	**Diclofedol**
Tiempo$^{1/2}$ / min$^{1/2}$	**Q_n / µg cm^{-2}**	**Q_n / µg cm^{-2}**	**Q_n / µg cm^{-2}**	**Q_n / µg cm^{-2}**
4	28	46	55	78
5	89	99	149	134
8	141	144	179	171
9	185	171	196	203
11	243	180	209	222
12	305	190	208	246
13	347	209	215	263
14	387	247	225	268

Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

La siguiente gráfica representa la cinética de Higuchi para los cuatro productos, se puede observar que similar a lo que pasó con la cinética de orden cero, el Voltaren posee un valor de R2 mayor a 0.98 indicativo de que este producto se ajusta ante dicha cinética. El Diclofedol también se ajusta a esta cinética; sin embargo, para los otros dos productos genéricos no existe un buen ajuste.

Gráfica 13. Cinéticas de Higuchi para los cuatro productos evaluados



Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Por otra parte, a partir de los datos de la curva de regresión es posible extraer los valores de velocidad de liberación en µg cm^{-2} $min^{-1/2}$ a partir de los valores de las pendientes en el cual el Voltaren posee una velocidad de liberación 33 µg cm^{-2} $min^{-1/2}$, el Diclofedol posee un valor de 17 y muy cercano a este el Astefin con 16 µg cm^{-2} $min^{-1/2}$. La pendiente es entonces la velocidad de liberación del fármaco desde la matriz compleja del producto, pero esta constante, que también suele llamarse la constante de Higuchi o K_H, representa otros fenómenos que están directamente vinculados con la liberación del fármaco[103].

Originalmente, la ecuación de Higuchi se expresa de la siguiente manera[101]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \sqrt{\frac{2C_0 D\, \varepsilon\, t}{\tau\, \pi}}$$ ecuación Nº12

Donde Mt/M∞ representa la fracción de droga liberada por unidad de área, Co la concentración de la droga en la matriz, D es el coeficiente de difusión en la matriz, ε representa la porosidad de la matriz y τ el factor de tortuosidad (propiedad intrínseca de la porosidad)[103]. Al utilizarse la ecuación simplificada de Higuchi los valores de D, Co, ε y τ se vuelven KH, la cual significará los fenómenos de masa que la droga tiene que sobrellevar para pasar de la matriz al medio receptor o en condiciones in vivo, la piel.

Por ende, la cantidad de fármaco liberada por unidad de área superficial será mayor en el producto referencia que en los demás productos genéricos. De las implicaciones de esta información se podría esperar que el Voltaren tenga posiblemente un mayor efecto terapéutico dado que su formulación permite "liberar" más fármaco en el sitio de aplicación. También, es posible afirmar que la fórmula cuali-cuantitativa del Diclofedol y Astefin son parecidas debido a que los valores de K_H entre sí son muy similares.

Otra pieza de información, posible de extraer en la cinética de Higuchi obtenidas para los cuatro productos, corresponde al porcentaje de liberación de fármaco al momento de finalizar el estudio IVRT. Se asume que la cantidad aplicada de producto en la membrana es aproximadamente de 0.100 g y considerando el valor de Qn al momento de finalizado el estudio sobre el Voltaren y el Diclofedol, los dos productos con valores de R^2 más cercanos a 0.98 presentaría valores cercanos al 30% de liberación; de acuerdo con la cinética de Higuchi, la liberación de al menos 30% del principio activo sigue una tendencia lineal. Esto explica el caso del Katafenac cuyo valor de R^2 resulta el más bajo de todos los productos fundamentado en que el porcentaje de liberación del principio activo calculado está muy por debajo del 30% esperado.

En el estudio realizado por Manian[105], se logra demostrar que el tipo de formulación de producto afectará directamente la liberación del principio activo del mismo y también la difusión. Productos formulados a base de emulgel y gel poseen mejores perfiles de liberación

in vitro que aquellos formulados a base de ungüento o crema, pues los primeros poseen viscosidades menores y naturaleza más fluida.

Las formulaciones de tipo emulgel se prefieren en productos con principio activo como el diclofenaco por su naturaleza emoliente; además, mejora la retención cutánea que aquellos productos de tipo ungüento. No existe un método "standard" para determinar si una formula tópica es mejor que la otra, solo se deben emplear combinaciones de otras técnicas para generar un criterio más certero y exacto de las verdaderas diferencias entre los productos[105].

Con la información obtenida de las cinéticas de Higuchi es posible conocer estadísticamente las diferencias entre los productos tomando en cuenta al Voltaren como producto referencia, para ello se debe calcular un intervalo de confianza del 90 % para la proporción de la tasa de liberación in vitro mediana (el valor de K_H) para el producto referencia sobre la tasa de liberación in vitro mediana para el producto genérico, expresado en términos porcentuales. Si este intervalo de confianza del 90 % cae dentro de los límites del 75 % al 133,33 %, significa que el producto genérico posee equivalencia in vitro comparada con la referencia[106].

Para obtener los límites, bajo este intervalo de confianza, se utilizó la relación de cada pendiente de producto genérico contra el de prueba, y mediante el cálculo de la desviación estándar de los datos se calcula la constante de confianza, ésta se debe sumar al promedio de la población (ecuación Nº13).

En el siguiente cuadro, se muestran los valores de límite superior e inferior obtenidos de la comparación de cada genérico contra el producto referencia.

$$\mathrm{IC} = \bar{x} \pm z\frac{s}{\sqrt{n}}$$ ecuación Nº13

Tabla 27. Límite superior e inferior para las comparaciones entre producto genérico contra referencia

Comparación	Valor límite del intervalo de confianza al 90%	Conclusión
Voltaren vs Astefin	43.7-52.1	No es similar
Voltaren vs Katafenac	33.3-44.2	No es similar
Voltaren vs Diclofedol	48.0-54.2	No es similar

Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Con los datos obtenidos en la tabla 27, es posible afirmar que ningún producto genérico estudiado presenta similitud con el producto referencia, en este caso Voltaren. Las diferencias se deben a la clara discrepancia entre las formulaciones y los valores de K_H obtenidos anteriormente en la cinética de Higuchi, y aunque esta tabla refleja la poca similitud entre los productos esto solo refleja en el desempeño de cada fórmula.

Otro modelo cinético que suele usarse para explicar la liberación de fármacos en matrices poliméricas como lo son los hidrogeles corresponde a la cinética de Korsmeyer–Peppas. Para la obtención de la cinética de los productos bajo este modelo es necesario considerar el logaritmo de la fracción de fármaco en equilibrio o $Qt/Q\infty$. Estos datos se representan en el siguiente cuadro:

Tabla 28. Valores de log (Q_t/Q_∞) y obtenidos con el tiempo para Voltaren, Astefin, Katafenac y Diclofedol.

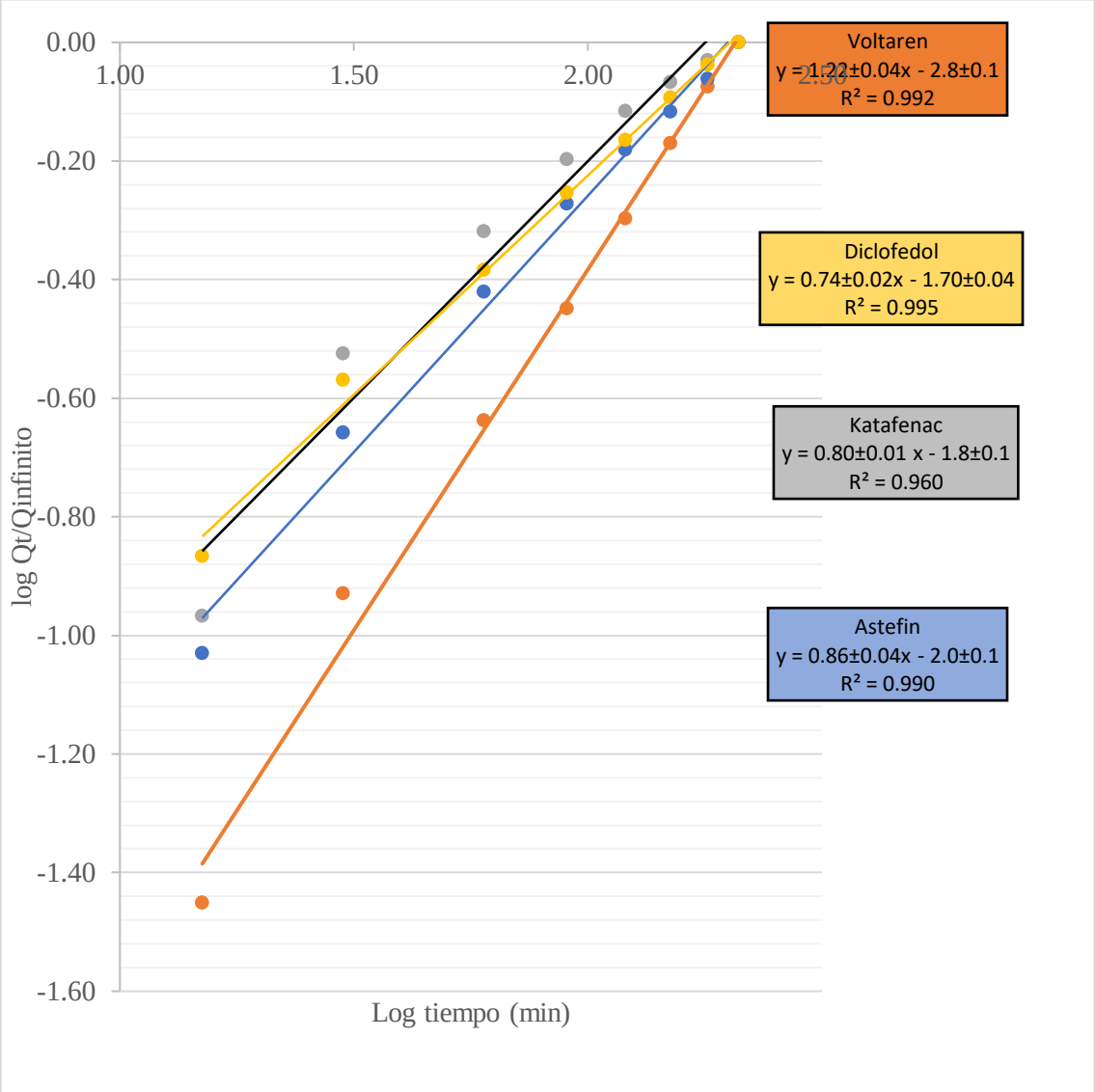
	Voltaren	Astefin	Katafenac	Diclofedol
Log t / log min	**Log Q_t/Q_∞**	**Log Q_t/Q_∞**	**Log Q_t/Q_∞**	**Log Q_t/Q_∞**
1,18	-1,45	-1,03	-0,97	-0,87
1,48	-0,93	-0,66	-0,52	-0,57
1,78	-0,64	-0,42	-0,32	-0,38
1,95	-0,45	-0,27	-0,20	-0,25
2,08	-0,30	-0,18	-0,12	-0,16
2,18	-0,17	-0,12	-0,07	-0,09
2,26	-0,08	-0,06	-0,03	-0,04
2,32	0,00	0,00	0,00	0,00

Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Al graficarse el logaritmo de Q_t/Q_∞ contra el logaritmo del tiempo es posible obtener la forma linealizada de Korsmeyer–Peppas (ecuación 14)[101]. Donde la pendiente corresponde al valor n utilizado para determinar el mecanismo de liberación del fármaco de la matriz. Cuando el valor de n es menor o igual 0.5, la difusión de la droga está gobernada por difusión únicamente, cuando n es mayor a 0.5 pero menor a 1 la droga no sigue la ley de Fick de difusión y, además, existen fenómenos de hinchamiento, y cuando n es mayor a 1 se le conoce como Súper Modelo II donde la droga tampoco sigue la ley de Fick y donde existe un rompimiento de la red polimérica de la matriz.

$$log\,\frac{Q_t}{Q_\infty} = \log K + n \log t \text{ ecuación Nº 14}$$

Gráfica 14.Cinéticas de Korsmeyer-Peppas para los cuatro productos evaluados.



Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Con los datos obtenidos en las curvas linealizadas de Korsmeyer–Peppas se pueden extraer los valores de n para cada uno de los productos. El Voltaren es el único producto con un valor de n mayor a 1, mientras que los otros tres productos presentan valores de n menores a 1 y mayores a 5. De manera que el Voltaren sigue un mecanismo de liberación de tipo Super caso II y los otros tres productos un mecanismo de transporte anómalo. En el tipo de transporte Super caso II, la velocidad de difusión del solvente es mucho mayor que el proceso de relajación del polímero, esto provoca una aceleración de la penetración del solvente hacia

la matriz. En la siguiente tabla, se resume los valores de n obtenidos y el tipo de difusión propuesto para cada producto.

Tabla 29. Valores de *n* obtenidas a partir de las pendientes de la cinética de Korsmeyer–Peppas.

Producto	Valor de *n*	Mecanismo de liberación
Voltaren	1.22	Trasporte de tipo súper caso II
Astefin	0.86	Trasporte anómalo
Katafenac	0.80	Trasporte anómalo
Diclofedol	0.74	Trasporte anómalo

Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

Un aspecto importante por considerar es la naturaleza de la MCH ésta es de origen natural y es de esperar la existencia de problemas de reproducibilidad en los datos obtenidos, pues no se puede asegurar que, aunque se hayan usado huevos del mismo proveedor, la MCH extraída de cada huevo tendrá un comportamiento uniforme. Por ello, también se realizó un experimento en donde de un solo huevo se usó la membrana extraída de este para realizar el estudio IVRT de los cuatro productos de manera simultánea.

En el siguiente cuadro, se muestran los resultados de la cinética de Higuchi del experimento descrito con anterioridad, en donde se comparan los valores de liberación del fármaco en µg cm^{-2} para cada producto. Los datos identificados como “datos originales” hacen referencia al estudio IVRT de cada producto realizado con cuatro réplicas de cada uno, mientras que los “datos nuevos” hacen referencia a solo una réplica de cada producto.

Tabla 30. Comparación de los valores de K_H obtenidas al inicio y al final de la investigación

Producto	Datos originales	Datos nuevos
	K_H / µg cm^{-2} $min^{-1/2}$	K_H / µg cm^{-2} $min^{-1/2}$
Voltaren	33	30
Astefin	16	19
Katafenac	13	16
Diclofedol	17	22

Fuente: elaboración propia a partir de los datos experimentales, 2023.

A partir de los datos de la tabla 23, es posible afirmar que, en efecto, la membrana, debido a su origen natural, presentará variaciones que afectarán los resultados y su interpretación. Es posible observar que el valor de la constante de Higuchi cambió ligeramente, pero no bruscamente lo cual demuestra, en cierto punto, un grado de robustez analítica.

No obstante, en metodologías analíticas, donde se analizan resultados cuantitativos, es necesario realizar los experimentos con tres o más replicas para evaluar la reproducibilidad del método; sin embargo, en el presente método de IVRT, con solo una muestra de huevo a lo mucho se pueden obtener cuatro secciones de la MCH necesarias para el estudio. Por tanto, no es posible realizar un estudio completo de IVRT para varios productos con una sola muestra de huevo, será necesario entonces considerar la naturaleza de la membrana en la precisión de los resultados.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el siguiente apartado, se mencionan las conclusiones obtenidas de la investigación. El análisis de las conclusiones se elaboró en el mismo orden como se desarrollaron los objetivos. Los distintos experimentos realizados en conjunto con los análisis cinéticos permitieron obtener la información que se discutirá a continuación.

5.1 Conclusiones

De acuerdo con lo encontrado en la literatura existen diversos métodos para la extracción de la MCH de la cáscara de huevo incluido mecánicos, enzimáticos y químicos. A nivel experimental se demostró que el uso de soluciones de ácido acético- un método químico, en concentraciones de un rango de 0.5 a 1.5 mol L^{-1} resultan útiles para lograr la separación de la MCH de su cáscara y con ello lograr la extracción de la membrana. Estas concentraciones de ácido acético demostraron pocas diferencias en lo que corresponde a los porcentajes de recuperación de la membrana por tanto es posible utilizar cualquiera de las concentraciones antes mencionadas.

El ácido acético se puede utilizar para la extracción de la MCH de la cáscara debido a que no afecta de manera significativa la integridad de la membrana, considerando que en los espectros infrarrojos obtenidos de las muestras de MCH extraídas a diversas concentraciones de ácido, son prácticamente similares en términos de las señales de los grupos funcionales. En todas las muestras analizadas se logró observar la señal correspondiente al grupo funcional carbonilo de la amida, implicando que no hubo cambios estructurales de la membrana independiente de la concentración usada de ácido acético.

Además, la MCH de la cáscara de huevo posee propiedades adsorbentes demostrado con los resultados obtenidos en las pruebas de adsorción y el análisis de las isotermas de Langmuir y Freundlich, aunque en este caso particular no se logró determinar a cuál isoterma se ajusta el fenómeno de adsorción entre la MCH y el AM debido a la poca linealidad encontrada en ambos casos, consecuente a la saturación de la MCH por el rango de concentración de AM utilizado.

En la optimización de las variables del método de IVRT, se concluyó que no es posible pesar una cantidad especifica de muestra para aplicar sobre la membrana, pues la

celda de Franz debe ir llena en su totalidad con el buffer de pH 7.0 en la cámara receptora y, por tanto, la membrana, al entrar en contacto con el líquido, se humecta de manera que cualquier masa obtenida bajo estas condiciones no resultaría confiable. De manera que se concluye que se debe de usar una cantidad aproximada de entre 100 a 300 mg de muestra y aplicarse sobre la totalidad de la membrana para asegurar que se forme lo que se conoce como la capa infinita de producto.

Las celdas de Franz no se pueden usar como réplicas individuales para los tiempos de muestreo establecidos para evitar tomar alícuotas de esta, la razón es que no se obtienen resultados reproducibles considerando que cada celda tendría una membrana y una cantidad ligeramente diferente de muestra en la cámara donante, esto afecta la reproducibilidad del análisis. Sin embargo, al aplicarse la capa infinita de muestra sobre la membrana es posible tomar alícuotas desde la cámara receptora y con ello tener mayor reproducibilidad en el análisis IVRT.

Para concluir, la MCH necesita humectarse en buffer de fosfatos de pH 7.0 por lo menos 30 minutos previo al análisis IVRT para lograr de esta manera una aplicación más homogénea del producto sobre la membrana. Además, se concluyó que en los análisis IVRT es necesario tener al menos 6 tiempos de muestreo y extenderlos, en el caso de productos tópicos con diclofenaco dietilamonio, hasta al menos 3 horas considerando que se logró demostrar que hasta ese tiempo se obtiene cerca de un 30% de la cantidad de fármaco liberado recomendado para lograr obtener cinéticas lineales de Higuchi. Por otro lado, terminar el estudio de IVRT antes de las 3 horas no tiene un impacto significativo en el valor de la pendiente de Higuchi, pero si es más visible en la cantidad de fármaco total liberado en el último tiempo de muestreo.

Durante los estudios IVRT de los cuatro productos tópicos evaluados solamente uno de ellos (Katafenac) no sigue una cinética de orden cero esperable para productos de uso tópico. El valor del coeficiente de correlación para este producto es menor a 0.98 de manera que la cantidad acumulada de fármaco liberado con el tiempo no se ajusta ante dicha cinética. Contrariamente, el Voltaren es el producto que presenta el mejor ajuste cinético de orden

cero posiblemente debido a que se reporta la presencia de carbomero en su formulación, un polímero reportado en mejorar la liberación de fármacos de uso tópico.

En cuanto al ajuste de cinética de orden uno, el Katafenac presenta un ajuste de orden uno de manera que la cantidad de fármaco liberado tópicamente dependerá de la cantidad de producto que se aplique directamente en la piel, así, este es el producto que presenta las mayores diferencias con los demás productos estudiados basado en las diferencias encontradas en las cinéticas estudiadas.

Asimismo, de acuerdo con los ajustes de cinética de Higuchi se puede concluir que el Voltaren es el producto que presenta la mayor liberación de principio activo por unidad de área de los cuatro productos en estudio. De manera que se podría esperar el Voltaren posea un efecto terapéutico mayor que los otros productos estudiados, debido a que su formulación permite liberar el diclofenaco de una manera más rápida que los otros productos estudiados. En conjunto con esto, los otros tres productos presentan nivel de similitud con el Voltaren menor al rango esperado de 75 a 133.33% recomendado por la FDA.

Finalmente, la MCH es una es una alternativa económica para la realización de estudios de liberación in vitro, debido a que se logró evidenciar la existencia de diferencias en las formulaciones de cuatro productos tópicos evaluados bajo cuatro modelos cinéticos diferentes. No obstante, también se concluye que la naturaleza de esta membrana induce cierto grado de variabilidad en los resultados considerando que la MCH obtenida de cada huevo presentarán características morfológicas que en el presente proyecto no fueron estudiadas.

5.2 Recomendaciones

- Se recomienda continuar la investigación realizada encaminado en la mejora de la reproducibilidad analítica. Se sugiere investigar una metodología en la cual se pueda homogenizar más la membrana extraída de la cáscara de huevo, por ejemplo, secar y reducir el tamaño de partícula de la MCH para poder formar una película más homogénea de membrana.

- Se sugiere el uso de una solución de ácido acético con concentración de 1.5 M para la extracción de la membrana de 40 a 50 ºC para acelerar la separación de la MCH de la cáscara de huevo.

- Se recomienda utilizar huevos de gallina que provengan de la misma fuente para disminuir en mayor medida la variación que se puede presentar debido a la naturaleza misma de la membrana utilizada.

- Se recomienda la utilización de otras técnicas de caracterización fisicoquímicas de la membrana como: la microscopia de barrido electrónico y la calorimetría diferencial de barrido para evaluar de manera más concisa el efecto de sustancias ácidas en la extracción de la membrana.

- Para los estudios IVRT se sugiere al menos 6 tiempos distribuidos en el tiempo total del estudio, éste no debería sobrepasar las cuatro horas considerando que estos estudios se podrían establecer como ejercicios de práctica de cursos universitarios en la carrera de Farmacia.

- Para los estudios IVRT se recomienda humectar previamente la membrana, así con una aplicación sencilla de la muestra sobre la membrana se facilita el flujo del principio activo a la cámara receptora.

- Se recomienda utilizar una celda de difusión de Franz de mayor volumen o un sistema de toma de muestra que permita realizar una dilución con un volumen conocido y con esto obtener resultados más exactos.

- Se sugiere continuar estudios de liberación in vitro con más de una membrana para evaluar el verdadero efecto que poseen sobre la liberación de un fármaco en las celdas de difusión de Franz.

- Se recomienda a la Universidad Internacional de las Américas continuar la incentivación de estudios de liberación in vitro tanto para productos comerciales como aquellos en desarrollo.

CAPÍTULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramos dos Santos, I., Mezomo, M., Leite Santos, L. G., Strapassola Moura Alves, G., Reis Moretto, G., Gonçalves Shibata, J. G., & Ferreira Agüero, P. M. A. Uso indiscriminado de antiinflamatorios no esteroidales y sus relaciones con enfermedades gastrointestinales. Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar [Internet]. 2022 [citado el 23 de enero de 2023]; *6*(6), 1789-1802. Disponible en: doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i6.3637
2. Segura-Campos, L.A. Medicamentos genéricos su importancia económica en los sistemas públicos de salud y la necesidad de estudios in vitro para establecer su bioequivalencia. Pensamiento Actual [Internet]. 2017. [citado el 23 de enero de 2023]; 17 (28), 108-120. Disponible en: doi.org/10.15517/pa.v17i28.29549
3. Berben, P., Bauer-Brandl, A., Brandl, M., Faller, B., Flaten, G., Jacobsen, A., Brouwers, J. y Augustijns, P. (2018). Drug permeability profiling using cell-free permeation tools: Overview and applications. Eur J Pharm Sci. [Internet]. 2018 [citado el 23 de enero de 2023]. 119, 219-233. Disponible en: 10.1016/j.ejps.2018.04.016
4. Shi Y, Zhou K, Li D, Guyonnet V, Hincke MT, Mine Y. Avian Eggshell Membrane as a Novel Biomaterial: A Review. Foods. [Internet]. 2021 [citado el 23 de enero de 2023]. 10(9):2178. Disponible en: 10.3390/foods10092178.
5. Maanvizhi, S., Iyyappan, V y Bhavishi, P. In-vitro release study of Diclofenac sodium from topical gel formulations using diffusion cell. Res J Pharm Technol. [Internet]. 2020 [citado el 24 de enero de 2023] 13 (6). 2901. Disponible en: 10.5958/0974-360X.2020.00517.X.
6. Salamanca, C.H., Barrera-Ocampo, A., Lasso, J.C., Camacho, N., Yarce, C.J. Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterisation of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms. Pharmaceutics [Internet]. 2018 [citado el 24 de enero de 2023] 10, 148. Disponible en: 10.3390/pharmaceutics10030148.
7. Committee for Medicinal Products for Human Use. Draft guideline on quality and equivalence of topical products. 2018.

8. Abd E., Yousef S.A., Pastore M.N., et al. Skin models for the testing of transdermal drugs. Clin Pharmacol. [Internet]. 2016 [citado el 25 de enero de 2023]; 8:163-176. Disponible en:10.2147/CPAA.S64788
9. Wei, J., Cartmill, I., Kendall, M. y Crichton, M. In vivo, in situ and ex vivo comparison of porcine skin for microprojection array penetration depth, delivery efficiency and elastic modulus assessment. J Mech Behav Biomed Mater. [Internet]. 2022 [citado el 25 de enero de 2023]. 130. Disponible en: 10.1016/j.jmbbm.2022.105187
10. Baláž, M., Boldyreva E.V., Rybin, D., Pavlović, S., Rodríguez-Padrón, D., Mudrinić, T., Luque, R.State-of-the-Art of Eggshell Waste in Materials Science: Recent Advances in Catalysis, Pharmaceutical Applications, and Mechanochemistry. Front Bioeng Biotechnol. [Internet]. 2021 [citado el 25 de enero de 2023]. 8:612567. Disponible en: 10.3389/fbioe.2020.612567
11. Thombre, N., Jangam, P., Umarani, R., Kulkarni, N., Kshirsagar, S. Development and evaluation of Deferasirox loaded nanoparticles for the treatment of breast cancer: evaluation in-vitro and cell line study. Ars Pharm [Internet]. 2022. [citado 2023 Ene 26] ; 63(3): 209-221. Disponible en: 10.30827/ars.v63i3.22142
12. Chi. Y., Liu, R., Lin, M,, Chi, Y. A novel process to separate the eggshell membranes and eggshells via flash evaporation. Food Sci Technol [Internet]. 2022. [citado el 26 de enero de 2023];42. Disponible en:10.1590/fst.07522.
13. Torres-Mansilla, A., Delgado-Me, E. Influence of Separation Techniques with Acid Solutions on the Composition of Eggshell Membrane. Int J PoulT Sci. [Internet]. 2017. [citado el 26 de enero de 2023] 16. 451-456. Disponible en: 10.3923/ijps.2017.451.456.
14. Tari, D., Haryan, S., Patankar, K., Jaiswal, V., Samant, M., Sivakami, S. A simple egg membrane model for understanding diffusion characteristics of nanoparticles and amino acids. Curr Sci [Internet]. 2017. [citado el 28 de enero de 2023]; 112(07):1574. Disponible en: 10.18520/cs/v112/i07/1574-1578
15. Tanifuji, N., Shimizu, T., Yoshikawa, H., Tanaka, M., Nishio, K., Ida K. Assessment of eggshell membrane as a new type of proton-conductive membrane in fuel cells.

ACS Omega [Internet]. 2022. [citado el 28 de enero de 2023]; 7(15):12637–42. Disponible en: 10.1021/acsomega.1c06687

16. Velloso MI, Andreeta HA, Landoni MF. Effect of two surfactants on in vitro permeation of butorphanol through horse nasal mucosa. UNICIENCIA [Internet]. 2021;35(2):1–10. Disponible en: 10.15359/ru.35-2.1
17. Silva, G., Araújo, C., Gonsalves, A. Evaluación de la membrana de la cáscara de huevo como una matriz de biopolímero alternativa para la administración de nimesulida. Rev. colomb. cienc. quim. farm. [Internet]. 2021. [citado el 30 de enero del 2023]; 50(2): 550-570. 1000200550&lng=en. Epub Nov 05, 2021. 10.15446/rcciquifa.v50n2.91038.
18. Mendoza N, Chávez G, Araya O. Membrana de cáscara de huevo para la curación de heridas superficiales en ratones. Biomedica [Internet]. 2022. [citado el 28 de enero de 2023] ;42(2):234–43. Disponible en: http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.6192
19. Astuti, K., Sumirtapura, Y., Wiwik S., Ni N. Diffusion of Sodium Diclofenac from Carbopol 940 Gel at Various pH. J Pharm Sci App. [internet]. 2012. [citado el 28 de enero de 2023]; 1 (1): 25-32. Disponible en: doi.org/10.24843/JPSA.2012.v01.i01.p03.
20. Siraj, S., Ansari, S., Khan, M., Patel, S., Salim, I., Jadhav D. Formulation and Characterization of Piroxicam Emulgel for Topical Drug Delivery: Pharmaceutical Science-Pharmacy for better health. Int J Life Sci Pharma Res [Internet]. 2022. [citado el 28 de enero de 2023] 10(2):46–54. Disponible en: http://dx.doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2020.10.2.p46-54
21. Manian M, Jain P, Vora D, Banga AK. Formulation and evaluation of the in vitro performance of topical dermatological products containing diclofenac sodium. Pharmaceutics [Internet]. 2022. [citado el 28 de enero de 2023] 14(9):1892. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14091892
22. Iliopoulos F, Goh CF, Haque T, Rahma A, Lane ME. Dermal delivery of diclofenac sodium-in vitro and in vivo studies. Pharmaceutics [Internet]. 2022. [citado el 28 de enero de 2023] 14(10):2106. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14102106

23. Saeed A, Saeed H, Saleem Z, Fang Y, Babar ZUD. Evaluation of prices, availability and affordability of essential medicines in Lahore Division, Pakistan: A cross-sectional survey using WHO/HAI methodology. Carvalho LH, editor. PLOS ONE. [internet]. 2019. [citado el 28 de enero de 2023] 25;14(4):e0216122
24. Sathe. Singh KL, Phatak AM, Sathe M. Beliefs and attitudes of generic versus original drugs among doctors in a tertiary-care. hospital in Western India. Natl J Physiol Pharm Pharmacol. [internet]. 2016. [citado el 28 de enero de 2023] 6(4):276–6. Disponible en: https://www.njppp.com/fulltext/28-1456251561.pdf
25. WHO Drug Information Vol. 30, No. 3, 2016
26. Dunne S, Shannon B, Dunne C, Cullen W. A review of the differences and similarities between generic drugs and their originator counterparts, including economic benefits associated with usage of generic medicines, using Ireland as a case study. BMC Pharmacol Toxicol [Internet]. 2013. [citado el 28 de enero de 2023]; 14(1):1. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/2050-6511-14-1
27. Ghosh P, Raney SG, Luke MC. How does the food and drug administration approve topical generic drugs applied to the skin? Dermatol Clin [Internet]. 2022. [citado el 29 de enero de 2023]; 40(3):279–87. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2022.02.003
28. Jin X, Imran M, Mohammed Y. Topical semisolid products-understanding the impact of metamorphosis on skin penetration and physicochemical properties. Pharmaceutics [Internet]. 2022. [citado el 29 de enero de 2023];14(11). Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14112487
29. Roberts M, Cheruvu H, Mangion S, Alinaghi A, Benson H, Mohammed Y. Topical drug delivery: History, percutaneous absorption, and product development. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2021. [citado el 29 de enero de 2023]; 177(113929):113929. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2021.113929
30. Vitthal S. Kulkarni, Charles Shaw, Chapter 4 - Formulating Creams, Gels, Lotions, and Suspensions, Editor(s): Vitthal S. Kulkarni, Charles Shaw, Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages, Academic Press. (2016). paginas 29-41.

31. Mishra, Manoj. (2018). Semisolid dosage forms manufacturing: Tools, critical process parameters, strategies, optimization and recent advances).
32. Souza A, Strober B. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. Estados Unidos. McGraw Hill; 2012. Octava edición. Cápitulo 214, Principles of Topical. Disponible en:https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=392&sectionid=41138950.
33. Stanos S. Topical Analgesics. Phys Med Rehabil Clin N Am. [internet]. 2020. [citado el 6 de febrero de 2023]; 31(2):233-244. Disponible en: 10.1016/j.pmr.2020.02.002. PMID: 32279726.
34. Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, Oatis C, Guyatt G, Block J. American College of Rheumatology/Arthritis Foundation guideline for the management of osteoarthritis of the Hand, hip, and knee. Arthritis Care Res (Hoboken) [Internet]. 2020. [citado el 6 de febrero de 2023]; 72(2):149–62. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/acr.24131
35. Amanullah A, Upadhyay A, Dhiman R, Singh S, Kumar A, Ahirwar DK, et al. Development and challenges of diclofenac-based novel therapeutics: Targeting cancer and complex diseases. Cancers (Basel) [Internet]. 2022. [citado el 11 de febrero de 2023]; 14(18):4385. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/cancers14184385
36. Pradal J, Vallet CM, Frappin G, Bariguian F, Lombardi MS. Importance of the formulation in the skin delivery of topical diclofenac: not all topical diclofenac formulations are the same. J Pain Res [Internet]. 2019. [citado el 11 de febrero de 2023]; 12:1149–54. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2147/JPR.S191300
37. PubChem. PubChem [Internet]. Nih.gov. [citado el 11 de febrero de 2023]. Disponible en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
38. Bariguian-Revel F, Fayet M, Hagen M. Topical diclofenac, an efficacious treatment for osteoarthritis: A narrative review. Rheumatol Ther [Internet]. 2020. [citado el 12 de febrero de 2023]; 7(2):217–36. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s40744-020-00196-6
39. García-Arieta A, Gordon J, Gwaza L, Merino V, Mangas-Sanjuan V. Regulatory requirements for the development of second-entry semisolid Topical Products in the

European union. Pharmaceutics [Internet]. 2023. [citado el 12 de febrero de 2023]; 15(2). Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics15020601

40. Jasco.hu. 2014 [citado el 12 de febrero de 2023]. Disponible en: https://www.jasco.hu/wp-content/uploads/2014/09/WP0001-A-DiffusionMethodDevelopmentGuidelines.pdf
41. Raney SG, Ghosh P, Ramezanli T, Lehman PA, Franz TJ. Cutaneous pharmacokinetic approaches to compare bioavailability and/or bioequivalence for topical drug products. Dermatol Clin [Internet]. 2022. [citado el 14 de febrero de 2023]; 40(3):319–32. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2022.02.007
42. Santos LL, Swofford NJ, Santiago BG. In vitro permeation test (IVPT) for pharmacokinetic assessment of topical dermatological formulations. Curr Protoc Pharmacol [Internet]. 2020. [citado el 14 de febrero de 2023]; 91(1):e79. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/cpph.79
43. Kanfer I, Rath S, Purazi P, Mudyahoto NA. In vitro release testing of semi-solid dosage forms. Dissolution Technol [Internet]. 2017. [citado el 15 de febrero de 2023]; 24(3):52–60. Disponible en: http://dx.doi.org/10.14227/dt240317p52
44. Shah VP, Simona Miron D, Ștefan Rădulescu F, Cardot JM, Maibach HI. In vitro release test (IVRT): Principles and applications. Int J Pharm. 2022. [citado el 15 de febrero de 2023]; 626:122159. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36067919/
45. Oh L, Yi S, Zhang D, Shin SH, Bashaw E. In vitro skin permeation methodology for over-the-counter topical dermatologic products. Ther Innov Regul Sci [Internet]. 2020. [citado el 15 de febrero de 2023]; 54(3):693–700. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s43441-019-00104-3
46. Zsikó, Csányi, Kovács, Budai-Szűcs, Gácsi, Berkó. Methods to evaluate skin penetration in vitro. Sci Pharm [Internet]. 2019. [citado el 15 de febrero de 2023]; 87(3):19. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/scipharm87030019
47. Gieszinger P, Kiss T, Szabó-Révész P, Ambrus R. The development of an in vitro horizontal diffusion cell to monitor nasal powder penetration inline. Pharmaceutics [Internet]. 2021. [citado el 15 de febrero de 2023]; 13(6):809. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13060809

48. Catalog P. General Catalog [Internet]. Permegear.com. [citado el 10 de marzo de 2023]. Disponible en: https://permegear.com/wp-content/uploads/2018/08/PermeGear-Catalog.pdf
49. Kanfer I, Rath S, Purazi P, Mudyahoto NA. In vitro release testing of semi-solid dosage forms. Dissolution Technol [Internet]. 2017;24(3):52–60. Disponible en: http://dx.doi.org/10.14227/dt240317p52
50. Kocabaş NÖ, Kahraman E, Güngör S. Assessment of membrane type effects on in vitro performance of topical semi-solid products. J Drug Deliv Sci Technol [Internet]. 2021;64(102646):102646. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102646
51. ailas Thakker, Ryan Klein, Chapter 19 - Drug release: topical products, Editor(s): Christopher M. Riley, Thomas W. Rosanske, George Reid, Specification of Drug Substances and Products (Second Edition), Elsevier, 2020, Pages 505-534,
52. <1724> Semisolid Drug Products – Performance Tests. In United States Pharmacopeia and National Formulary USP 41–NF 36; United States Pharmacopeial Convention, Inc.; Rockville, MD, 2018, pp 7944–7956
53. Klein, Ryan R., Jenna L Heckart and Kailas D Thakker. “In Vitro Release Testing Methodology and Variability with the Vertical Diffusion Cell (VDC).” Dissolution Technologies 25 (2018): 52-61.
54. In Vitro Permeation Test Studies for Topical Drug Products Submitted in ANDAs Guidance for Industry.
55. Zambrana PN, Hammell DC, Stinchcomb AL. Advanced harmonization techniques result in accurate establishment of in vitro-in vivo correlations for oxybenzone from four complex dermal formulations with reapplication. Drug Deliv Transl Res [Internet]. 2023. [citado el 14 de febrero de 2023]; 13(1):275–91. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s13346-022-01186-7
56. Tiffner KI, Kanfer I, Augustin T, Raml R, Raney SG, Sinner F. A comprehensive approach to qualify and validate the essential parameters of an in vitro release test (IVRT) method for acyclovir cream, 5%. Int J Pharm [Internet]. 2018. [citado el 14 de febrero de 2023]; 535(1–2):217–27. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.049

57. Gorog S. Ultraviolet-Visible Spectrophotometry in Pharmaceutical Analysis. Londres, Inglaterra: Routledge; 2018.
58. Pedersen-Bjergaard S, Gammelgaard B, Halvorsen TG. Introduction to pharmaceutical analytical chemistry. 2a ed. Standards Information Network; 2019.
59. Vernier.com. [citado el 14 de febrero de 2023]. Disponible en: https://www.vernier.com/files/misc/vernier_whitepaper.pdf
60. Hasan MK, Hossain MA, Sultana A, Shoeb M, Nahar N. Evaluation of diclofenac by UV-Vis spectrophotometer in some locally produced tablets. Dhaka Univ J Sci [Internet]. 2017. [citado el 14 de febrero de 2023]; 65(2):163–5. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3329/dujs.v65i2.54525
61. Souto EB, Fangueiro JF, Fernandes AR, Cano A, Sanchez-Lopez E, Garcia ML, et al. Physicochemical and biopharmaceutical aspects influencing skin permeation and role of SLN and NLC for skin drug delivery. Heliyon [Internet]. 2022. [citado el 14 de febrero de 2023]; 8(2):e08938. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08938
62. Kolarsick, P., Kolarsick, M. y Goodwin, C. Anatomy and Physiology of the Skin. J Dermatol Nurses Assoc. [Internet]. 2011. [citado el 17 de febrero de 2023]; 3 (4). 203 – 213. Disponible en:
63. Strati F, Neubert RHH, Opálka L, Kerth A, Brezesinski G. Non-ionic surfactants as innovative skin penetration enhancers: insight in the mechanism of interaction with simple 2D stratum corneum model system. Eur J Pharm Sci [Internet]. 2021. [citado el 17 de febrero de 2023]; 157(105620):105620. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105620
64. Calcutt JJ, Roberts MS, Anissimov YG. Modeling drug transport within the viable skin - a review. Expert Opin Drug Metab Toxicol [Internet]. 2021. [citado el 17 de febrero de 2023]; 17(1):105–19. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/17425255.2020.1832081
65. Ruela ALM, Perissinato AG, Lino ME de S, Mudrik PS, Pereira GR. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. Braz J Pharm Sci [Internet]. 2016. [citado el 17 de febrero de 2023]. 52(3):527–44. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1590/s1984-82502016000300018

66. Debjit Bhowmik, Harish Gopinath, B. Pragati Kumar, S.Duraivel, K.P.Sampath Kumar. Recent Advances In Novel Topical Drug Delivery System. Pharm Innov 2012. [citado el 18 de febrero de 2023]; 1(9):12-31.
67. Yu Y-Q, Yang X, Wu X-F, Fan Y-B. Enhancing permeation of drug molecules across the skin via delivery in nanocarriers: Novel strategies for effective transdermal applications. Front Bioeng Biotechnol [Internet]. 2021. [citado el 18 de febrero de 2023]; 9:646554. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2021.646554
68. Iyer A, Jyothi VGSS, Agrawal A, Khatri DK, Srivastava S, Singh SB, et al. Does skin permeation kinetics influence efficacy of topical dermal drug delivery system?: Assessment, prediction, utilization, and integration of chitosan biomacromolecule for augmenting topical dermal drug delivery in skin. J Adv Pharm Technol Res [Internet]. 2021. [citado el 18 de febrero de 2023]; 12(4):345–55. Disponible en: http://dx.doi.org/10.4103/japtr.japtr_82_21
69. Laracuente M-L, Yu MH, McHugh KJ. Zero-order drug delivery: State of the art and future prospects. J Control Release [Internet]. 2020. [citado el 2 de marzo de 2023]; 327:834–56. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.020
70. Shehata TM, Ibrahim MM, Elsewedy HS. Curcumin niosomes prepared from proniosomal gels: In vitro skin permeability, kinetic and in vivo studies. Polymers (Basel) [Internet]. 2021. [citado el 2 de marzo de 2023];13(5). Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/polym13050791
71. Wojcik-Pastuszka D, Krzak J, Macikowski B, Berkowski R, Osiński B, Musiał W. Evaluation of the release kinetics of a pharmacologically active substance from model intra-articular implants replacing the cruciate ligaments of the knee. Materials (Basel) [Internet]. 2019. [citado el 2 de marzo de 2023] ;12(8):1202. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/ma12081202
72. Elmas A, Akyuz G, Bergal A, Andac M, Andac O. Mathematical Modelling of Drug Release. Res. Eng. Struct. Mater., 2020; 6(4): 327-350.
73. Rath S, Kanfer I. A validated IVRT method to assess topical creams containing metronidazole using a novel approach. Pharmaceutics [Internet]. 2020. [citado el 2 de marzo de 2023]; 12(2):119. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics12020119

74. Washitake M, Takashima Y, Tanaka S, Anmo T, Tanaka I. Drug permeation through eggshell membranes. Chem Pharm Bull (Tokyo) [Internet]. 1980. [citado el 2 de marzo de 2023] ;28(10):2855–61. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1248/cpb.28.2855
75. Lathiyare, K.M., Suresh, P.K. y Jain, V. Development and In Vitro Characterization of Piroxicam Loaded Emulgel for Topical Delivery. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. [Internet]. 2015. [citado el 14 de marzo de 2023] 2 (3): 19-32.
76. Wangrungroj N, Soontorntepwarakul N, Samattai S, Tangboriboon N. Characteristics on physical-chemical-thermal properties of eggshell membrane for biomaterial applications. Defect Diffus For [Internet]. 2018. [citado el 14 de marzo de 2023] ;382:342–6.
77. Marimuthu, C., Chandrasekar, P., Murugan, J., Perumal K. y Marimuthu, I. Bioactive Molecule Composition of Natural Egg Membrane Concentrate (NEMCTM) vs. Soluble Egg Membrane (SEM). [Internet]. Int. j. biotechnol. biochem. 2020. [citado el 14 de marzo de 2023]; 16 (1): 25-44.
78. Han C, Chen Y, Shi L, Chen H, Li L, Ning Z, et al. Advances in eggshell membrane separation and solubilization technologies. Front Vet Sci [Internet]. 2023. [citado el 18 de marzo de 2023]; ;10:1116126. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2023.1116126.
79. Hasebe Y. Manufacturing Method of Batch Eggshell Membranes and Manufacturing Method of Egg-Related Product Groups. JP Patent NO 2019004412. Tokyo, TKY: Japanese Patent Office; (2020).
80. Kulshreshtha G, Diep T, Hudson H-A, Hincke MT. High value applications and current commercial market for eggshell membranes and derived bioactives. Food Chem [Internet]. 2022. [citado el 1 de abril de 2023]; 382(132270):132270. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132270
81. Pasarin D, Rovinaru C. Separation methods of the eggshell membranes from eggshell. Proc (MPDI) [Internet]. 2019. [citado el 3 de abril de 2023]; 29(1):122. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/proceedings2019029122
82. Köse MD, Bayraktar O. Natural bioactive compounds loaded eggshell membrane from waste food industry: Preparation and characterization. Current Nutrac [Internet].

2021. [citado el 3 de abril de 2023]; 2(2):106–16. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2174/2665978601999200727103101

83. Joshi R, Baek I, Joshi R, Kim MS, Cho B-K. Detection of fabricated eggs using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy coupled with multivariate classification techniques. Infrared Phys Technol [Internet]. 2022. [citado el 3 de abril de 2023]; 123(104163):104163. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.infrared.2022.104163
84. Mensah RA, Jo SB, Kim H, Park S-M, Patel KD, Cho KJ, et al. The eggshell membrane: A potential biomaterial for corneal wound healing. J Biomater Appl [Internet]. 2021. [citado el 10 de abril de 2023]; 36(5):912–29. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1177/08853282211024040
85. Tsai WT, Yang JM, Lai CW, Cheng YH, Lin CC, Yeh CW. Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. Bioresour Technol [Internet]. 2016. [citado el 10 de abril de 2023]; 97(3):488–93. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.050
86. Mohammed, Besma & Hameed, Tamarah & Ali, Nisreen. (2017). The Influence of Eggshell Particle Sizes on the Adsorption of Organic Dye.
87. Guo X, Wang J. Comparison of linearization methods for modeling the Langmuir adsorption isotherm. J Mol Liq [Internet]. 2019. [citado el 10 de abril de 2023]; 296(111850):111850. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111850
88. Debnath S, Das R. Strong adsorption of CV dye by Ni ferrite nanoparticles for wastewater purification: Fits well the pseudo second order kinetic and Freundlich isotherm model. Ceram Int [Internet]. 2023; citado el 10 de abril de 2023]; 49(10):16199–215. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.01.218
89. Ñaupas-Paitán, H., Mejía-Mejía, E. y Novoa-Ramírez, E. Metodología de la investigación cuantitativa-cualitativa y redacción de la tesis. (4a. ed.). Ediciones de la U. 2016.
90. Gallardo E. y Eliana,E. Metodología de Investigación. Huancayo: Universidad Continental, 2017.
91. Galarza, C. Los alcances de una investigación. CienciAmérica. 2020. 9. 1. 10.33210/ca.v9i3.336.

92. Campos, J. Cómo hacer un trabajo final de graduación: lineamientos para la escuela de Ciencias de la Educación. 2015. EUNED

93. Arias J, Villasís M, Miranda M. El protocolo de investigación III: la población de estudio. Rev Alerg Méx [internet]. 2016 [citado el 16 de abril de 2023]]; 63(2): 201-206. Disponible en https://pdfs.semanticscholar.org/05a0/92b010acf9756ec0e800749bbe868c4e68f7.pdf

94. Mella M, Zamora P, Mella M, Ballester J, Uceda P. Niveles de Evidencia Clínica y Grados de Recomendación. Rev. S. And. Traum. y Ort. [internet]. 2012. [citado el 16 de abril de 2023]; 29(2): 59-72. Disponible en: https://www.repositoriosalud.es/bitstream/10668/1568/6/Mella_Niveles.pdf

95. Espinos, F., Eudaldo E. Las variables y su operacionalización en la investigación educativa. Segunda parte. Conrado[online]. 2019. [citado el 16 de abril de 2023], vol.15, n.69, pp.171-180. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1990-86442019000400171&lng=es&nrm=iso>.

96. Molarity of concentrated acids & bases [Internet]. Nestgrp.com. [citado el 16 de abril de 2023]. Disponible en: https://www.nestgrp.com/protocols/trng/molarity.shtml

97. Wu T, Yang G, Cao J, Xu Z, Jiang X. Activation and adsorption mechanisms of methylene blue removal by porous biochar adsorbent derived from eggshell membrane. Chem Eng Res Des [Internet]. 2022. [citado el 12 de junio de 2023]; 188:330–41. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2022.08.042

98. Katakam LNR, Katari NK. Development of in-vitro release testing method for permethrin cream formulation using Franz Vertical Diffusion Cell apparatus by HPLC. Talanta Open [Internet]. 2021. [citado el 12 de junio de 2023]; 4(100056):100056. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.talo.2021.100056

99. Franz Cells [Internet]. Technovalue.in. [citado el 12 de junio de 2023]. Disponible en: https://www.technovalue.in/ProductDetails/Franz%20Cells/3857

100. Maanvizhi S, Iyyappan V, Bhavishi PG. In-vitro release study of Diclofenac sodium from topical gel formulations using diffusion cell. Res J Pharm Technol..

2020. [citado el 29 de junio de 2023]; 13(6):2901. Disponible en: 10.5958/0974-360X.2020.00517

101. Talat M, Zaman M, Khan R, Jamshaid M, Akhtar M, Mirza AZ. Emulgel: an effective drug delivery system. Drug Dev Ind Pharm [Internet]. 2021. [citado el 29 de junio de 2023]; 47(8):1193–9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2021.1993889

102. Miranda M, Veloso C, Brown M, C Pais AAC, Cardoso C, Vitorino C. Topical bioequivalence: Experimental and regulatory considerations following formulation complexity. Int J Pharm [Internet]. 2022. [citado el 28 de junio de 2023];620(121705):121705. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121705

103. Suhail M, Wu P-C, Minhas MU. Using carbomer-based hydrogels for control the release rate of diclofenac sodium: Preparation and in vitro evaluation. Pharmaceuticals (Basel) [Internet]. 2020. [citado el 29 de junio de 2023]; 13(11):399. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/ph13110399

104. 5 - Mathematical models of drug release, Editores: Marcos Luciano Bruschi, Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems, Woodhead Publishing, 2015, Pages 63-86,

105. Manian M, Jain P, Vora D, Banga AK. Formulation and evaluation of the in vitro performance of topical dermatological products containing diclofenac sodium. Pharmaceutics [Internet]. 2022. [citado el 29 de junio de 2023]; 14(9):1892. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics14091892

106. Nonsterile Semisolid Dosage Forms. Guidance for Industry [Internet]. Fda.gov. [citado el 29 de junio de 2023]. Disponible en: https://www.fda.gov/media/71141/download

CAPITULO VII: ANEXOS

Anexo 1. Clasificación de artículos consultados según su nivel de evidencia

Autor/revista/ año	Ref	Título del artículo	Tipo de estudio	Nivel de evidencia	Población	Metodología	Resultado y conclusiones
Pradal J, Vallet CM, Frappin G, Bariguian F, Lombardi MS/ J Pain Res/ 2019	36	Importance of the formulation in the skin delivery of topical diclofenac: not all topical diclofenac formulations are the same	Revisión sistemática de estudios observacionales	3	Se evaluaron dos productos con diclofenaco dietilamonio de concentraciones diferentes	La permeabilidad en piel de la emulsión de diclofenaco DEA al 1,16 % y del gel de diclofenaco Na al 5 % se comparó in vitro usando celdas de difusión de Franz luego de una dosis única fija de 10 mg/cm2 del producto aplicada a un área de 0,64 cm2 de la superficie del estrato córneo de muestras de piel humana ex vivo.	La emulsión de diclofenaco DEA al 1,16 % exhibió una mayor penetración estadísticamente significativa a través de la piel humana a las 24 horas que el gel de diclofenaco Na al 5 %.
Klein, Ryan R., Jenna L Heckart and Kailas D Thakker/ Dissolution	53	In Vitro Release Testing Methodology and Variability with the Vertical	Revisión bibliográfica	5	El propósito de este manuscrito es examinar	Revisión bibliográfica de los parámetros de celdas de difusión vertical	Hay varios factores que contribuyen a la variabilidad general observada en los datos IVRT. El equipo actual utilizado para realizar estudios IVRT requiere una

Techonologies/ 2018		Diffusion Cell (VDC)			los parámetros críticos del aparato VDC y los métodos que se desarrollan		participación humana considerable, particularmente durante la aplicación de la muestra y la extracción de la muestra, lo que hace que los datos sean vulnerables a errores experimentales.
Iyer A, Jyothi VGSS, Agrawal A, Khatri DK, Srivastava S, Singh SB/ J Adv Pharm Technol Res/ 2021	68	Does skin permeation kinetics influence efficacy of topical dermal drug delivery system?: Assessment, prediction, utilization, and integration of chitosan biomacromolecule for augmenting topical dermal drug delivery in skin	Revisión bibliográfica	5		Revisión bibliográfica de las ecuaciones cinéticas, acoplamiento in silico, la evaluación y predicción del comportamiento de penetración de la terapia tópica a través de la forma de dosificación dérmica.	La cinética de permeación de la piel se puede evaluar utilizando varios métodos, entre los cuales el FDC es el más utilizado. Se utilizan modelos matemáticos como los de orden cero, primer orden, Hixson-Crowell, Higuchi y Korsmeyer-Peppas para calcular la cinética de liberación del fármaco.

Rath S, Kanfer I/ Pharmaceutics/ 2020	73	A validated IVRT method to assess topical creams containing metronidazole using a novel approach	Estudios transversales	4	Estudio comparativo entre productos piloto y referencia	Se utilizó un enfoque novedoso para demostrar la idoneidad del método IVRT para evaluar con precisión la "similitud" entre los productos tópicos y para confirmar que la metodología aplicada también posee el poder discriminatorio necesario para detectar diferencias, en caso de que existan tales diferencias entre productos.	Se comparó una crema de metronidazol (MTZ) al 0,75% con la referencia, Metrocreme®, MTZ al 0,75%. Además, la inclusión de controles positivos y negativos fue un enfoque novedoso para demostrar el poder discriminatorio del método IVRT.
Lathiyare, K.M., Suresh, P.K. y Jain, V/ Int J Pharm Sci/ 2015	75	Development and In Vitro Characterization of Piroxicam Loaded Emulgel for Topical Delivery	Revisión sistemática de estudios observacionales	3	Formulación emulgel de piroxicam	Estudio de desarrollo de una formulación emulgel de piroxicam, utilizando metilcelulosa (MC) como agente gelificante.	Se encontró que la formulación era eficiente con buena apariencia física, esparcibilidad, porcentaje de contenido de fármaco y perfil de liberación.
Joshi R, Baek I, Joshi R, Kim MS, Cho B-K/ Infrared Phys Technol/ 2022	83	Detection of fabricated eggs using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy coupled with multivariate	Estudio de caso	4	Análisis FTIR en huevos seleccionados	En este estudio, se realizaron análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y análisis de componentes principales (PCA) para interpretar los datos espectrales FT-IR	Este estudio demuestra que la espectroscopia FT-IR combinada con modelos multivariados se puede utilizar potencialmente como un método eficaz para detectar los componentes internos y de

		classification techniques				relacionados con la composición química de los huevos fabricados.	superficie de los huevos fabricados.
Mensah RA, Jo SB, Kim H, Park S-M, Patel KD, Cho KJ/ J Biomater Appl/ 2021	84	The eggshell membrane: A potential biomaterial for corneal wound healing.	Estudios transversales	4		El objetivo de esta investigación fue identificar y optimizar un protocolo de extracción reproducible del ESM y evaluar las propiedades físicas, químicas, mecánicas y biológicas del sustrato.	La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) reveló que el método de extracción (ácido acético y EDTA) no alteró las estructuras químicas del ESM y también aclaró la composición de las proteínas fibrosas del ESM.
Guo X, Wang J/ J Mol Liq/ 2019	87	Comparison of linearization methods for modeling the Langmuir adsorption isotherm	Estudios transversales	4		En este trabajo se comparó la aplicabilidad y precisión de cuatro métodos de linealización de la isoterma de Langmuir	Los resultados mostraron que Langmuir-1 (Ce/qe-Ce) y Langmuir-4 (qe/Ce-qe) siguieron la suposición para todas las condiciones evaluadas, mientras que Langmuir-3 (qe-qe/Ce) violaron la suposición para todas las condiciones.
Debnath S, Das R/ Ceram Int/ 2023	88	Strong adsorption of CV dye by Ni ferrite nanoparticles for wastewater purification: Fits well the pseudo second order	Estudio de caso	4		Este trabajo se centra en la eliminación del colorante cristal violeta (CV) del agua mediante el uso de nanopartículas de ferrita de níquel (NiF-NP) esféricas y cristalinas preparadas que tienen una fase de	Se observa que los datos encajan bien en el modelo de isoterma de Freundlich ya que el valor del coeficiente de correlación (R2) es 0,985, lo que indica la formación de una cobertura multicapa sobre la superficie de las nanopartículas de NiF.

		kinetic and Freundlich isotherm model				espinela cúbica con un tamaño promedio de 28 nm.	
Wu T, Yang G, Cao J, Xu Z, Jiang X/ Chem Eng Res Des/ 2022	97	Activation and adsorption mechanisms of methylene blue removal by porous biochar adsorbent derived from eggshell membrane	Estudios transversales	4		La adsorción de azul de metileno en biocarbón (CESM-KH) se llevó a cabo en un proceso por lotes para estudiar los efectos del pH de la solución, la dosis de adsorbente, la temperatura y el tiempo de adsorción.	El biocarbón poroso tenía una buena afinidad con el azul de metileno y la capacidad de adsorción alcanzó los 110,38 mg·g−1 a pH = 9. El modelo de isoterma de adsorción es consistente con el modelo de adsorción de Langmuir
Katakam LNR, Katari NK/ Talanta Open/ 2021	98	Development of in-vitro release testing method for permethrin cream formulation using Franz Vertical Diffusion Cell apparatus by HPLC	Estudios transversales	4		La importancia del estudio de liberación in vitro es evaluar la igualdad Q1/Q2 de la formulación, donde se demuestra que los productos de prueba y de referencia son cualitativa y cuantitativamente iguales.	Los resultados prácticos de IVRT para las doce celdas de difusión de muestras de productos farmacéuticos diferentes para la muestra de prueba y de referencia se evaluaron con esta metodología y se encontró que el factor de similitud (f2 es 100 cuando la diferencia entre la formulación de referencia y la de prueba es cero y el valor de % de liberación es la unidad) ser superior al 50%
Talat M, Zaman M, Khan R, Jamshaid M,	101	Emulgel: an effective drug delivery system	Revisión bibliográfica			El objetivo de esta revisión es arrojar luz sobre la preparación de emulgeles y su	Los emulgeles son fácilmente removibles, untables, tixotrópicos, sin grasa, tienen una apariencia agradable,

Akhtar M, Mirza AZ/ Drug Dev Ind Pharm/ 2021						evaluación, lo que permitirá concluir la importancia de estas formas farmacéuticas.	emolientes, de larga duración y transparentes.
Miranda M, Veloso C, Brown M, C Pais AAC, Cardoso C, Vitorino C/ Int J Pharm/ 2020	102	Topical bioequivalence: Experimental and regulatory considerations following formulation complexity	Revisión sistemática de estudios observacionales	3		El propósito de este estudio es seguir esta estrategia utilizando dos escenarios opuestos: una formulación de gel de 1 mg/g de maleato de dimetindeno simple y una emulgel de diclofenaco dietilamonio de 23,2 mg/g, lo que representa una fórmula compleja.	Para la formulación de diclofenaco, tampoco se estableció la equivalencia Q3. La equivalencia Q4 solo se encontró para algunas combinaciones de lotes y al aplicar un criterio de aceptación más amplio (75-133 %)
Suhail M, Wu P-C, Minhas MU/ Pharmaceuticals/ 2020	103	Using carbomer-based hydrogels for control the release rate of diclofenac sodium: Preparation and in vitro evaluation	Revisión sistemática de estudios observacionales	3		Se emplearon varias concentraciones de carbopol, ácido acrílico y dimetacrilato de etilenglicol para la fabricación de hidrogeles Car934-g-poli(ácido acrílico)	Se aplicaron diferentes cinéticas como orden cero, primer orden, el modelo de Higuchi y el modelo de Korsmeyer-Peppas para conocer el mecanismo de orden de liberación de fármacos de los hidrogeles.
Manian M, Jain P, Vora D, Banga AK/ Pharmaceutics/ 2022	105	Formulation and evaluation of the in vitro performance of topical	Revisión sistemática de estudios	3		Las formulaciones (emulsión, emulgel, gel y pomada) se prepararon utilizando excipientes	La tasa media de liberación de la formulación en gel (380,42 ± 3,05 µg/cm2/h0,5) fue estadísticamente mayor en

		dermatological products containing diclofenac sodium. Pharmaceutics	observacionales			convencionales y resultaron ser homogéneas y estables.	comparación con todas las demás formulaciones.

Anexo 2. Datos experimentales prueba de adsorción con azul de metileno

2.1 Datos de curva de calibración de azul de metileno

conc mg L-1	Absorbancias iniciales	Absobancias luego de 2 horas de exposición	m	0,124
1	0,110	0,100	**b**	0,003
2	0,260	0,190	**r2**	0,999
4	0,490	0,430		
6	0,770	0,740		
8	1,000	0,960		
10	1,220	1,100		

2.2 Datos de concentraciones en equilibrio entre azul de metileno y MCH

Co	Ce	Co-Ce	Qe	1/ce	1/qe	Ln Ce	Ln QE
0,865	0,784	0,0809	0,0382	1,28	26,20	-0,15	-3,27
2,078	1,512	0,5664	0,2598	0,66	3,85	0,73	-1,35
3,939	3,454	0,4855	0,2380	0,29	4,20	1,37	-1,44
6,205	5,962	0,2427	0,1226	0,17	8,16	1,83	-2,10
8,066	7,742	0,3237	0,1602	0,13	6,24	2,09	-1,83
9,846	8,875	0,9710	0,4713	0,11	2,12	2,29	-0,75

Anexo 3. Datos experimentales prueba de optimización

3.1 Masas de reactivos usados para el buffer pH 7.0

		mM	MM	Masa
Buffer 7 para un volumen 500	NaCl	1370	58,44	40,03
	KCl	27	74,55	1,01
	NaH2PO4	100	119,98	6,00
	Na2HPO4	18	141,96	1,28

3.2 Datos de absorbancias curvas de calibración día 1 y 2 de diclofenaco sódico

Conc mg/ml	Absorbancia
0,00232	0,087
0,00464	0,200
0,00696	0,290
0,00928	0,395

Conc mg/ml	Absorbancia
0,00510	0,181
0,01021	0,406
0,01531	0,604
0,02552	1,021

Día 1

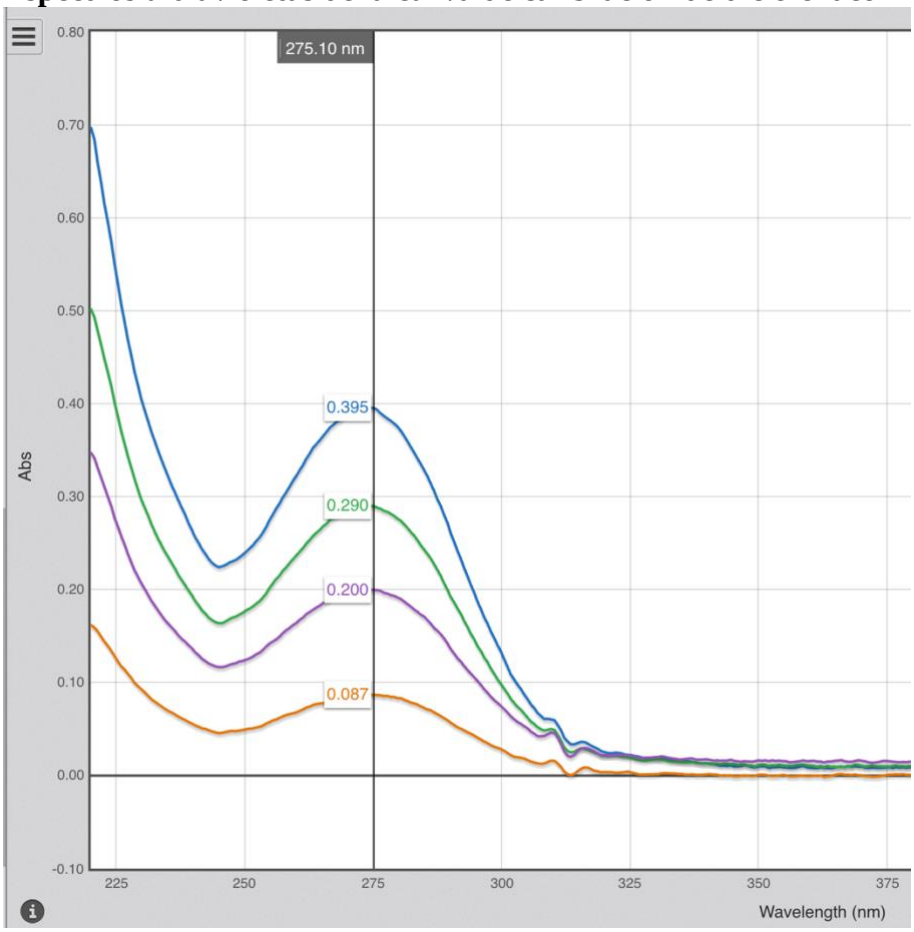
Pendiente	44	-0,01	Intercepto
± pendiente	1	0,01	±1 intercepto
Coef. Determinación	0,998	0,007	

Día 2

Pendiente	40,9	-0,02	Intercepto
± pendiente	0,6	0,01	±1 intercepto
Coef. Determinación	1,000	0,008	

3.3 Bitácora de pruebas realizadas durante la optimización

Espectros ultravioletas de la curva de calibración de diclofenaco



29 de abril

Se utilizan 200 mg de producto y muestrear a los 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4 con emulgel
se preparan 3 muestras con masas cercanas a 0.2 g
la primer muestra a 30 min tiene absorbancia 0.344
la segunda muestra a 45 min no tiene absorbancia
se cancela la prueba

Se realiza pruebas de usar alicuota de 0.5 ml y 1 ml de una solucion que contenia 0.552 g de producto en 25 ml. se obtiene lo siguiente
no hay mucha concordancia de datos de absorbancia
se toma una sola gota de producto sin agregar buffer
no hay resultados positivos

2 de mayo

PRUEBA 1
se preparan 4 muestras con masas cercanas a 0.1 g se muestran a los 15, 30, 1 y 1.5 h

hay dificultades en la determinación de la pesada dado que la membrana se humecta rapidamente con el producto

absorbancias

15 min: 1.19
30 min: 2.00
45 min: 0,26
60 min: 0.95

no hay consistencia en la data obtenida

PRUEBA 2
se procede a probar una solucion de 0.1 aprox de muestra en 25 ml y luego una alicuota de 0.5 ml

se muestra a los
15 min, ABS 0.126
30 min, ABS 0.259
45 min NO HAY LECTURAS
60 min NO HAY LECTURAS

PRUEBA 3
se procede a probar una solucion de 0.1 aprox de muestra en 25 ml, se llena por completo el reservorio receptor.

15 min 0,095
30 min 0.237
45 min 0.220
60 min no hay lectura

no hay consitencia en los datos

Prueba 4

se llena por completo la camara y se toman muestreos a los
30 min 0,271
45 min 0,279
60 min 0,269
90 min 0,467
120 min 0,595
150 min 0,630

180 min 0,641
210 min 0,582
250 min 0,639

3 de mayo

Prueba 1

Se vuelve a replicar la prueba 5 del 2 de Mayo sin embargo hay inconsistencias con las muestras dado a que unas de estas dan absorbancias por arriba de 1 desde los 15 minutos

Prueba 2

Se procede a usar membrana nueva, y se aplica una aplicacion del producto y se distribuye por toda la membrana con ayuda de una espatula

Tiempo	Abs	Abs
15	0,193	0,185
30	0,163	0,135
60	0,275	0,159
90	0.348	0.370
120	0,334	0.287
220	0,512	0,562
255	0,545	0,559

3.4 Datos obtenidos para la determinación de los tiempos de muestreo para las pruebas IVRT

90 minutos

Tiempo	ABS1	ABS2	ABS3	ABS promedio	Conc mcg/mL	Qn
15	0,347	0,318	0,203	0,29	7,591	62
30	0,541	0,260	0,269	0,36	9,237	125
45	0,240	0,448	0,339	0,34	8,886	150
60	0,266	0,367	0,259	0,30	7,786	166
75	0,227	0,445	0,253	0,31	8,055	193
90	0,244	0,360	0,234	0,28	7,346	210

240 minutos

Tiempo	ABS1	ABS2	ABS3	ABS promedio	Conc mcg/mL	Qn
30	0,330	0,184	0,194	0,24	6,287	52
60	0,671	0,387	0,387	0,48	12,292	154
90	0,597	0,389	0,364	0,45	11,518	184
120	0,592	0,299	0,351	0,41	10,638	210
150	0,602	0,373	0,474	0,48	12,325	262
180	0,580	0,487	0,453	0,51	12,903	307

360 minutos

Tiempo	ABS1	ABS2	ABS3	ABS promedio	Conc mcg/mL	Qn
60	0,278	0,364	0,383	0,34	8,870	72
120	0,578	0,444	0,754	0,59	14,989	192
180	0,649	0,611	0,939	0,73	18,436	276
240	0,680	0,655	1,047	0,79	19,927	350
300	0,428	0,757	0,630	0,61	15,307	362
360	0,335	0,393	0,372	0,37	9,481	346

3.5 Datos de curva de calibración de diclofenaco sódico prueba de adsorción

Concentración mg L^{-1}	**Absorbancias iniciales**	**Absobancias luego de 2 horas de exposición**	**m**	0,037
4	0,172	0,155	**b**	0,012
8	0,314	0,292	**r2**	0,999
13	0,475	0,438		
17	0,634	0,587		
21	0,786	0,735		

2.2 Datos de concentraciones en equilibrio entre azul de metileno y MCH

Concentración inicial mg mL^{-1}	**Concentración equilibrio mg mL^{-1} (Ce)**	**Concentración inicial – concentración en equilibrio**	**mg en equilibrio (qe)**	**1/ce**	**1/qe**	**Ln Ce**	**Ln qe**
4,3	3,9	0,46	0,108	0,23	9,25	-1,86	-2,22
8,2	7,6	0,59	0,151	0,12	6,61	-1,23	-1,89
12,5	11,5	1,00	0,242	0,08	4,13	-0,83	-1,42
16,8	15,5	1,27	0,314	0,06	3,19	-0,53	-1,16
20,9	19,5	1,38	0,334	0,05	2,99	-0,31	-1,10

Anexo 4. Datos experimentales prueba de liberación de in vitro de los cuatro productos en estudio

Absorbancias a 275 nm para la determinación de IVRT de Voltaren

#	Tiempo min	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs promedio
1	15	0,166	0,096	0,087	0,079	0,107
2	30	0,434	0,267	0,216	0,189	0,277
3	60	0,490	0,405	0,365	0,284	0,386
4	90	0,504	0,451	0,429	0,344	0,432
5	120	0,579	0,500	0,526	0,476	0,520
6	150	0,569	0,702	0,605	0,515	0,598
7	180	0,537	0,744	0,539	0,493	0,578
8	210	0,496	0,706	0,526	0,489	0,554

Absorbancias a 275 nm para la determinación de IVRT de Astefin

#	Tiempo min	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs promedio
1	15	0,198	0,170	0,205	0,247	0,205
2	30	0,296	0,246	0,302	0,296	0,285
3	60	0,413	0,375	0,339	0,337	0,366
4	90	0,292	0,355	0,376	0,393	0,354
5	120	0,296	0,305	0,293	0,235	0,282
6	150	0,141	0,261	0,278	0,244	0,231
7	180	0,141	0,261	0,278	0,244	0,231
8	210	0,205	0,475	0,278	0,244	0,301

Absorbancias a 275 nm para la determinación de IVRT de Katafenac

#	Tiempo min	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs promedio
1	15	0,190	0,185	0,414	0,208	0,249
2	30	0,440	0,440	0,442	0,508	0,458
3	60	0,524	0,525	0,241	0,442	0,433
4	90	0,443	0,410	0,272	0,350	0,369
5	120	0,325	0,380	0,276	0,234	0,304
6	150	0,251	0,267	0,159	0,154	0,208
7	180	0,182	0,251	0,155	0,084	0,168
8	210	0,184	0,208	0,161	0,052	0,151

Absorbancias a 275 nm para la determinación de IVRT de Diclofedol

#	Tiempo min	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs promedio
1	15	0,327	0,284	0,341	0,540	0,373
2	30	0,202	0,433	0,418	0,409	0,366
3	60	0,449	0,363	0,300	0,465	0,394
4	90	0,467	0,331	0,361	0,432	0,398
5	120	0,362	0,311	0,324	0,399	0,349
6	150	0,359	0,295	0,361	0,314	0,332
7	180	0,298	0,279	0,280	0,322	0,295
8	210	0,237	0,199	0,215	0,244	0,224

Absorbancias a 275 nm para la determinación de IVRT de los cuatro productos usando una sola membrana

#	Tiempo min	Abs Voltaren	Abs Astefin	Abs Katafenac	Abs Diclofedol
1	15	0,266	0,441	0,376	0,139
2	30	0,352	0,382	0,428	0,219
3	60	0,378	0,444	0,455	0,265
4	90	0,464	0,406	0,460	0,405
5	120	0,600	0,408	0,320	0,407
6	150	0,525	0,308	0,270	0,353
7	180	0,500	0,332	0,286	0,358
8	210	0,450	0,328	0,209	0,300