



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS



**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE
NANOETOSOMAS DE INDOMETACINA VEHICULIZADO EN
GEL COMPARADO CON UNA CREMA COMERCIAL**

**TÉSIS PARA OBTENER EL GRADO
ACADÉMICO DE**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
FARMACOBIOLOGICAS**

PRESENTA

ING. MIGUEL RODRÍGUEZ ESPINO

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ TRINIDAD PEREZ URIZAR

CO-DIRECTORA DE TESIS

DRA. PATRICIA AGUIRRE BAÑUELOS

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., ENERO 2024

El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONAHCYT, registro 003382, en el Nivel 1. Número de registro de la beca otorgada por CONAHCYT:807491.



Diseño y caracterización in vitro de nanoetosomas de indometacina vehiculizado en gel comparado con una crema comercial por Rodríguez Espino Miguel se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE NANOETOSOMAS DE INDOMETACINA VEHICULIZADO EN GEL COMPARADO CON UNA CREMA COMERCIAL

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

PRESENTA

ING. MIGUEL RODRÍGUEZ ESPINO

SINODALES

DR. JUAN RAMÓN ZAPATA MORALES

PRESIDENTE

DR. PATRICIA AGUIRRE BAÑUELOS

SINODAL

DR. JOSÉ TRINIDAD PÉREZ URIZAR

SECRETARIO

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., ENERO 2024

Dedicatoria

A mi familia que siempre ha estado conmigo. A mi hermana Mariedna que está estudiando para ser una gran médica, a mi hermano Vicente que le tengo mucha estima, a mi hermano angelito que lo quiero mucho. A mis papás Vicente y Maricarmen por apoyarme a llegar hasta donde estoy. A mis amigos por estar ahí para las convivencias.

A mis abuelos Miguel y Sara que los quiero mucho por todo el apoyo. A mi abuelita socorro y Rafael que les tengo mucha estima. Y a toda mi familia de valle de Santiago que igualmente los aprecio mucho, a Sonia, Rafa y Pau que les tengo mucha estima hasta México. Y a mis padrinos que igualmente me han acompañado todo el tiempo y lo siguen haciendo. ¡A todos Gracias!

A mis directores Dr. José Trinidad Pérez Urizar por permitirme aprender de él, y a la Dra. Paty y Gaby por el apoyo en el laboratorio, e igualmente aprender de ellas. Al Dr. Juan Ramón Zapata por el apoyo desde Guanajuato.

RESUMEN

Para ser efectivos tópicamente, además de presentar una buena potencia antiinflamatoria y analgésica, los AINEs deben tener o ser formulados para presentar características fisicoquímicas que faciliten la penetración cutánea. Los nanoetosomas son sistemas liposomales con un alto contenido de alcohol que mejora la solubilidad, biodistribución y ralentizan la biotransformación de las sustancias activas. El objetivo de este estudio fue desarrollar y caracterizar nanoetosomas que contienen indometacina (IND) para la administración transdérmica del fármaco antiinflamatorio. Utilizamos un diseño experimental estadístico de Taguchi considerando combinaciones de factores/niveles de las variables concentración de lecitina y etanol. Las formulaciones se prepararon para calcular la eficiencia de encapsulación, la potencial zeta, el tamaño de las nanovesículas y el porcentaje de liberación del fármaco después de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas. El tamaño medio de las vesículas para 9 formulaciones osciló entre 158.5 nm y 741.93 nm, mientras que la eficiencia de atrapamiento estuvo entre el 95% y el 98%, y el porcentaje de liberación del fármaco después de 24 horas fue del 90% al 94%. Después de aplicar el proceso de optimización del modelo, se obtuvo una formulación final en la que, al microscopio óptico, los nanoetosomas presentan morfología esférica, distribución uniforme, con características de tamaño de partícula de 158.5 nm, potencial zeta de -55.73 mV y eficiencia de encapsulación del 98.23%. Finalmente se comparó la capacidad de permeación a través de piel con un producto comercial formulado como una crema y se obtuvo un perfil semejante. Se requieren estudios *in vivo* posteriores para determinar si las propiedades anteriores verifican la hipótesis de un efecto farmacológico mejorado con la administración transdérmica de los nEt-IND desarrollados.

Palabras clave: Nanoetosomas, Nanoformulación, Indometacina transdérmica.

ABSTRACT

In order to be effective topically, in addition to presenting good anti-inflammatory and analgesic potency, NSAIDs must have or be formulated to present physicochemical characteristics that facilitate skin penetration. Nanoethosomes are liposomal systems with a high alcohol content that improve solubility, biodistribution and slow down the biotransformation of active substances. The aim of this study was to develop and characterize indomethacin (IND)-containing nanoethosomes for transdermal anti-inflammatory drug delivery. We used a Taguchi statistical experimental design considering a combination of factors/levels of the variables: lecithin and ethanol concentration. The formulations were prepared to calculate the encapsulation efficiency, the zeta potential, the size of the nanovesicles and the percentage of drug release after 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hours. The mean size of the vesicles for 9 formulations ranged from 158.5 nm to 741.93 nm, while the entrapment efficiency was between 95% and 98%, and the percentage of drug release after 24 hours was 90% to 94%. After applying the model optimization process, a final formulation was obtained in which, under an optical microscope, the nanoethosomes present spherical morphology, uniform distribution, with particle size characteristics of 158.5 nm, zeta potential of -55.73 mV, and encapsulation efficiency of 98.23%. Finally, the permeation capacity through the skin was compared with a commercial product formulated as a cream and a similar profile was obtained. Further in vivo studies are required to determine if the above properties verify the hypothesis of an enhanced pharmacological effect with transdermal administration of the developed nEt-INDs.

Key words: Nanoethosomes, Nanoformulation, Transdermal indomethacin.

ABREVIATURAS

- °C: Grados Celsius
- µg: Microgramo
- µL: Microlitro
- AINEs: Antiinflamatorio no esteroideo
- COX: Enzima ciclooxigenasa
- COX1: Ciclooxigenasa 1
- COX2: Ciclooxigenasa 2
- AA: Ácido araquidónico
- C20: Hidrocarburo de 20 carbonos
- PGG2: Prostaglandina G2
- PGI2: Prostaglandina I2
- TXA2: Tromboxano A2
- IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.
- ARA-II: antagonistas del receptor de angiotensina II
- IL-1: Interleucina 1
- IL-2: Interleucina 2
- PM: Peso Molecular
- kDa: kilo Dalton
- Da: Dalton (Unidad de masa atómica]
- IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
- NHGRI: Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano
- DLS: Dispersión de Luz Dinámica
- NET: Nanoetosoma
- Net-IND: Nanoetosomas cargados con indometacina
- PBS: Buffer de fosfatos salino
- min: minutos
- s: segundos
- nm: nanómetro
- mL: mililitro
- mg: miligramo
- mV: milivolts
- Potencial ζ: potencial zeta
- SLF: Sistema de liberación de fármacos

- UA: Unidades de absorbancia
- μm : Micrómetros
- μL : microlitros
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
ABREVIATURAS.....	6
ÍNDICE GENERAL	8
1 INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 GENERALIDADES	13
1.2 UTILIDAD DE LOS AINEs	16
1.2.1 MECANISMO DE ACCIÓN.....	17
1.3 LIMITACIONES DEL USO DE AINEs POR VÍA ORAL.....	19
1.4 INDOMETACINA: GENERALIDADES	20
1.4.1 FORMAS FARMACÉUTICAS DE LA INDOMETACINA.....	22
1.4.2 USO TÓPICO DE AINEs (INDOMETACINA).....	23
2 ANTECEDENTES	24
2.1 NANOSISTEMAS DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS Y LIBERACIÓN DE AINEs	24
2.2 NANOLIPOSOMAS	25
2.3 NANOLIPOSOMAS CONTENIENDO ETANOL.....	27
2.3.1 MÉTODOS PARA EL AUTOENSAMBLAJE DE NANOETOSOMAS	31
2.4 PROPIEDADES CRÍTICAS DE LAS NANOFORMULACIONES.....	34
2.4.1 POTENCIAL ZETA	34
2.4.2 TAMAÑO DE PARTÍCULA	36
3 JUSTIFICACIÓN	38

4	HIPÓTESIS	38
5	OBJETIVO GENERALREAL	39
6	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
7	MATERIALES Y MÉTODOS	40
7.1	<i>METODOLOGÍA PARA LA PREPARACIÓN DE NANOETOSOMAS MEDIANTE EL MÉTODO FRÍO</i>	40
7.2	<i>DISEÑO DEL EXPERIMENTO PARA LA SELECCIÓN DE LA MEJOR FORMULACIÓN</i>	42
7.3	<i>CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LOS NANOETOSOMAS</i>	43
7.3.1	TAMAÑO DE PARTÍCULA POR DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS].....	43
7.3.2	POTENCIAL ZETA:	44
7.3.3	MORFOLOGÍA POR MICROSCOPIA ÓPTICA	44
7.3.4	CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INDOMETACINA EN LAS MUESTRAS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.....	44
7.3.5	EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN	46
7.3.6	EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN <i>IN-VITRO</i> EN MEMBRANA DE DIÁLISIS	47
7.3.7	SELECCIÓN DE LA MEJOR FORMULACIÓN Y VEHICULIZACIÓN EN GEL.....	48
7.3.8	COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PERMEACIÓN DE LA FORMULACIÓN NET-IND VERSUS PRODUCTO COMERCIAL	48
8	RESULTADOS.....	50
8.1	<i>DISEÑO DE EXPERIMENTOS</i>	50
8.2	<i>MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE INDOMETACINA</i>	55
8.3	<i>PREPARACIÓN DE LA FORMULACIÓN FINAL EN GEL</i>	58
8.4	<i>EVALUACIÓN DE EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN</i>	60
8.5	<i>EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN IN-VITRO EN MEMBRANA DE DIÁLISIS</i>	62
8.5.1	LIBERACIÓN DE IND EN TÉRMINOS DE CONCENTRACIÓN	62
8.5.2	RESULTADOS DE LIBERACIÓN EN TERMINOS DE % DE LIBERACIÓN	65

8.6	COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE LIBERACIÓN MEDIANTE PRUEBA ESTADÍSTICA ANOVA DE UN FACTOR.....	68
8.7	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PERMEACIÓN IN-VITRO.....	69
8.8	VISTA AL MICROSCOPIO ÓPTICO	74
9	DISCUSIÓN	76
10	CONCLUSIONES.....	81
11	REFERENCIAS.....	83
12	PRODUCTOS GENERADOS.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las capas de la piel [Yousef et al., 2022].	14
Figura 2. Modelo ladrillo cemento.	15
Figura 3. Proceso de formación del ácido araquidónico (AA).	17
Figura 4. Esquema del mecanismo de acción de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) [Gillman y Goodman, 2018].	18
Figura 5. Estructura química de Indometacina.	20
Figura 6. Tipos de nanoestructuras lipídicas [Paiva-Santos et al., 2021a].	27
Figura 8. Esquema por secuencia para la preparación de nanoetosomas en frío.	33
Figura 9. Modelo de la doble capa de Helmholtz [Rosen & Kunjappu, 2018].	35
Figura 10. Esquema preparación de nanoetosomas de IND por el método frío.	41
Figura 11. Esquema resumen evaluación de eficiencia de encapsulación.	46
Figura 12. Esquema de los procesos realizados para la evaluación de la liberación <i>in-vitro</i> a través de membrana de diálisis.	47
Figura 13. Formulaciones de nanoetosomas obtenidas. Nanoetosomas del 1 al 9 en ese orden y al último la formulación control (nanoetosoma sin IND).	51
Figura 14. Gráfico de diseño Taguchi, efectos principales para medias en función tamaño (nm).	52
Figura 15. Gráfico de diseño Taguchi, efectos principales para medias en función de potencial zeta (mV).	52
Figura 16. Gráfica de superficie de tamaño (nm) vs porcentajes de leciticina y etanol.	53
Figura 17. Gráfica de superficie de potencial zeta (mV) vs porcentajes de leciticina y etanol.	54
Figura 18. Perfil de elusión correspondiente a curva de calibración de IND.	56
Figura 19. Curva de calibración y ecuación de la recta para IND $Y=3.50e^{+004}X-1.42e^{+005}$.	57
Figura 20. Aspecto del gel desde dos vistas.	58
Figura 21. Productos obtenidos, imágenes de formulación final en gel Net- IND.	59
Figura 22. Esquema resumen evaluación de eficiencia de encapsulación.	60
Figura 23. Perfil de liberación de indometacina de nanoetosomas en términos de concentración acumulativa de fármaco liberado en $\mu\text{g/mL}$ contra el tiempo en horas.	62
Figura 24. Gráficas aproximación a datos de liberación para 9 formulaciones por distintos métodos.	64

Figura 25. Gráfica de porcentaje de liberación contra tiempo en horas.	66
Figura 26. Celda de difusión tipo Franz.....	69
Figura 27. Gráfica comparativa del perfil de permeación de NeT-IND vs perfil de permeación de Indaflex®.....	70
Figura 28. Gráfica comparativa del perfil de % permeación de NeT-IND vs % de permeación de Indaflex®.	71
Figura 29. Vista al microscopio óptico (40X) de nanoetosomas sin IND.	74
Figura 30. Vista al microscopio óptico (40X) de nanoetosomas con IND.	75
Figura 31. Vista al microscopio óptico (40X) de la formulación comercial.	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades Fisicoquímicas de la Indometacina.....	20
Tabla 2. Información de la farmacocinética de Indometacina.....	22
Tabla 3. Ventajas de liposomas SUV- vesículas unilaminares pequeñas y LUV- vesículas unilaminares largas [Chavarría Rojas et al., 2022].	26
Tabla 4. Tabla comparativa entre liposomas y etosomas.....	28
Tabla 5. Valores de referencia del potencial electrocinético [Rosen & Kunjappu, 2018]	36
Tabla 6. Matriz de Taguchi para el diseño optimizado de la formulación.	43
Tabla 7. Concentraciones y volúmenes para curva de calibración.....	45
Tabla 8. Matriz de Taguchi.....	50
Tabla 9. Composición de formulaciones de nanoetosomas.	55
Tabla 10. Eficiencia de encapsulación.	61
Tabla 11. Tabla que agrupa resultados de combinación Taguchi, %EE, potencial zeta y tamaño de partícula.	67
Tabla 12. Constantes de Permeación a 1, 2, 3, 4, 6, 8,14, 16, 24 horas de muestreo para experimento de Franz.	72
Tabla 13. Flujo (J) en ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$) para la formulación final en gel seleccionada (por triplicado) y para Indaflex® igualmente por triplicado.....	72

1 INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

Actualmente las vías de administración de fármacos oral e intravenosa se erigen como las más convencionales y extendidas en la práctica clínica y terapéutica. Sin embargo, a lo largo de las últimas décadas, el ámbito de la investigación farmacológica ha experimentado una significativa transformación, enfocándose con creciente interés en la modalidad de administración tópica de agentes farmacológicos. Este enfoque ha sido motivado por la inherente versatilidad que ofrece este método, sumado a su facilidad de aplicación y la amplia superficie de exposición que proporciona, lo que conlleva a un potencial campo de desarrollo de gran relevancia en la farmacoterapia moderna.

Desde esa perspectiva, es importante describir las propiedades de la piel como el sitio de aplicación de fármacos. La piel, constituyente esencial del sistema tegumentario humano, emerge como el órgano preeminente en términos de extensión superficial. Con una superficie aproximada de 400 m² en individuos adultos y un peso de alrededor de 400 g, la piel desempeña un papel fundamental en la protección y regulación del organismo. No obstante, resulta interesante destacar que la anatomía de la piel exhibe variaciones en grosor en distintas áreas del cuerpo, siendo más delgada en regiones como los párpados y notablemente más gruesa en áreas como el talón de los pies.

Las dimensiones dérmicas oscilan entre 2 y 4 mm, confiriendo diversidad morfológica a este órgano que reviste vital importancia para la homeostasis fisiológica. Este fenómeno anatómico adquiere particular relevancia en el contexto de las estrategias de administración tópica de fármacos, donde la piel representa una plataforma de aplicación altamente promisorio para el abordaje de diversas condiciones terapéuticas [MedlinePlus, 2022]. Por su complejidad la piel representa una muy buena barrera para

impedir el paso de sustancias a nuestro organismo. De manera breve es un revestimiento epitelial que se encuentra dividido en 3 capas, partiendo de la más externa a la más profunda: epidermis, dermis e hipodermis [Benedetti, 2021]. La epidermis a su vez se encuentra subdividida en 4 subcapas partiendo de la más interna a la más externa: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso y estrato corneo.

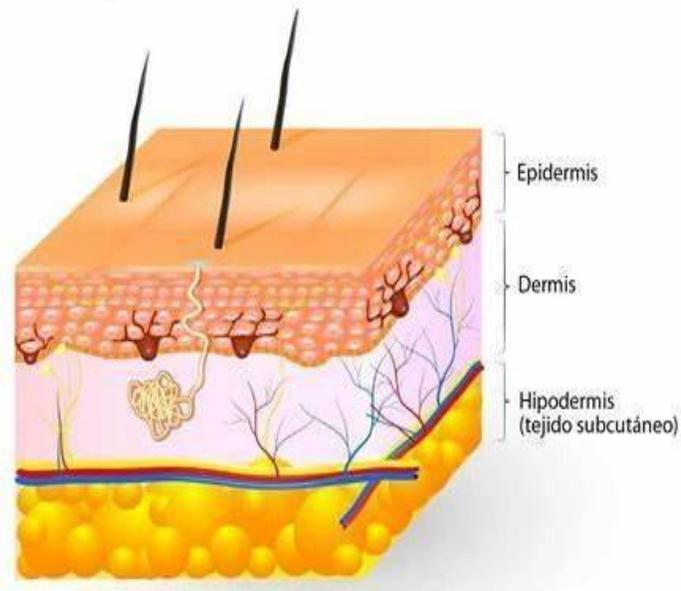


Figura 1. Estructura de las capas de la piel [Yousef et al., 2022].

Esto es importante para el transporte de fármacos, ya que estas barreras cutáneas sirven como protección contra agentes externos: factores físicos, químicos, microbiológicos, mecánicos, por mencionar algunos. La epidermis está conformada principalmente por células muertas, lípidos y queratinocitos, mientras que la hipodermis por tejido adiposo y en la dermis se encuentran fibras de colágeno y elastina [Yousef et al., 2022]. En la Figura 1, se presenta un esquema con las principales capas de la piel y su estructura.

El reconocimiento de las propiedades y funciones de la piel se vuelven de gran relevancia cuando se pretende desarrollar formulaciones basadas en nanotecnología pues deben ser afines con estas capas de la piel y ser capaces de atravesar sus barreras. Por citar alguno, los nanoetosomas formados a partir de fosfolípidos similares a los que se encuentran en la membrana celular, presentan una serie de ventajas: biocompatibles, biodegradables, bioinertes y no inmunogénicos [García-Corvillo, 2016].

A partir de la definición de la piel como “el revestimiento epitelial que cubre la superficie externa de nuestro cuerpo, separándola y protegiéndola del medio ambiente.” Se han planteado modelos que ayudan a visualizar de mejor manera las capas del estrato corneo, por el ejemplo el modelo llamado “brik wall model”, o modelo ladrillo cemento que se muestra en la Figura 2.

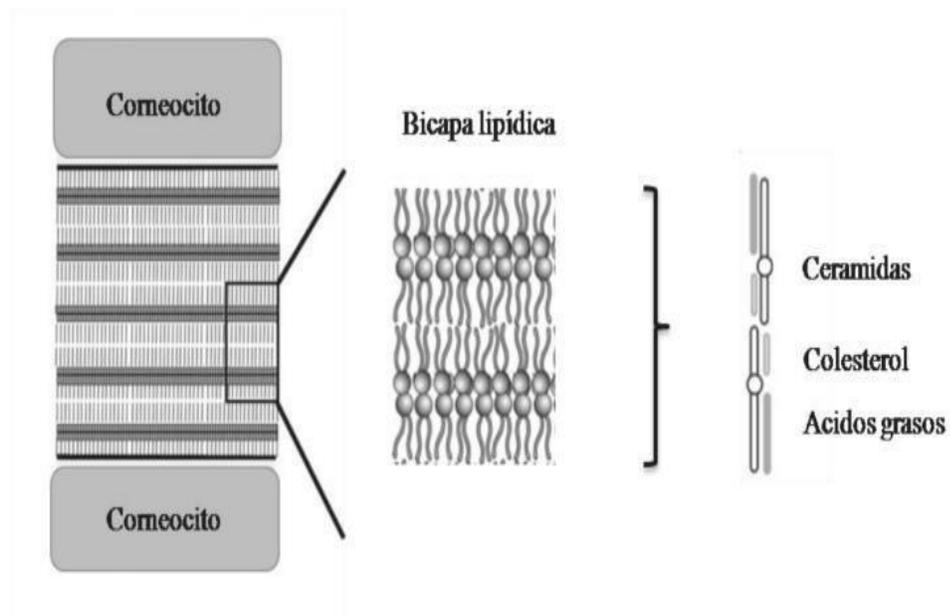


Figura 2. Modelo ladrillo cemento. Representando la estructura del estrato corneo, los corneocitos se muestran en la parte superior e inferior del esquema y su matriz lipídica [Madison, 2003].

En este modelo los ladrillos son los corneocitos y el cemento representa el espacio intercelular de dominios lipídicos. Cabe mencionar que las células más externas están muertas y continuamente se desprenden para renovarse desde abajo, es decir se tiene un flujo constante en el que las células muertas van migrando desde el interior hasta el exterior de la piel.

1.2 FARMACOS ANALGESICOS ANTINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES AINEs

Los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) representan una clase de fármacos con una notable relevancia en el campo terapéutico debido a su capacidad para controlar procesos inflamatorios y aliviar el dolor. Estos agentes farmacológicos desempeñan un papel fundamental en el tratamiento del dolor asociado a una amplia gama de trastornos inflamatorios, incluyendo enfermedades reumáticas, musculoesqueléticas y articulares, como los causados por la artritis reumatoide, la osteoartritis y la gota. Los AINEs también se usan ampliamente en la reducción de signos de inflamación como fiebre, hinchazón y enrojecimiento, así como en problemas de salud temporales como esguinces, dolor de cabeza y dolor menstrual [Brunton et al., 2012].

Los principales fármacos de este tipo son:

- Indometacina
- Aspirina
- Paracetamol
- Diclofenaco
- Ketorolaco
- Ibuprofeno
- Naproxeno
- Ketoprofeno
- Meloxicam
- Ácido Mefanámico

1.2.1 MECANISMO DE ACCIÓN

Los AINEs funcionan bloqueando las enzimas COX1 y COX2, las cuales desempeñan roles clave en la inflamación y el dolor. Estas enzimas difieren en su estructura y comportamiento, pero al inhibirlas, se evita la formación de sustancias llamadas eicosanoides, incluido el ácido araquidónico. Estos eicosanoides interactúan con enzimas y dan lugar a moléculas como prostaglandinas, que están involucradas en procesos inflamatorios, febriles y dolorosos. La inhibición de COX1 y COX2 es la base de los efectos terapéuticos de los AINEs [Katzung y Masters, 2018].

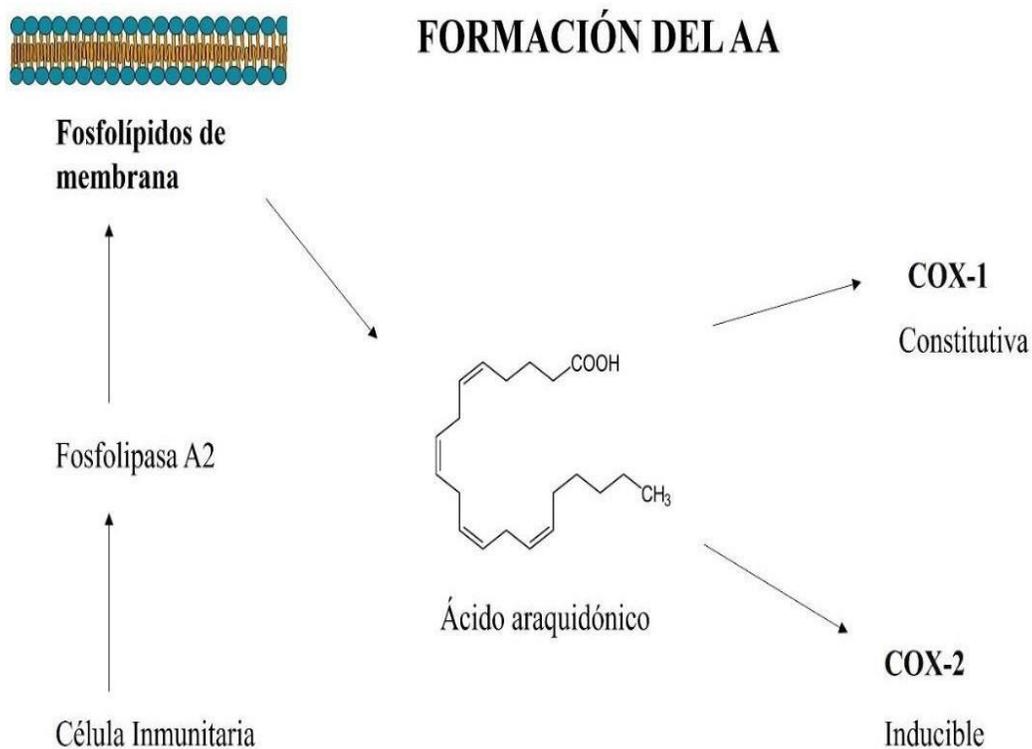


Figura 3. Proceso de formación del ácido araquidónico (AA).

La COX1 es constitutiva en varios tejidos, mientras que la COX2 se activa en respuesta a estímulos específicos. Ambas enzimas participan en procesos inflamatorios y fisiológicos, incluida la protección del sistema digestivo. La inflamación es una respuesta natural ante daños, como infecciones o lesiones. Durante este

proceso, las células inmunes utilizan una enzima llamada fosfolipasa A2 para producir ácido araquidónico a partir de membranas celulares, mediado por células inmunes y endoteliales. La Figura 3 ilustra el proceso de formación del AA desde que es liberado hasta su interacción con COX-1 y COX-2, mientras que en la Figura 4 se aprecia la ruta desde la aparición de un estímulo doloroso hasta la formación de prostaglandinas G2 (PGG2) e I2 (PGI2) y tromboxano A2 (TXA2) y cómo los AINEs inhiben esta producción a través de la inhibición de las enzimas COX1 y COX2. La eficacia, así como los efectos benéficos y adversos de los AINEs dependen en gran medida de su capacidad y selectividad en la inhibición de ambas isoenzimas.

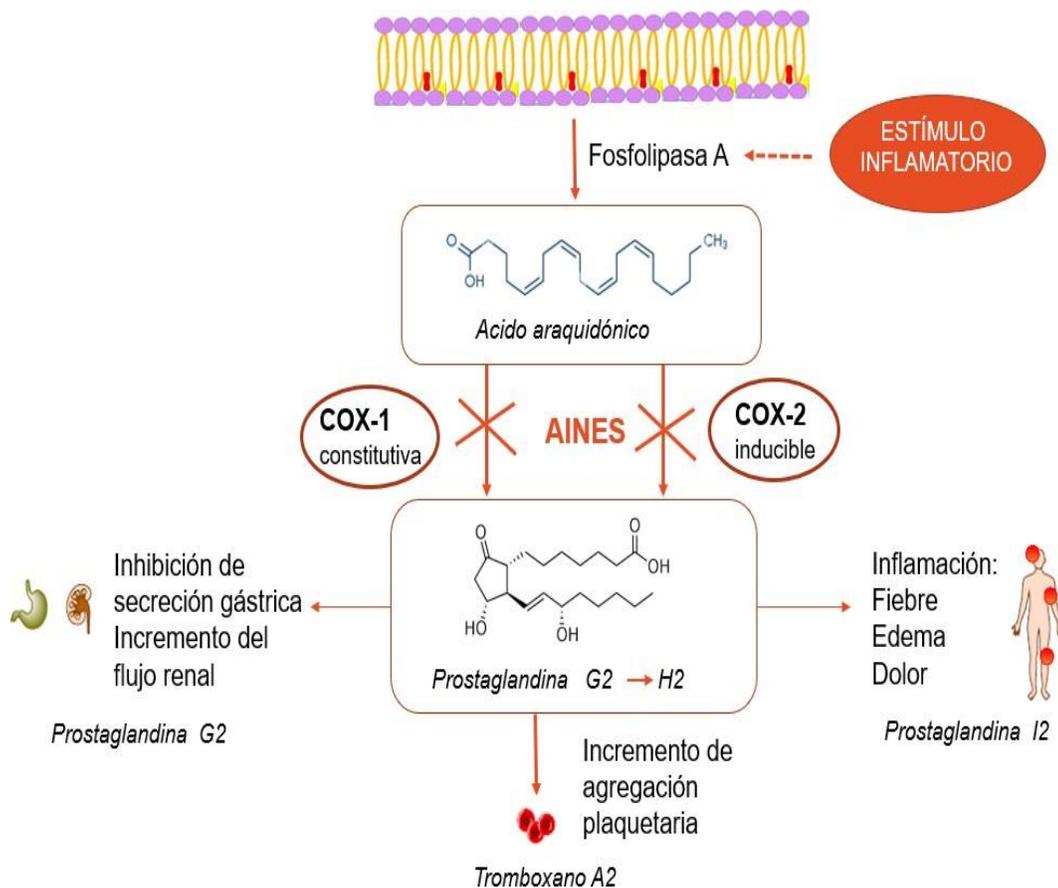


Figura 4. Esquema del mecanismo de acción de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) [Gillman y Goodman, 2018].

1.3 LIMITACIONES DEL USO DE AINEs POR VÍA ORAL

El uso continuo de los AINEs por vía oral presenta limitaciones que es importante tener en cuenta. A continuación, se mencionan algunas de ellas.

1. Efectos adversos gastrointestinales: Los AINEs pueden causar irritación y daño a la mucosa del tracto gastrointestinal, lo que puede provocar úlceras, sangrado y perforación. Estos efectos secundarios son más comunes en personas que tienen antecedentes de úlceras gástricas, enfermedad inflamatoria intestinal u otros trastornos digestivos [Hijos-Mallada et al., 2022].
2. Riesgo cardiovascular: Algunos estudios han asociado el uso prolongado de AINEs con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares, como ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares. Este riesgo puede ser más relevante en personas con factores de riesgo cardiovascular preexistentes, como hipertensión arterial, enfermedad cardíaca o diabetes [Theimer, 2017].
3. Interacciones medicamentosas: Los AINEs pueden interactuar con otros medicamentos, lo que puede aumentar o disminuir su eficacia, así como aumentar el riesgo de efectos secundarios. Por ejemplo, los AINEs pueden disminuir la eficacia de algunos medicamentos para la hipertensión arterial, como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) o los antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA-II) [Martinez, 2021].
4. Nefrotoxicidad: El uso prolongado de AINEs puede afectar la función renal y aumentar el riesgo de insuficiencia renal aguda. Esto es especialmente relevante en personas con enfermedad renal preexistente o en aquellas que están tomando otros medicamentos nefrotóxicos [Martinez, 2021].

1.4 INDOMETACINA: GENERALIDADES

La indometacina (IND) es un fármaco AINEs que se obtiene a partir del indol metilado. Dentro de las propiedades de la IND se puede mencionar que su fórmula química es $C_{19}H_{15}ClO_4$, su nombre de la IUPAC es 2-(1-(4-clorobenzoyl)-5-metoxi-2-metilindol-3-il) ácido acético, tiene un peso molecular de 357.7 g/mol y presenta baja solubilidad en agua. En la Figura 5 se muestra la estructura química de barras de la IND, así como en la Tabla 1 sus propiedades fisicoquímicas.

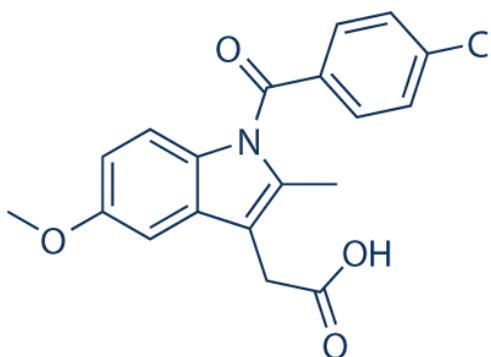


Figura 5. Estructura química de Indometacina.

La indometacina contiene un núcleo indol, que es un sistema bicíclico aromático formado por un anillo de benceno fusionado con un anillo de pirrol. Este núcleo es responsable sus propiedades farmacológicas.

Tabla 1. Propiedades Fisicoquímicas de la Indometacina.

Propiedad	Valor
Peso molecular	357.7 g/mol
Punto de fusión	155-162 °C
pKa	Alrededor de 4.5
Solubilidad en agua	Menor a 1 mg/mL
Solubilidad en etanol	Aproximadamente 10 mg/mL
Solubilidad en cloroformo	Aproximadamente 100 mg/mL

Las indicaciones terapéuticas de la indometacina incluyen el tratamiento del dolor, la inflamación y la rigidez de algunas enfermedades articulares y musculares como osteoartritis moderada a severa, artritis reumatoide moderada a severa, espondilitis anquilosante moderada a severa, bursitis, tendinitis, sinovitis y otras alteraciones musculoesqueléticas agudas, procesos inflamatorios postquirúrgicos, gota aguda y dismenorrea primaria [Brune & Patrignani, 2015].

La indometacina es un inhibidor no selectivo de la COX, lo que significa que afecta tanto a la COX-1 como a la COX-2. Sin embargo, se ha observado que la indometacina tiene una mayor afinidad por la COX-1, lo que resulta en una inhibición más marcada de esta enzima en comparación con la COX-2 [ASHP, 2021]. La inhibición de la COX-1 por la indometacina puede tener efectos adversos, ya que esta enzima desempeña un papel importante en la producción de prostaglandinas que protegen el revestimiento del estómago y regulan la función plaquetaria. Como resultado, la indometacina puede aumentar el riesgo de efectos adversos gastrointestinales, como irritación o úlceras estomacales y formación de coágulos. Lo anterior implica que cuanto menor sea la exposición sistémica a la indometacina, menor será el riesgo de generación de efectos adversos [AEP, 2020].

Las propiedades farmacocinéticas de la indometacina (Tabla 2) incluyen una absorción desde el tracto digestivo rápida y completa. Biodisponibilidad es aproximadamente del 90% tanto para la formulación convencional como para la formulación de liberación sostenida, si bien la absorción es más lenta en este último caso. Por vía rectal, la absorción de la indometacina es aún más rápida que por vía oral, aunque la cantidad absorbida es algo menor. Cuando se administra con antiácidos o con alimentos, las concentraciones plasmáticas son algo menores. La indometacina se une extensamente a las proteínas del plasma (99%). Cruza fácilmente la barrera placentaria y se distribuye en la leche materna, entrando pequeñas cantidades en el sistema nervioso central [Helleberg, 1981].

Tabla 2. Información de la farmacocinética de Indometacina.

Parámetro	Valor
Biodisponibilidad	100%
Unión proteica	70%
Metabolismo	Hepático
Vida media	1-6 h.
Excreción	Renal, biliar

1.4.1 FORMAS FARMACÉUTICAS DE LA INDOMETACINA

La indometacina (IND) está disponible en varias formas farmacéuticas que permiten su administración por diferentes vías. Algunas de las formas más comunes de presentación de la indometacina incluyen:

- **Tabletas y cápsulas:** las tabletas y cápsulas son formulaciones orales sólidas que contienen indometacina en forma de polvo o gránulos. Estas formas de dosificación se administran por vía oral y se absorben a través del tracto gastrointestinal. La dosis común es de 25 mg con una dosis máxima diaria de 200 mg [ASHP, 2021].
- **Supositorios:** los supositorios de indometacina son formulaciones sólidas que se insertan en el recto. Proporcionan una vía alternativa de administración y se utilizan en casos donde la administración oral puede ser difícil o inapropiada. La dosis común es de 100 mg / supositorio con una dosis máxima diaria de 200 mg [ASHP, 2021].
- **Soluciones inyectables:** la indometacina también puede formularse en soluciones inyectables para administración intravenosa o intramuscular. Estas formas de dosificación permiten una rápida absorción y acción del fármaco [ASHP, 2021].
- **Formulaciones tópicas:** además de las formas de administración

mencionadas anteriormente, la indometacina también se ha formulado en geles, cremas o ungüentos de uso tópico. Estas formulaciones se aplican directamente sobre la piel y permiten la absorción transdérmica del fármaco en la zona de aplicación [ASHP, 2021].

1.4.2 USO TÓPICO DE AINEs (INDOMETACINA)

Como se ha mencionado previamente, la ventaja más importante de los AINEs tópicos es evitar los efectos adversos graves asociados con el uso sistémico de los AINEs, particularmente en pacientes de edad avanzada. Uno de los AINEs tópicos mejor caracterizados es el diclofenaco. Se ha demostrado en estudios clínicos que las preparaciones tópicas de diclofenaco son efectivas para el dolor de la osteoartritis y sugieren que la eficacia de las formulaciones tópicas es similar a la lograda con las formulaciones orales de este AINE. Todas las formulaciones de AINEs contienen los mismos recuadros de advertencias con respecto a la toxicidad cardiovascular y renal; sin embargo, se propone que los AINEs tópicos tengan un perfil de seguridad más favorable que los AINEs orales debido a las bajas concentraciones séricas alcanzadas con las formulaciones tópicas. En efecto, la evidencia indica que las formulaciones tópicas pueden alcanzar concentraciones terapéuticas del fármaco en el tejido localizado mientras mantienen bajos los niveles séricos del fármaco y potencialmente evitan la toxicidad sistémica [Mcpherson y Cimino, 2013].

Por ejemplo, las preparaciones tópicas de diclofenaco tienen una concentración sérica máxima reportada que es alrededor del 0.4-2.2% de la concentración sérica máxima alcanzada con diclofenaco oral, lo que resulta en una exposición sistémica significativamente menor. Otros beneficios propuestos de las formulaciones tópicas de AINEs incluyen [Mcpherson y Cimino, 2013]:

1. Evitar el metabolismo de primer paso y la variabilidad del tracto gastrointestinal en la administración de fármacos.
2. Administración directamente al sitio de acción deseado.
3. La administración tópica puede ser más aceptable para los pacientes y, por lo tanto, aumentar la adherencia.

4. Tolerancia de la administración de medicamentos cuando los pacientes no pueden tomar / tolerar formulaciones orales.
5. Puede ser más rentable debido a la facilidad de administración en comparación con otras vías de administración.
6. Evitar las interacciones medicamentosas.
7. Disminución potencial del tiempo de eficacia debido a la eliminación de la titulación de la dosis.

A nivel internacional se comercializa la indometacina en formulaciones tópicas como crema (emulsión oleosa) al 2.5 % [Indaflex®, Industria Farmacéutica Andrómaco, S.A. de C.V., México) y en solución 8 mg/mL (Reusin®, Mobilat Produktions GmbH, Alemania), si bien existen diversas publicaciones mencionando el potencial de desarrollo de formulaciones tópicas de indometacina basadas en otras plataformas tecnológicas [AEMPS, 2023; Ma et al., 2017; Panalytical, 2023; Ricci et al., 2005].

2 ANTECEDENTES

2.1 NANOSISTEMAS DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS Y LIBERACIÓN DE AINES

Actualmente, la nanotecnología es una ciencia de alto impacto en el desarrollo, tratamiento, evaluación y producción de sistemas altamente especializados con fines terapéuticos, biomédicos, cosméticos, nutraceuticos. La nanotecnología según el National Human Genom Research Institute NIH, “es la ciencia de manipular la materia a una escala atómica y molecular para resolver problemas” [NIH, 2023].

En este sentido, la nanofarmacología permite la generación de potenciales vehículos de entrega para el transporte, encapsulación y liberación de sustancias bioactivas o fármacos en el tratamiento innovador de una amplia gama de enfermedades tales como Alzheimer, Parkinson, artritis reumatoide, y enfermedades infecciosas, incluyendo el desarrollo de nanovacunas o nanoadyuvantes. Un ejemplo parteaguas en la historia de la humanidad es el desarrollo de las vacunas génicas basadas en nanotecnología (nanoliposomas) como medio de acarreamiento de material genético

del virus SARS-CoV2 para la prevención de la Covid-19. Partículas lipídicas basadas en nanotecnología en el orden que varía desde veinte hasta unos cuantos nanómetros [Wang et al., 2022].

2.2 NANOLIPOSOMAS

Los liposomas son vesículas esféricas con tamaños que oscilan entre los nanómetros y micrómetros, suelen ser pequeñas y presentar características interesantes para el transporte de fármacos, moléculas, proteínas, anticuerpos y/o aminoácidos. Cuentan con una bicapa fosfolipídica y encierran un compartimento acuoso en su interior.

Los nanoliposomas son sistemas avanzados para el tratamiento-detección de numerosos problemas actuales, vesículas pequeñas de (2 a 100nm) conformadas por una o más láminas bimoleculares de lípidos. Como definición “el nanoliposoma, o vesícula lipídica de bicapa submicrométrica, es una nueva tecnología para la encapsulación y el suministro de agentes bioactivos” [Ferraris et al., 2018]. Desde principios del siglo XIX investigadores produjeron liposomas haciendo estudios de hidratación de películas lipídicas. A pesar de ello, no fueron descritas hasta 1965 por Bangham quien tras agregar agua a un matraz contenido en una fina capa lipídica fueron capaz de observarlas, en un intento por evaluar el efecto en la coagulación sanguínea.

Estos sistemas son tan eficaces que hasta la fecha siguen siendo tema de investigación e interés por sus múltiples usos en la solución de problemáticas actuales en industrias cosmética, alimentaria y farmacéutica, por mencionar algunas. En la superación de retos relacionados con área superficial, estabilidad química, física, eficiencia de encapsulación y solubilidad, potenciando sus aplicaciones con la reducción de tamaño a escala nano. En la Tabla 3 se muestran los efectos intrínsecos mencionados anteriormente, relacionados con propiedades incrementadas por el uso de nanoliposomas.

Tabla 3. Ventajas de liposomas SUV- vesículas unilaminares pequeñas y LUV- vesículas unilaminares largas [Chavarría Rojas et al., 2022].

Número de bicapas	Abreviación	Diámetro	Propiedades
1	SUV	20-80nm	Elevado radio de curvatura, elevada proporción de fosfolípidos, en monocapa externa. Importante relación/superficie/lípido.
1	LUV	80nm-1µm	Elevada capacidad de encapsulación

En el proceso convencional de generación de nanoliposomas, las moléculas de fosfolípidos son guiadas por las fuerzas electroquímicas propicias en el agua para acomodarse en una disposición mutua, dando lugar a la conformación de estructuras vesiculares esféricas. Estas estructuras encapsulan un compartimento acuoso en su totalidad, como se ilustra en la Figura 6. La región 1 de la figura exhibe la organización de un nanoliposoma que consiste en colesterol, el fosfolípido de interés y agua. En la región 2, se observa un nanoetosoma compuesto por etanol, el fosfolípido de interés y agua. En la región 3, se muestra la estructura del transetosoma, compuesto por un activador de borde y un mejorador de penetración. En la región 4, se presentan los etosomas binarios constituidos por propilenglicol o alcohol isopropílico. Tanto las estructuras en las regiones 4 como 3 incorporan en su configuración el fosfolípido de interés y agua de manera intrínseca.

Nanoestructuras lipídicas

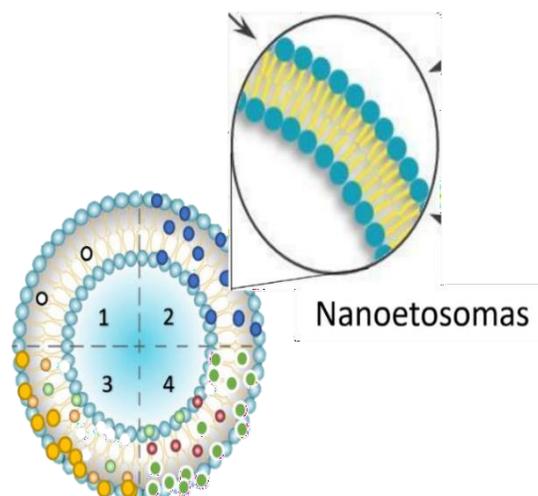


Figura 6. Tipos de nanoestructuras lipídicas [Paiva-Santos et al., 2021a].

2.3 NANOLIPOSOMAS CONTENIENDO ETANOL

Los etosomas son la segunda generación de los liposomas. Fueron desarrollados por Jean Touitou entre los años 1997 y 2000, como nuevos portadores de principios activos constituidos por una alta concentración de etanol. Son nanovehículos vesiculares no invasivos, elásticos y maleables que permiten la llegada de los fármacos a las capas más profundas de la piel y/o a la circulación sistémica. Los etosomas clásicos son el resultado de la modificación de las bicapas lipídicas de los liposomas convencionales por adición de una mezcla hidroalcohólica etanol/agua hasta 45% w/w, fosfolípidos y agua [Paiva-Santos et al., 2021]. Así, se ha visto la mejoría en la penetración transdérmica, además de mejorar la estabilidad como la encapsulación del principio activo. Una segunda generación de nanoetosomas surgió con la propuesta de mezclar polietilenglicol (PEG) y alcohol isopropílico (IPA) [Ismail et al., 2021].

Esta nueva generación de los sistemas etosómicos se conocen como transetosomas. Se supo de ellos por primera vez en el año 2012, gracias al científico e investigador [Song et al., 2012]. El objetivo de ese desarrollo fue combinar la deformabilidad de los

transferosomas y las ventajas de los etosomas dando origen así a los transetosomas [Ismail et al., 2021].

Tabla 4. Tabla comparativa entre liposomas y etosomas.

Nombre	Liposomas	Etosomas o transferosomas
Composición	Bicapa fosfolipídica (lecitina-colesterol) Colesterol.	Modificación de bicapas lipídicas de liposomas por adición de mezcla hidroalcohólica. Etanol/agua hasta 45 % w/w [Chen et al., 2021]. Alto porcentaje de etanol. Concentración entre 20-45% [Abd El-Alim et al., 2019]. Alta concentración de etanol [Agrawal et al., 2022].
Personaje que los desarrolló	Bangham et al. 1965	Jean Touitou [1997-2000].
Ventajas	Más rígidos. Porcentaje pequeño de colesterol.	Elásticos, flexibles (blandos) y maleables. Llegada de fármacos a capas profundas de la piel y/o circulación sistémica.
Estructura	(SUV) vesículas unilaminares pequeñas.	Múltiples capas concéntricas. Similares a liposomas MLV.
Tipo de administración	Administración dérmica	Administración dérmica y transdérmica.

Los nanoetosomas son pequeñas partículas esféricas que se utilizan como sistemas de entrega de medicamentos y otros compuestos bioactivos. Están compuestos principalmente de fosfolípidos, etanol y agua que son los mismos componentes, con excepción del etanol, de las membranas celulares [Surdana et al., 2021]. Estos fosfolípidos se organizan en una estructura bicapa, con una capa exterior hidrofílica y una capa interior hidrofóbica. Los nanoetosomas tienen un diámetro muy pequeño, generalmente inferior a 200 nanómetros, lo que les permite penetrar en las células y tejidos de forma eficiente. Además, se ha demostrado que los nanoetosomas son seguros y bien tolerados por el organismo. En la Tabla 4 se puede apreciar la comparativa entre liposomas y etosomas.

Los nanoetosomas pueden cargarse con diferentes tipos de compuestos bioactivos, como fármacos, antioxidantes, vitaminas y otros nutrientes. Al estar encapsulados en los nanoetosomas, estos compuestos están protegidos de la degradación y la eliminación rápida del organismo, lo que mejora su estabilidad y su eficacia [Mishra et al., 2019].

La penetración de los nanoetosomas, gracias a su tamaño y potencial zeta, se ve facilitada al atravesar una membrana semipermeable como la piel. El estrato córneo representa la principal barrera de permeabilidad que controla el transporte de fármacos drogas a través de la piel. En el caso de micro y nano acarreadores del transporte de fármacos a través de la piel ocurre principalmente por dos rutas de difusión macro: transepidérmicas y transapendagios, favorecidas en todo caso por la capacidad de deformación de los nanoetosomas [Figura 7; Zeb et al., 2019]. Estas estructuras nanométricas exhiben dimensiones reducidas y una carga eléctrica adecuada, lo que les permite sortear los obstáculos inherentes a la barrera cutánea. El tamaño de los nanoetosomas les permite deslizarse entre las células de la epidermis y penetrar en las capas más profundas de la piel. Además, su potencial zeta controlado les confiere estabilidad y una mayor capacidad de interacción con la membrana celular, favoreciendo así su absorción eficiente y su liberación de sustancias bioactivas. De esta manera, los nanoetosomas representan una prometedora estrategia para la entrega precisa y efectiva de compuestos terapéuticos y cosméticos a través de la piel.

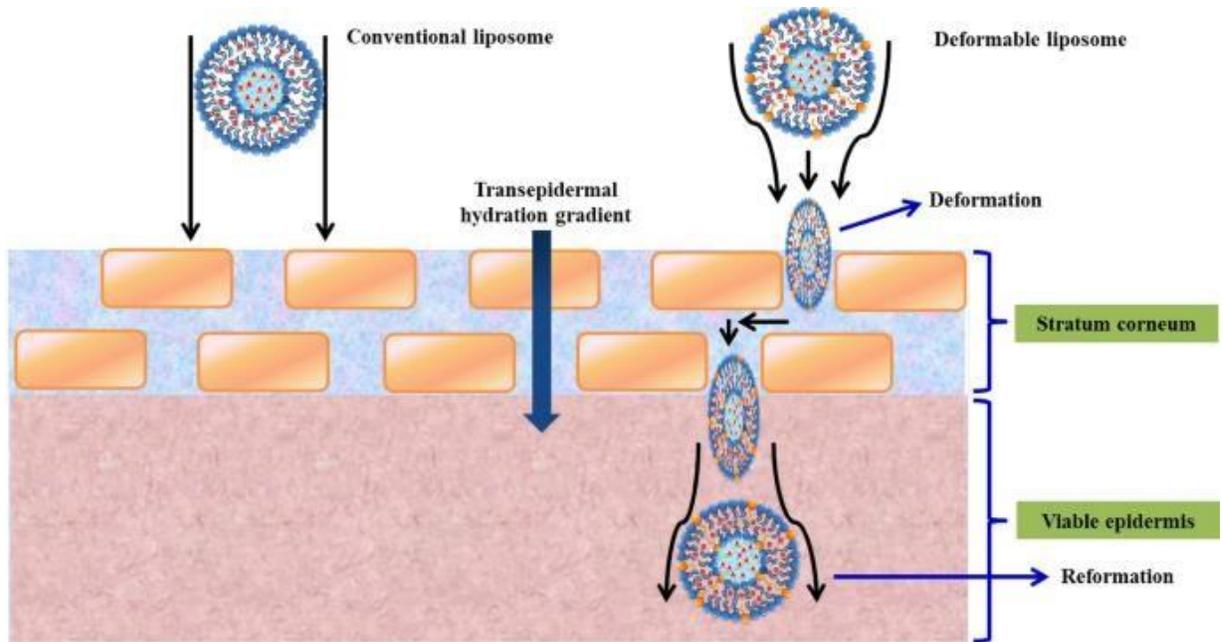


Figura 7. Ilustración diagramática de la estructura de la piel y las rutas de permeación del fármaco a través de la piel empleando nanoesomas [Tomado de: Rozendal et al., 2008; Zeb et al., 2019].

2.3.1 MÉTODOS PARA EL AUTOENSAMBLAJE DE NANOETOSOMAS

La preparación de nanoetosomas es muy similar a la preparación de nanoliposomas, de hecho, algunos métodos que se emplean tienen el mismo nombre con la diferencia de que estos, cuentan con un alto contenido de etanol, alrededor del 40%. Autores como Ones et al., [2010] reportan emplear como solvente de rehidratación una mezcla de agua etanol 85:15 vol/vol. Por otra parte, Barupal et al., [2010] reportan, basándose en el método de Touitou et al. [2000], la siguiente metodología. Para la preparación de etosomas, en un matraz de fondo redondo se deberá solubilizar lecitina (1-4% m/v) en etanol como solvente en una relación (10-50% v/v) conteniendo el fármaco, mezclar mediante un agitador magnético. Tapar el matraz para evitar evaporación. Añadir despacio agua destilada manteniendo agitación continua y presenciar la formación de suspensión coloidal de etosomas. La solución final se recomienda mantener a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación continua. Por último, analizar tamaño de partícula y demás parámetros fisicoquímicos u evaluaciones. Si se requiere, se pueden emplear procesos adicionales de sonicación u extrusión para la reducción de tamaño. A continuación, se presenta un resumen de las metodologías comunes utilizadas para la preparación de estas nanopartículas:

- Método de película delgada y rehidratación: En este método, se forma una película lipídica mediante la evaporación de un disolvente orgánico que contiene fosfolípidos [Abd El-Alim et al., 2019]. Luego, la película se rehidrata con una solución acuosa que contiene el fármaco. Este proceso de rehidratación conduce a la formación espontánea de vesículas lipídicas encapsulando el fármaco.
- Método de inyección de solvente orgánico en agua (Método de Bangham): En este método, se prepara una solución lipídica en un disolvente orgánico miscible en agua. La solución lipídica se inyecta rápidamente en un exceso de agua y se produce una dispersión de liposomas. La posterior evaporación del disolvente orgánico resulta en la formación de liposomas encapsulando el fármaco [Gouda et al., 2021].

- Método de emulsificación y evaporación: En este método, se forma una emulsión mediante la mezcla de una fase lipídica que contiene el fármaco con una fase acuosa. La emulsión se somete a agitación o ultrasonidos para dispersar las gotas de la fase lipídica en la fase acuosa. Posteriormente, se evapora el disolvente orgánico si está presente, lo que lleva a la formación de liposomas o nanoetosomas [Mendoza-Muñoz et al., 2016].
- Método de hidratación de película seca: En este método, una película lipídica se forma mediante la evaporación de un disolvente orgánico que contiene fosfolípidos y fármaco. Luego, la película se hidrata con una solución acuosa para obtener vesículas lipídicas que encapsulan el fármaco [Thabet et al., 2022].
- El método frío, o "cold method", es una técnica utilizada para la preparación de nanoetosomas. A diferencia de otros métodos que implican la aplicación de calor o energía, el método frío se basa en el uso de bajas temperaturas durante

el proceso de formación de nanoetosomas. Este enfoque tiene como objetivo minimizar la degradación térmica de los componentes sensibles, como los fármacos o los lípidos utilizados en la formulación. En el método frío, se parte de una solución lipídica que contiene los fosfolípidos y el fármaco de interés. Esta solución se enfría lo que provoca que la solución se transforme en una masa sólida, que luego se someterá a un proceso de liofilización o congelación para eliminar el agua presente. Posteriormente, la masa sólida se rehidrata con una solución acuosa adecuada, lo que permite la formación de nanoetosomas. Durante este proceso de rehidratación, los lípidos se organizan espontáneamente en bicapas lipídicas que encapsulan el fármaco. El tamaño y la distribución de los nanoetosomas se pueden ajustar mediante técnicas adicionales, como ultrasonido o extrusión [Chauhan et al., 2022]. Es importante tener en cuenta que la optimización de las condiciones del método frío, como la concentración de lípidos, la relación de fármaco a lípido y la velocidad de enfriamiento, es crucial para obtener nanoetosomas de alta calidad con un rendimiento adecuado. En la Figura 8 se muestra un diagrama general del proceso de elaboración de nanoetosomas por el método en frío.

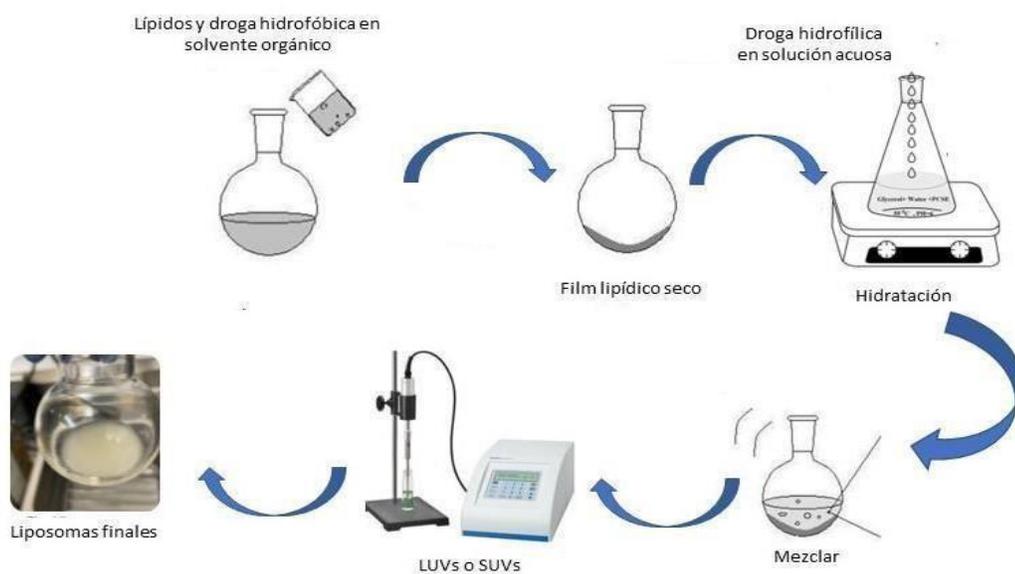


Figura 8. Esquema por secuencia para la preparación de nanoetosomas en frío.

2.4 PROPIEDADES CRÍTICAS DE LAS NANOFORMULACIONES

2.4.1 POTENCIAL ZETA

La potencial zeta es una medida de una magnitud física, concretamente la medición de la magnitud de repulsión o atracción electrostática entre partículas cargadas positiva o negativamente en una suspensión coloidal. Es preferible que las cargas sean lo más positivas o negativas posibles, ya que de esta manera se tendrá una solución coloidal estable. Cabe destacar que los coloides se encuentran presentes en nuestra vida cotidiana como en pinturas, tintes, sistemas funcionales y plasma sanguíneo, de ahí su evidente importancia.

El modelo que se emplea para estudiarlo es el modelo de la doble capa, el cual consiste en estudiar las interacciones entre iones o coloides adyacentes a la solución con las capas que lo rodean, además de sus interacciones entre la capa externa y capa difusa. Otra definición es la fuerza eléctrica necesaria para penetrar la capa externa, además de las interacciones en el plano de deslizamiento entre ambas. Sus valores se miden en electronvolts eV (medida de tensión) y para considerarse estable una solución coloidal, el potencial zeta debe estar por encima de los ± 30 eV [Ferraris et al., 2018].

El modelo de la doble capa de Helmholtz (Figura 9) se emplea para describir la variación de potencial eléctrico en la vecindad de una superficie. En este caso describir además la diferencia de potencial en la interfase sólido líquido o potencial electrocinético. *“Dado que la potencial zeta no es igual al potencial de superficie eléctrica en una doblecapa o al potencial Stern, a menudo es el único valor que se puede usar para describirlas propiedades de doble capa de una dispersión coloidal. [Rosen & Kunjappu, 2018]”*. La intensidad del campo eléctrico estático de la capa doble en el límite entre el grano y el fluido (plano de corte), es empleado para evaluar nanopartículas. A mayor distancia de la superficie de partícula el potencial eléctrico disminuye, contrario a lo que ocurre a mayor cercanía. En la superior se puede apreciar el comportamiento de la estabilidad de un coloide (negativo) de acuerdo con la potencial zeta de la suspensión y su interacción con partículas de carga opuesta.

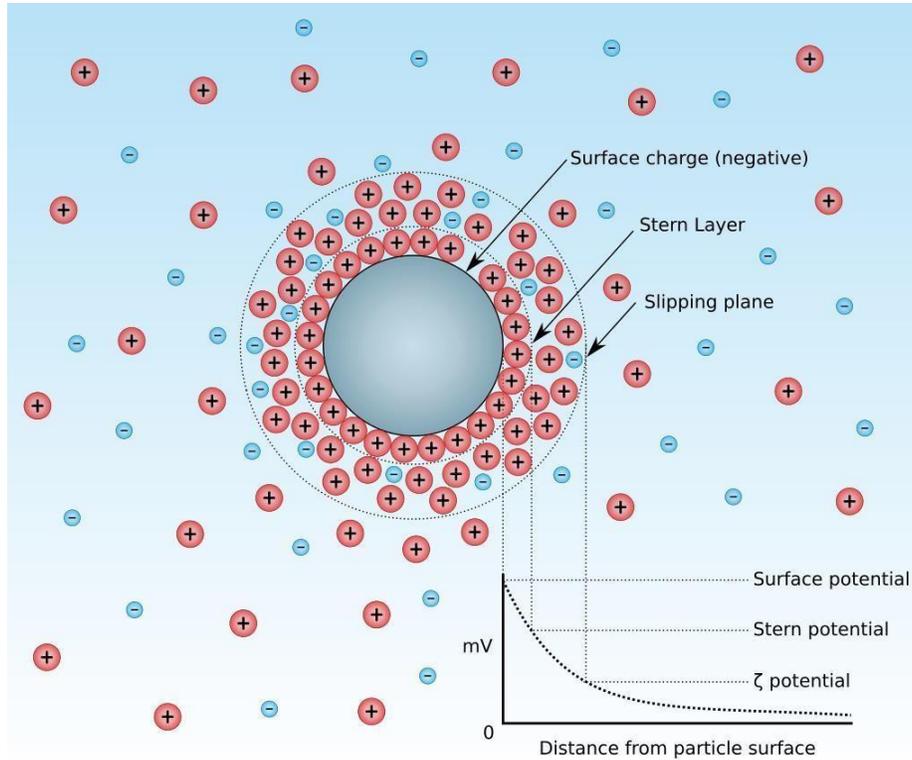


Figura 9. Modelo de la doble capa de Helmholtz [Rosen & Kunjappu, 2018].

Algo a destacar es que la potencial zeta no se puede medir directamente. Es calculado empleando modelos teóricos o estimaciones experimentales, por lo general mediante movilidad electroforética. Particularmente para conocer la potencial zeta, se busca conocer la velocidad a la que una partícula cargada se mueve en presencia de un campo eléctrico. Las partículas con potencial ζ migrarán hacia el electrodo con polarización opuesta, tasa de migración proporcional al mismo. El signo de su carga dependerá de la polaridad del material. Potenciales zetas menores a ± 15 eV por lo general representa el comienzo de aglomeración. A continuación, se muestran algunos valores de referencia de potencial electrocinético (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de referencia del potencial electrocinético [Rosen & Kunjappu, 2018].

Magnitud de potencial Zeta (mV)	Comportamiento de estabilidad
0 a 5	Floculación rápida
10 a 30	Inestabilidad incipiente
30 a 40	Estabilidad moderada
40 a 60	Buena estabilidad
>61	Estabilidad excelente

2.4.2 TAMAÑO DE PARTÍCULA

El tamaño de partícula se refiere al diámetro promedio de las partículas que componen un sistema de nanoetosasomas. Es especialmente relevante debido a sus implicaciones en la eficacia y el comportamiento de entrega de la sustancia activa [Berthely Cardoso & Rojano, 2016]. El tamaño de partícula es un parámetro crítico en los sistemas nanoetosasomas por varias razones:

- **Penetración cutánea:** Un tamaño de partícula adecuado es necesario para garantizar una penetración eficiente a través de la barrera cutánea. Si las partículas son demasiado grandes, pueden quedar atrapadas en la capa más externa de la piel, lo que limita su efectividad [Paraguay-Delgado & Paraguay-Delgado, 2020]. Por otro lado, si las partículas son demasiado pequeñas, pueden difundirse rápidamente en la piel sin alcanzar las capas más profundas donde se requiere el tratamiento.
- **Estabilidad física:** El tamaño de partícula también puede influir en la estabilidad física del sistema nanoetosoma. Si las partículas son demasiado grandes, existe un mayor riesgo de aglomeración y sedimentación, lo que puede comprometer la homogeneidad y la vida útil del producto [Benjamin et al.,

2014]. Por otro lado, si las partículas son demasiado pequeñas, pueden tener una mayor propensión a la agregación y la formación de cristales, lo que también afecta la estabilidad del sistema.

- Liberación controlada: El tamaño de partícula puede afectar la velocidad y la cinética de liberación de la sustancia activa [Mayoral et al., 2014]. Partículas más pequeñas suelen tener una mayor área superficial en relación con su volumen, lo que puede facilitar una liberación más rápida de la sustancia activa. Por otro lado, partículas más grandes pueden tener una mayor capacidad de retención y liberación sostenida a lo largo del tiempo.
- Interacción con el tejido objetivo: El tamaño de partícula puede influir en la interacción de los nanoetosomas con las células y los tejidos objetivo [Deprez et al., 2023]. Partículas de un tamaño óptimo pueden tener una mayor afinidad y capacidad de unión a las células diana, lo que favorece una mayor eficacia terapéutica.

En resumen, el tamaño de partícula en los sistemas nanoetosomas es relevante debido a su impacto en la penetración cutánea, la estabilidad física, la liberación controlada y la interacción con el tejido objetivo. Un tamaño adecuado de partícula es esencial para lograr una eficacia terapéutica óptima y mejorar las propiedades farmacocinéticas de los nanoetosomas.

Se suele medir mediante dispersión de luz dinámica (DLS), constituye el principal parámetro a evaluar que se sabe afecta la estabilidad fisicoquímica de un sistema disperso en solución. El dispositivo DLS por sus siglas en inglés Dynamic Light Scattering, se emplea para medir la distribución de tamaños de partículas. Esto se realiza mediante la medición de la distribución de velocidades de partículas dispersas en una dispersión coloidal y por medio de la ecuación de Stokes Einstein es posible transformarlos a distribución de tamaños.

3 JUSTIFICACIÓN

La indometacina (IND), es conocida por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas favorables, probablemente debido a su inhibición no selectiva de la enzima ciclooxigenasa, esto es, inhibiendo la acción de la enzima constitutiva en el sitio del daño (COX-1), pero también inhibiendo la acción de la isoforma que se induce como respuesta a un daño tisular (COX-2). Sin embargo, por la misma razón, se sabe bien que el perfil de seguridad, en particular por los efectos adversos gastrointestinales compromete los beneficios de la IND. Por lo tanto, desarrollar una formulación de uso tópico basada en nanoetosomas conteniendo IND representa una propuesta innovadora y prometedora para mejorar la eficacia y seguridad del tratamiento tópico. Los nanoetosomas podrían mejorar la penetración cutánea de la indometacina, aumentar su biodisponibilidad local y permitir una liberación sostenida del fármaco [Quirino-Barreda et al., 2017]. Esto podría resultar en una mejor respuesta terapéutica, menor frecuencia de aplicación y potencialmente una reducción en los efectos adversos gastrointestinales y sistémicos.

4 HIPÓTESIS

El uso del método en frío para la elaboración de un sistema nanoestructurado usando etanol y lecitina permite el desarrollo de nanoetosomas conteniendo indometacina para uso tópico en un rango de tamaño de partícula y de carga consistentes con una adecuada permeación cutánea y su carga en un sistema de entrega basada en un gel conduce una liberación extendida de la IND.

5 OBJETIVO GENREAL

Diseñar un sistema de nanoetosomas conteniendo indometacina (NeT-IND) por el ensamblaje de nanoetosomas de indometacina, mediante el método frío, vehiculizado en gel, así como su caracterización fisicoquímica, de eficiencia de encapsulación y de permeación en comparación con un sistema comercialmente disponible.

6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Proponer un diseño de experimentos (método de Taguchi) para la elaboración de una formulación NeT-IND manteniendo constante la concentración de IND y variando las concentraciones de etanol, leciticina y agua para su optimización basada en las propiedades de tamaño de partícula y potencial zeta.
- Caracterizar fisicoquímica de NeT-IND mediante dispersión de luz dinámica (DLS) el tamaño y distribución de tamaños de partícula, potencial zeta, y microscopia óptica.
- Evaluar la eficiencia de encapsulación y determinar de su perfil de liberación, mediante la cuantificación de indometacina por cromatografía de líquidos de alta resolución.
- Seleccionar la formulación más estable de acuerdo a valores de potencial zeta y vehiculizar en gel empleando carbopol ® 940 y trietanolamina.
- Comparar la permeación cutánea por células de difusión Franz de NeT-IND vs un producto comercialmente disponible (crema comercial Indaflex®).

7 MATERIALES Y METODOS

A continuación, se presentan los materiales, reactivos y métodos empleados en el desarrollo y autoensamblaje de nanoetosomas y su evaluación con y sin la inclusión de IND:

Materiales:

- Piseta con agua destilada
- Piseta con etanol
- Vasos de precipitado de 150 mL (2), ó frasco con taparrosca
- Parrilla de calentamiento
- Agitador magnético
- Soporte universal
- Bureta de 50 mL
- Espátula
- Filtro para extrusión con tamaño de poro 0.45µm de politetrafluoruroetileno (PTFE), 0.2 µm
- Jeringa de 10 mL
- Parafilm
- Balanza analítica
- Membrana de diálisis
- 10 agitadores magnéticos
- 10 vaso de precipitados de 50 mL
- Dispositivo para calefacción y agitación de soluciones (Franz).

Reactivos

- Fosfolípidos (Lecitina, Making cosmetics, USA)
- Etanol (Merck, México)
- Agua destilada
- Buffer de fosfatos salino PBS 1X pH 7.5

7.1 METODOLOGÍA PARA LA PREPARACIÓN DE NANOETOSOMAS MEDIANTE EL MÉTODO FRÍO

La metodología consiste en las siguientes etapas (Figura 10):

Con la ayuda de una espátula pesar en la balanza analítica 55mg de Lecitina de soya empleando un vidrio de reloj o en un trozo de papel aluminio o en película parafilm como soporte. La lecitina es una mezcla de fosfolípidos donde el principal componente es la fosfatidilcolina, pero además contiene fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol.

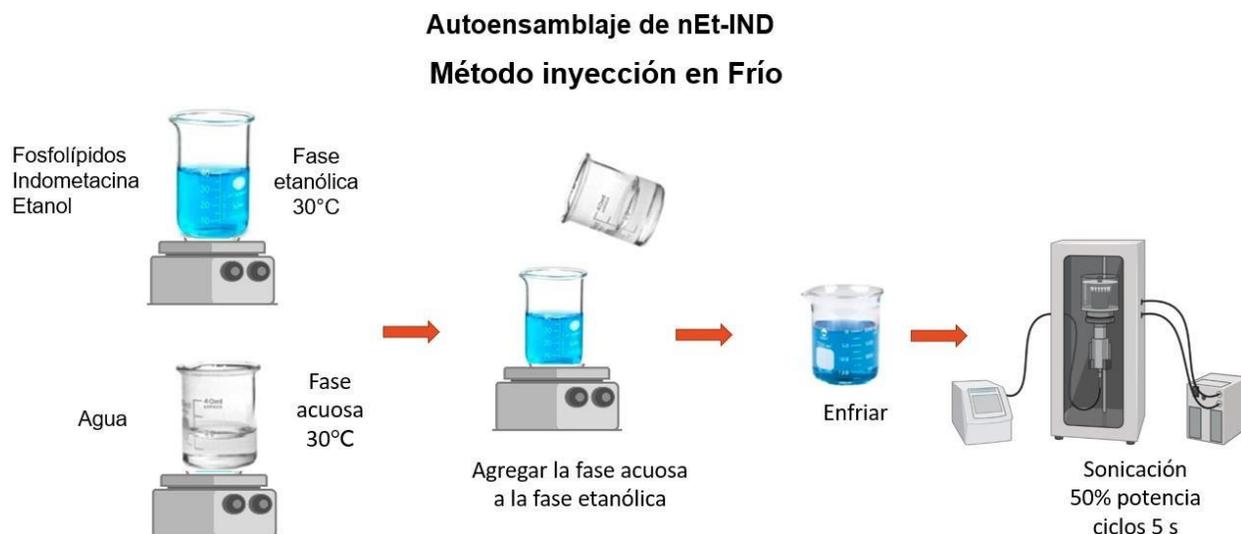


Figura 10. Esquema preparación de nanoesomas de IND por el método frío.

1. Empleando un agitador magnético en un vaso de precipitados disolver la lecitina de soya en de 4 mL de etanol con agitación continua a 700 rpm para la formación de una mezcla y calentamiento a 30 grados Celsius (°C).
2. Para la preparación de la fase acuosa, calentar agua destilada hasta alcanzar temperatura de 30 °C. Una vez finalizado mediante un arreglo para titular soluciones (soporte universal y bureta) depositar por goteo 6 mL de la fase acuosa a una velocidad de goteo aproximada de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3. Una vez realizado los pasos anteriores continuar agitando durante 5 a 30 min a 30°C.
4. Hasta el paso anterior ya se tienen etosomas de tipo MLV y LUV, sin embargo, para la obtención de SUV de tamaño nano, se requiere un paso de reducción de tamaño. En este caso, emplear la técnica de ultrasonificación usando un equipo Labsonic 2000 (B. Braun, Melsunen, Alemania). Para evitar la recristalización durante la homogeneización, la temperatura se mantuvo al menos 5°C por encima del punto de fusión de la mezcla de lípidos. La nanoemulsión obtenida (O/W) se enfrió en un baño de hielo y se diluyó hasta 200 mL con agua desionizada, almacenando en refrigeración.

7.2 DISEÑO DEL EXPERIMENTO PARA LA SELECCIÓN DE LA MEJOR FORMULACIÓN

El diseño de experimentos se realizó por el método de Taguchi, el cual se basa en arreglos ortogonales. Se eligió evaluar el efecto de diferentes proporciones de lecitina y etanol como los elementos que otorgan las principales propiedades de las nanoestructuras propuestas. A continuación, el resumen del diseño Taguchi empleado:

Resumen del diseño

Arreglo de Taguchi	L9(3 ³)
Factores:	3
Corridas:	9

Y la matriz de composición evaluada se presenta (Tabla 6):

Tabla 6. Matriz de Taguchi para el diseño optimizado de la formulación.

Formulación	Experimento	% Lecitina	% Etanol
1	1	1	35
2	1	2	40
3	1	3	45
4	2	1	40
5	2	2	45
6	2	3	35
7	3	1	45
8	3	2	35
9	3	3	40

7.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LOS NANOETOSOMAS

7.3.1 TAMAÑO DE PARTÍCULA POR DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

Se realizaron mediciones de tamaño de partícula utilizando un sistema de Dispersión de Luz Dinámica (DLS). Se empleó un equipo de DLS Zetasizer Malvern Instruments con un láser de diodo de 633 nm y un detector de correlación de fotón único (SPC). Las mediciones se llevaron a cabo en una celda de cuarzo desechable de 10 mm, llenándola con 1 mL de la suspensión de nanoetosomas. Las mediciones se realizaron en modo de correlación de intensidad con un ángulo de dispersión de 173° a 25°C. Se promediaron tres mediciones independientes para cada muestra, y se utilizó un software especializado proporcionado por el fabricante para analizar los

datos y determinar el tamaño promedio de las partículas.

7.3.2 POTENCIAL ZETA:

Para la medición del potencial zeta, se utilizó la técnica de "Zeta potential analysis" con el instrumento "Zetasizer." Los nanoetosomas ya se encontraban suspendidos en agua y etanol, por lo que no fue necesario preparar la muestra. Se aplicó un campo eléctrico suave a través de electrodos, y se midió el desplazamiento de las partículas mediante la dispersión de luz. El Zetasizer utilizó modelos matemáticos para calcular la potencial zeta de las partículas en función de su velocidad de electro sedimentación. Los resultados se presentaron en mV o en unidades de potencial zeta, reflejando la carga superficial de las partículas. Un potencial zeta positivo indica carga positiva, negativo indica carga negativa, y cercano a cero indica carga nula o neutralización.

7.3.3 MORFOLOGÍA POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Para caracterizar la forma y tamaño aproximado de las vesículas, se empleó un microscopio óptico con diversos aumentos colocando una gota de la nanoemulsión bajo un campo de luz blanca.

7.3.4 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INDOMETACINA EN LAS MUESTRAS POR CROMATOLOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La concentración de IND en las muestras de diversos experimentos se midió con un método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección UV que se describe a continuación. Las muestras se inyectaron un sistema Waters 1525 de bombas binarias empleando como fase móvil una mezcla de metanol, acetonitrilo y agua acidificada con ácido fosfórico pH 3.3 en una relación (60:20:20), con flujo constante de 1 mL/min. Se usó una columna Agilent Eclipse plus C18 de 4.6 mm diámetro interno x75mm de longitud, tamaño de partícula 3.5 μm , inyectando 10 μL y detectando las señales a longitud de onda 254 nm.

Se realizó una curva de calibración con los puntos en concentración de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL y 0.1 µg/mL de indometacina en solución etanólica (Tabla 7). A partir de una solución stock inicial de 1mg/mL o bien que es equivalente de 1000 µg/mL se realizaron las diluciones correspondientes. A continuación, se muestran los volúmenes tomados y el aforo a 1 mL.

Tabla 7. Concentraciones y volúmenes para curva de calibración.

Concentración final	Volumen a tomar de la solución anterior (solución stock]	Volumen de aforo con etanol
100 µg/mL	100 µL	500 µL
50 µg/mL	500 µL	500 µL
10 µg/mL	200 µL	800 µL
5 µg/mL	500 µL	500 µL
1 µg/mL	200 µL	800 µL
0.1 µg/mL	100 µL	900 µL
100 µg/mL	100 µL	500 µL
50 µg/mL	500 µL	500 µL
10 µg/mL	200 µL	800 µL

Estos volúmenes se inyectaron posteriormente al equipo de cromatografía líquida de alta resolución HPLC, y se procedió a optimizar el método.

Donde:

W_{inicial} corresponde a la masa de IND inicial

W_{libre} a la masa libre después de agitación

7.3.6 EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN *IN-VITRO* EN MEMBRANA DE DIÁLISIS

Los estudios de liberación *in vitro* de la IND desde la nanoformulación etosómica se realizaron utilizando celdas de difusión modificadas localmente. Se cortaron segmentos de membrana de diálisis de 8 cm aproximadamente y se sellaron de la parte inferior de la celda. Se depositó la formulación de Net-IND en el interior y se selló la parte superior. El sistema se colocó en la solución de buffer de fosfatos (50 mL) bajo agitación continua a temperatura de 37 °C y se tomaron alícuotas de 1 mL del buffer de fosfatos (pH 7.4) (con reposición de volumen con buffer fresco) durante 12 h. Posteriormente se construyeron los perfiles de liberación. Se presenta el esquema de dicha evaluación (Figura 12).

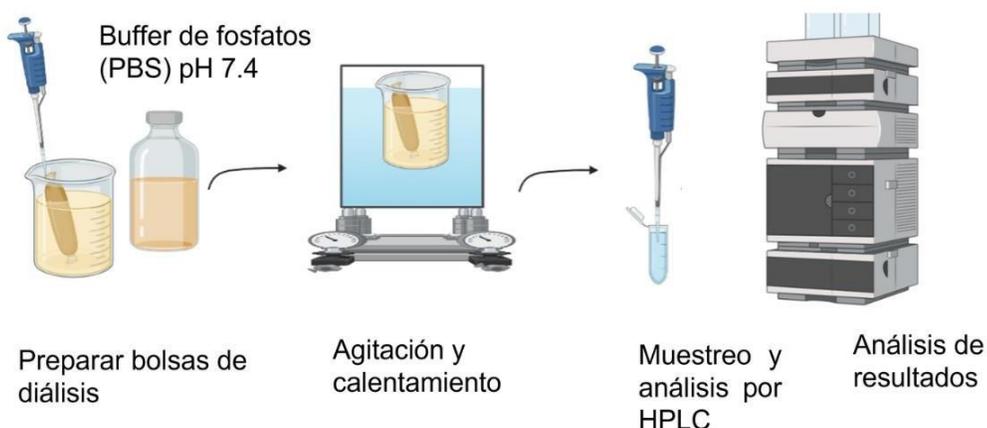


Figura 12. Esquema de los procesos realizados para la evaluación de la liberación *in-vitro* a través de membrana de diálisis.

7.3.7 SELECCIÓN DE LA MEJOR FORMULACIÓN Y VEHICULIZACIÓN EN GEL

La selección de la mejor formulación se basó en la optimización del modelo de Taguchi sobre las variables de tamaño de partícula y potencial zeta. La formulación seleccionada fue vehiculizada con en gel para realizar la evaluación comparativa de las propiedades de permeación *ex vivo*. El gel se preparó utilizando carbopol 934 con el método de dispersión con neutralización. Se dispersó Carbopol en agua purificada y se hidrató adecuadamente, evitando grumos y burbujas de aire. Luego, se agregó trietanolamina gradualmente como agente neutralizante para ajustar el pH del gel. La viscosidad se controló y se añadieron otros ingredientes necesarios. Finalmente, se homogeneizó el gel para obtener una distribución uniforme. El énfasis radica en el uso de trietanolamina como el agente neutralizante clave en la preparación del gel.

7.3.8 COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PERMEACIÓN DE LA FORMULACIÓN NeT-IND VERSUS PRODUCTO COMERCIAL

En el estudio de "Evaluación de las propiedades y comparación con el producto comercial" utilizando la celda de Franz, se evaluaron Indaflex® (producto comercial) y los nanoetosomas en pieles de ratón por triplicado. Se aplicó 1 gramo de Indaflex® en tres muestras de piel y 1 gramo de nanoetosomas con indometacina en otras tres muestras. Luego, se montaron las pieles en la celda de Franz y se evaluó la permeación y liberación de las sustancias. Después de 0, 1, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 24 hrs. se recogieron muestras de 1µL del compartimento donador para análisis reponiéndolas con 1 µL de buffer de fosfatos salino PBS (pH=7.4) cada vez. Se compararon los resultados de la liberación y se sacaron conclusiones sobre la permeabilidad de ambos productos, utilizando análisis estadístico ANOVA de un factor para determinar si es que hay diferencias significativas en términos de liberación entre las 9 formulaciones.

Se emplearon celdas de Franz para determinar la permeación cutánea *ex vivo* la formulación de Net-IND con mejores propiedades según lo descrito previamente, comparando con la permeación de IND producida por una formulación comercial de IND (Indaflex®), la cual se está formulada como una crema al 2.5%. Se colocó 1 gramo del gel con Net-IND o de Indaflex® sobre una sección (1 cm²) de piel de rata (Wistar macho de 10 semanas de edad), previamente afeitada y lavada. la piel se fijó en un compartimiento receptor (lado del estrato córneo hacia arriba en el compartimiento donante). Se empleó buffer de fosfato pH 7.4 como medio de transporte en las celdas de Franz controlando la temperatura a 37°C bajo agitación constante. Se tomaron muestras con reemplazo en un periodo de 24 h y se midió la concentración de IND con el método cromatográfico descrito previamente. La piel de las ratas procedió de una donación de una investigación independiente al momento de concluir tal investigación y enviar a eutanasia a los animales control (sin exposición). Tal protocolo fue aprobado por un comité de ética en investigación con número: ALP-AS-22-001.

8 RESULTADOS

8.1 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

El diseño de experimentos se realizó por el método de Taguchi, el cual se basa en arreglos ortogonales. Es importante mencionar es que el pH cuando se incorpora IND al 2% es de 5.62 en comparación con la formulación sin IND con un pH de 6.96, esto tiene sentido debido al carácter ácido de la indometacina (2-(1-(4-clorobenzoil)- 5-metoxi-2-metilindol-3-il)ácido acético).

MODELO TAGUCHI

Se realizó un diseño Taguchi

Resumen del diseño

Arreglo de Taguchi L9(3³)
Factores: 3
Corridas: 9

Matriz de Taguchi.

Tabla 8. Matriz de Taguchi.

Formulación	Experimento	% Lecitina	% Etanol
1	1	1	35
2	1	2	40
3	1	3	45
4	2	1	40
5	2	2	45
6	2	3	35
7	3	1	45
8	3	2	35
9	3	3	40

A continuación, se presenta una imagen con las formulaciones resultantes en orden creciente de la 1 a la 9 y en el lugar 10 el control nanoetosomas sin indometacina (Figura 13). En cuanto a consistencia todas presentan una consistencia equivalente y coloración blanco-amarillento.



Figura 13. Formulaciones de nanoetosomas obtenidas. Nanoetosomas del 1 al 9 en ese orden y al último la formulación control (nanoetosoma sin IND).

En la gráfica de efectos principales para medias en función de tamaño (Figura 13) y de potencial zeta (Figura 14) se puede observar que la mejor combinación de factores son los pertenecientes al bloque de experimentos número dos, en particular cuando se incluyen porcentajes de 2% de lecitina y 35% de etanol, lo que corresponde con el experimento 8. Para verificar los hallazgos anteriores, posteriormente se realizó el trazo de superficie de respuesta con los datos obtenidos para tamaño de partícula y potencial zeta.

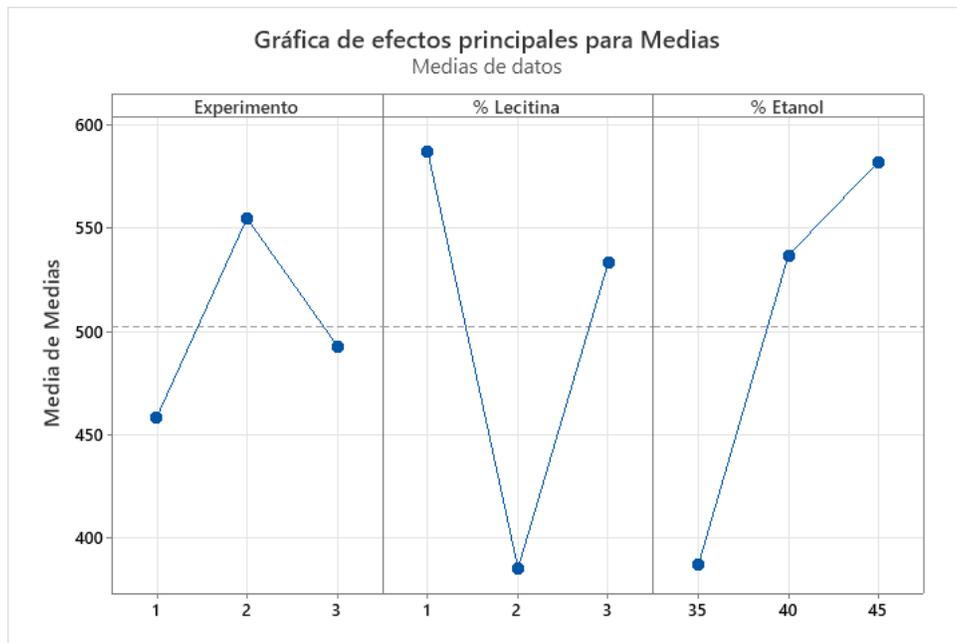


Figura 14. Gráfico de diseño Taguchi, efectos principales para medias en función tamaño (nm).

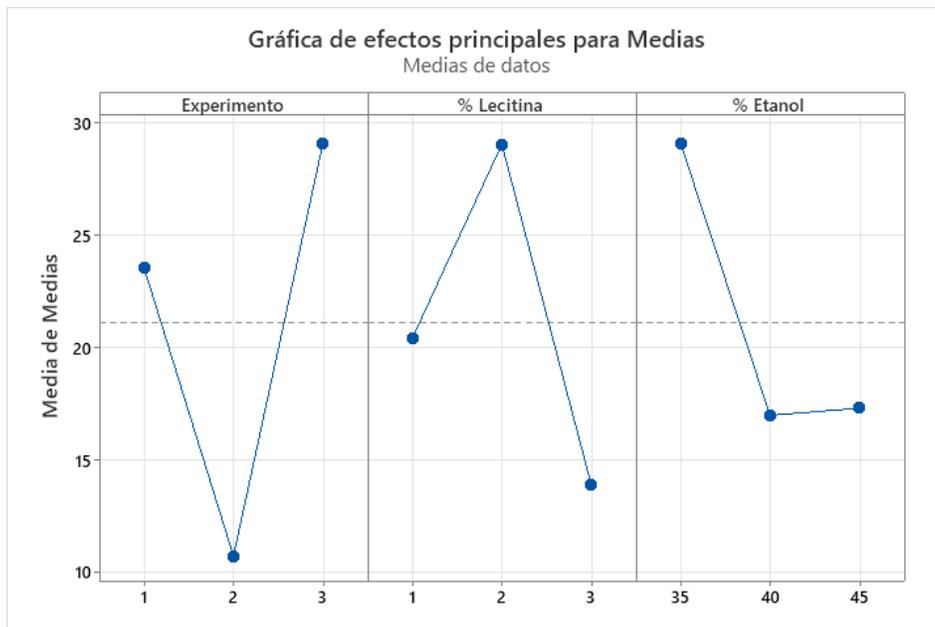


Figura 15. Gráfico de diseño Taguchi, efectos principales para medias en función de potencial zeta (mV).

Con los datos obtenidos previamente con el Zetasizer Malvern Instruments y el uso del diseño de Taguchi en el programa minitab se trazó la superficie de respuesta en términos del tamaño de partícula (Figura 16) y la potencial zeta (Figura 17).

Gráfica de superficie de Tamaño (nm) vs. % Lecitina, % Etanol

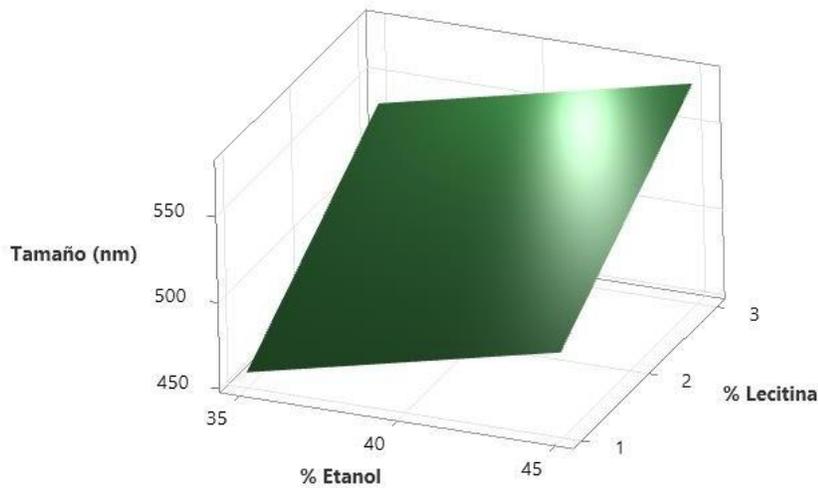


Figura 16. Gráfica de superficie de tamaño (nm) vs porcentajes de lecitina y etanol.

En la gráfica superior se puede apreciar que a mayor concentración de etanol y mayor concentración de lecitina el tamaño promedio de los nanoetomas incrementa, esto tiene sentido ya que a mayor cantidad de materiales de constructo se esperaría mayores tamaños de partícula.

Gráfica de superficie Potencial zeta (mV) vs. %Lecitina, %Etanol

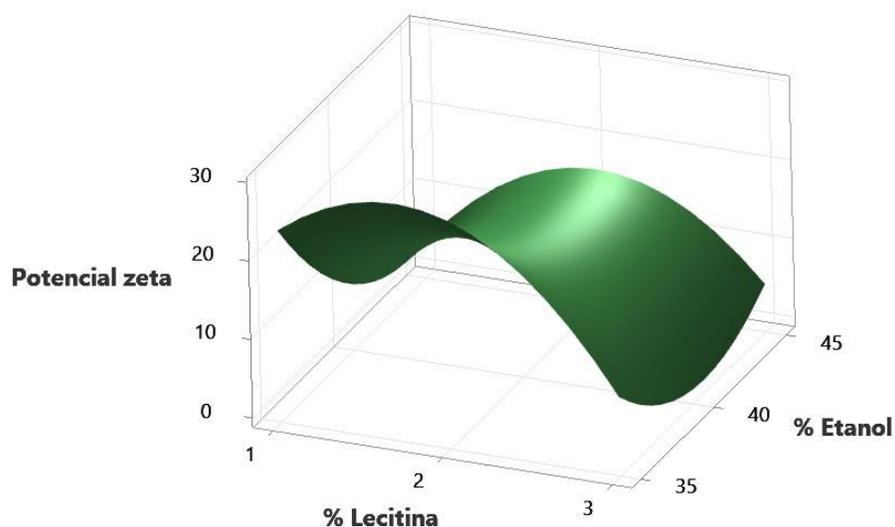


Figura 17. Gráfica de superficie de potencial zeta (mV) vs porcentajes de lecitina y etanol.

En este caso se aprecia que la combinación teórica que optimiza el diseño corresponde con concentraciones de 2% de lecitina (peso volumen), y 35% de etanol (volumen-volumen), donde se aprecia una potencial zeta del 30 mV. A continuación, se presentan los resultados para las formulaciones obtenidas por el método de Taguchi (Tabla 9).

Tabla 9. Composición de formulaciones de nanoetosomas.

Formulaciones	Fosfolípido (%)	Etanol (%)	Tamaño(nm]	Potencial zeta (mV]	Eficiencia de atrapamiento (%)
E1	1	35	448.56	-21.7	98.56
E2	2	40	460.26	-24.73	95.07
E3	3	45	466.29	-24.23	97.80
E4	1	40	571.73	-17.6	98.62
E5	2	45	537.83	-5.69	98.27
E6	3	35	555.1	-8.82	98.10
E7	1	45	741.93	-21.96	98.64
E8	2	35	158.5	-55.73	98.28
E9	3	40	578.7	-8.61	97.73

8.2 MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE INDOMETACINA

La curva de calibración (Figura 19) muestra linealidad para el método de cuantificación de indometacina por HPLC ya que se obtienen valores R de 0.99 y R² de 0.997 en el rango de concentraciones establecido de 10 a 100 µg/mL. A continuación, se muestra su perfil de elusión (Figura 18).

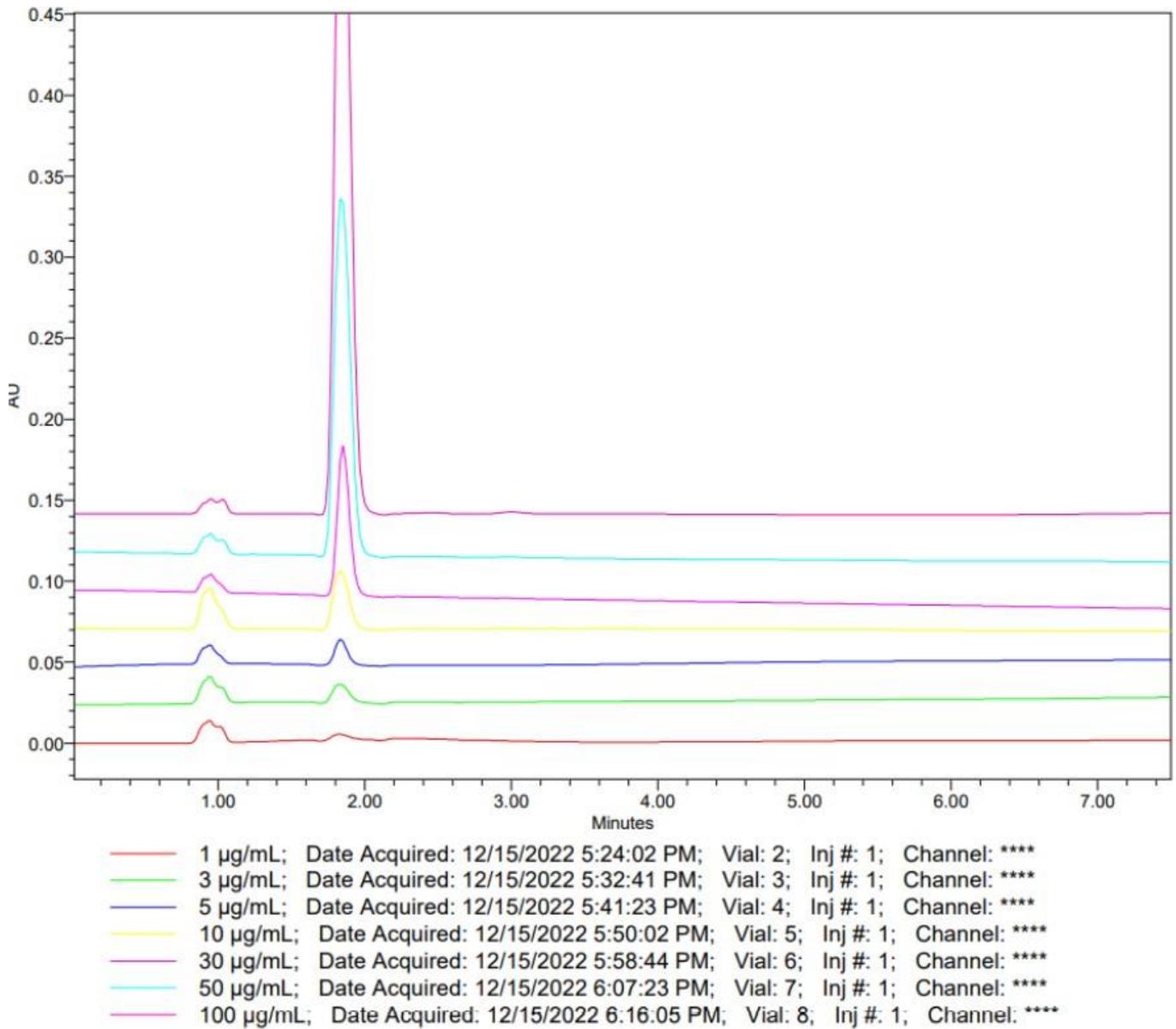
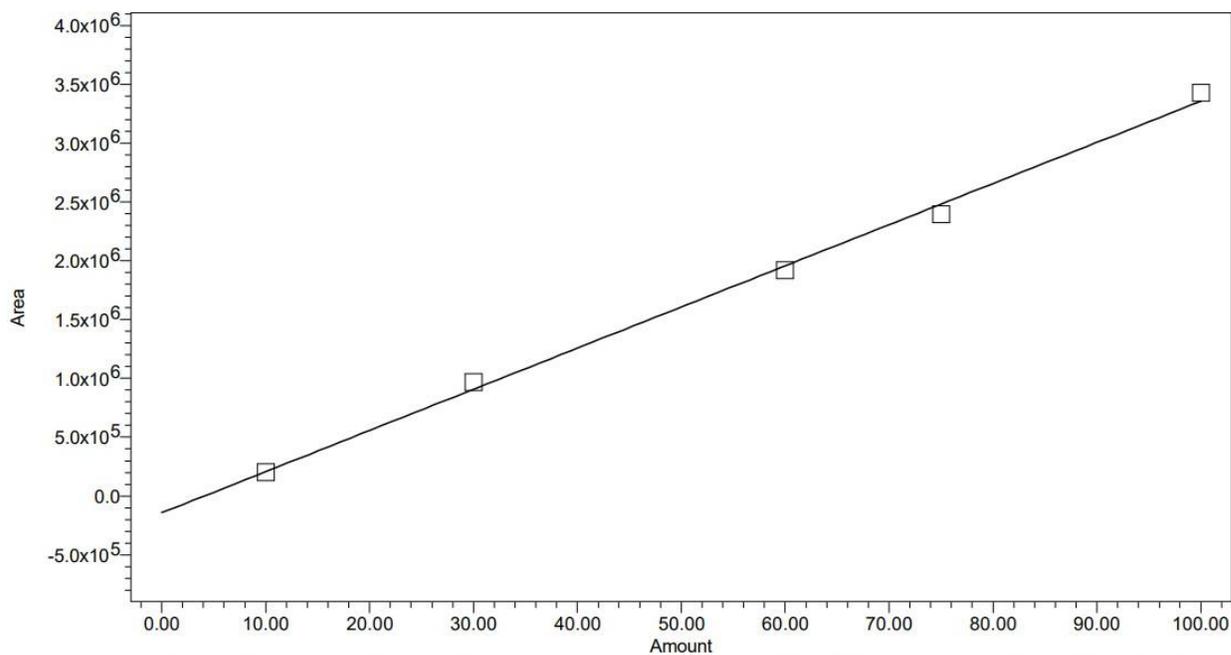


Figura 18. Perfil de elución correspondiente a curva de calibración de IND.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE INDOMETACINA



Name: ind; RT: 2.000; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 14210; R: 0.998622; R²: 0.997246; Weighting: None; Equation: $Y = 3.50e+004 X - 1.42e+005$

Peak: ind

	Sample Name	Result Id	Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	10	14208	ind		10.000	200447.900	9.794	-2.06	No	No
2	30	14211	ind		30.000	968120.524	31.729	5.76	No	No
3	60	14212	ind		60.000	1922161.089	58.988	-1.69	No	No
4	75	14213	ind		75.000	2395752.686	72.520	-3.31	No	No
5	100	14214	ind		100.000	3426460.665	101.970	1.97	No	No

Figura 19. Curva de calibración y ecuación de la recta para IND $Y=3.50e^{+004}X-1.42e^{+005}$.

8.3 PREPARACIÓN DE LA FORMULACIÓN FINAL EN GEL

Para la preparación de la formulación en gel, primero se probó hacer un gel solamente con agua empleando carbopol, agua y trietanolamina. En este caso se prepararon 100mL utilizando las siguientes cantidades; 1g de Trietanolamina como agente entrelazante, 2g de carbopol (carbómero) y 100 mL de agua, obteniéndose el gel que se muestra a continuación.

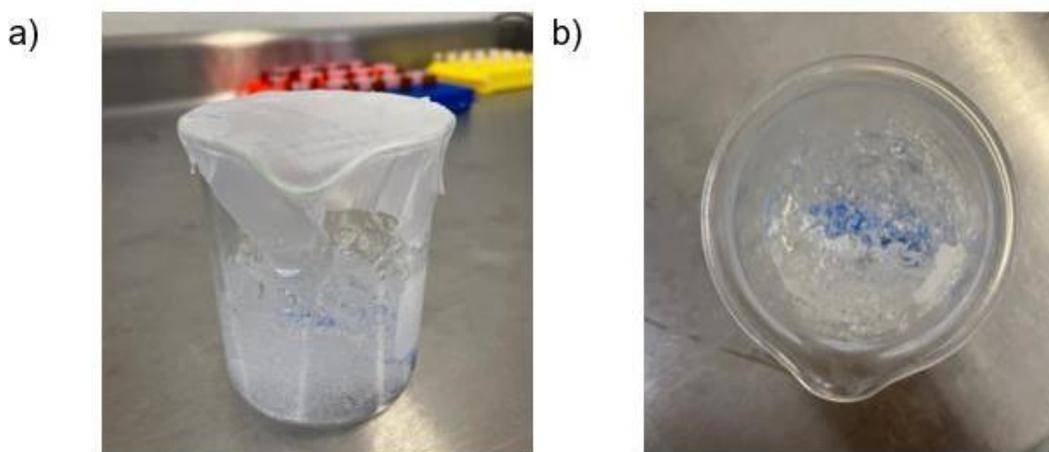


Figura 20. Aspecto del gel desde dos vistas.

En la Figura 20 a) se muestra el gel en medio acuoso vista vertical, Figura 20 b) vista al interior del recipiente para ver consistencia.

Para la preparación de la formulación final en gel se emplearon 260 mg de carbopol 950, trietanolamina 2 gotas, agua destilada 12 mL y 15 mL de formulación final nanoetosomas. Posterior a ello se agitó constantemente y se añadió el carbopol lentamente, hasta observar la formación del gel y la consistencia deseada (Figura 21).

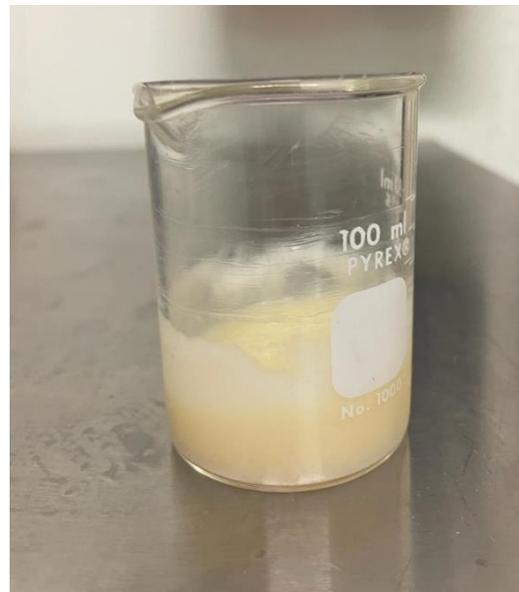


Figura 21. Productos obtenidos, imágenes de formulación final en gel Net- IND.

8.4 EVALUACIÓN DE EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN

Se prepararon muestras blanco de nanoetosomas con una relación peso volumen (2:40) de lecitina, solución hidroalcohólica sin indometacina NET y muestras con indometacina, misma relación, al 2% de indometacina. Posteriormente se almacenaron a 4°C y cuando se realizaron las distintas evaluaciones se centrifugaron a 12000 rpm aproximadamente por 10 min hasta observar la formación de un pellet en el fondo del tubo eppendorf. Se retiró el sobrenadante, se filtró en membrana de PTFE de 0.2 µm y se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (Figura 22). Los resultados fueron los siguientes (Tabla 10). Algo importante a mencionar es que se realizó una dilución 1:40 para que los resultados entraran dentro del límite de detección de mi curva de calibración ya que estos sobrepasaban la concentración detectable por la curva.

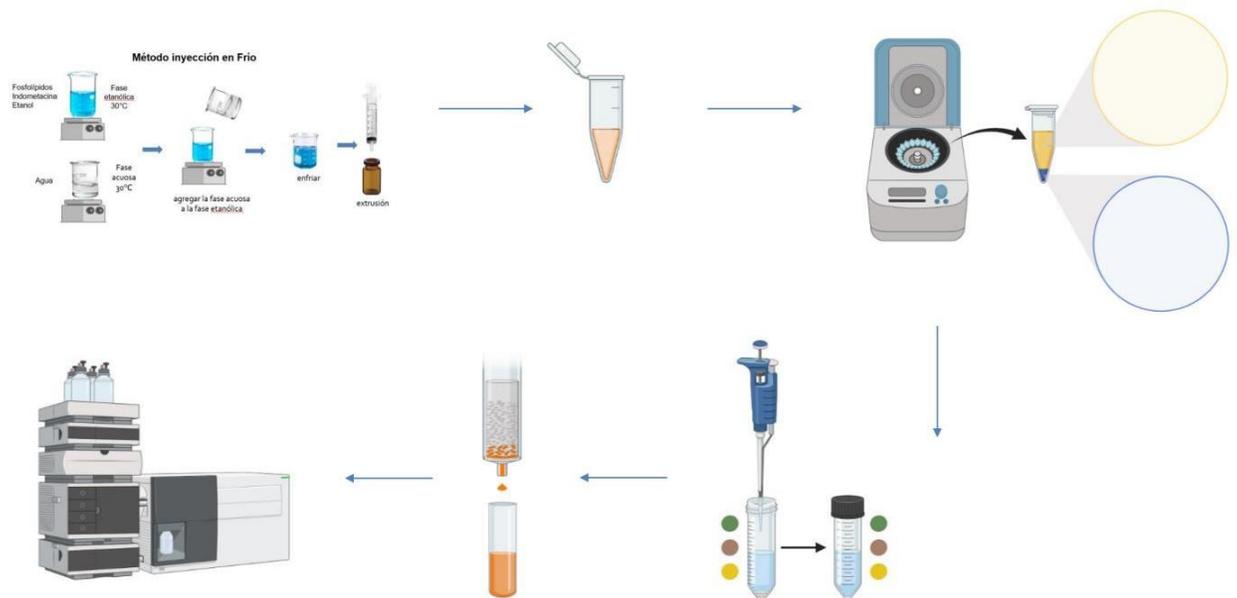


Figura 22. Esquema resumen evaluación de eficiencia de encapsulación.

La eficiencia de encapsulación se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula

$$\%EE = 100 \times \frac{W_{inicial} - W_{libre}}{W_{inicial}}$$

Donde:

w_{inicial} corresponde a la masa de IND inicial

w_{libre} a la masa libre después de agitación

Tabla 10. Eficiencia de encapsulación.

Experimento	% Lecitina	% IND	% Etanol	Concentración liberada de IND (µg/ mL)	Multiplicación por Factor de dilución (µg/ mL)	EE%
1	1	2	35	7.183	287.320	98.56
1	2	2	40	24.623	984.933	95.07
1	3	2	45	11.013	440.520	97.80
2	1	2	40	6.914	276.560	98.62
2	2	2	45	8.631	345.240	98.27
2	3	2	35	9.523	380.920	98.10
3	1	2	45	6.78	271.200	98.64
3	2	2	35	8.585	343.400	98.28
3	3	2	40	11.364	454.560	97.73

En la (Tabla 10) se puede apreciar que todas las eficiencias de encapsulación se encontraron por arriba del 95%, lo cual indica que la indometacina se está encapsulando en elevada cantidad en la nanoformulación.

8.5 EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN *IN-VITRO* EN MEMBRANA DE DIÁLISIS

8.5.1 LIBERACIÓN DE IND EN TÉRMINOS DE CONCENTRACIÓN

En la siguiente gráfica se observa la liberación en membrana de diálisis para cada una de las 9 formulaciones.

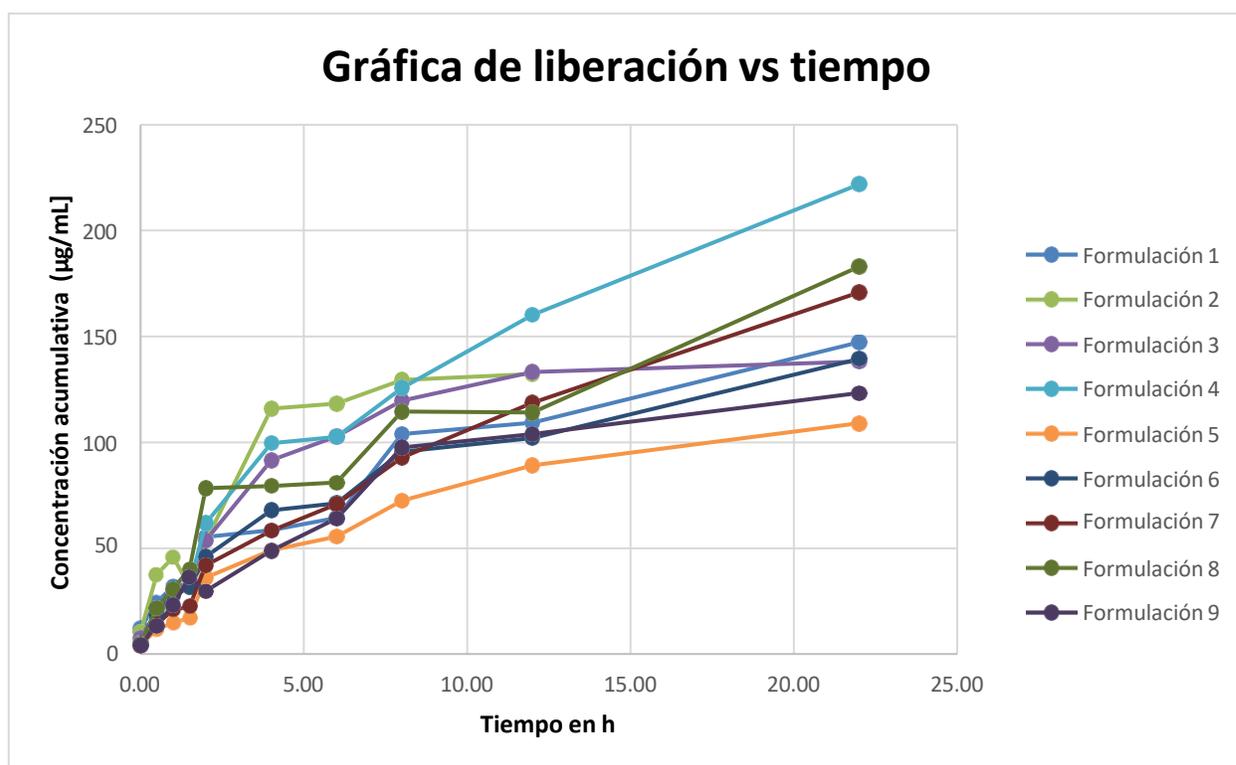
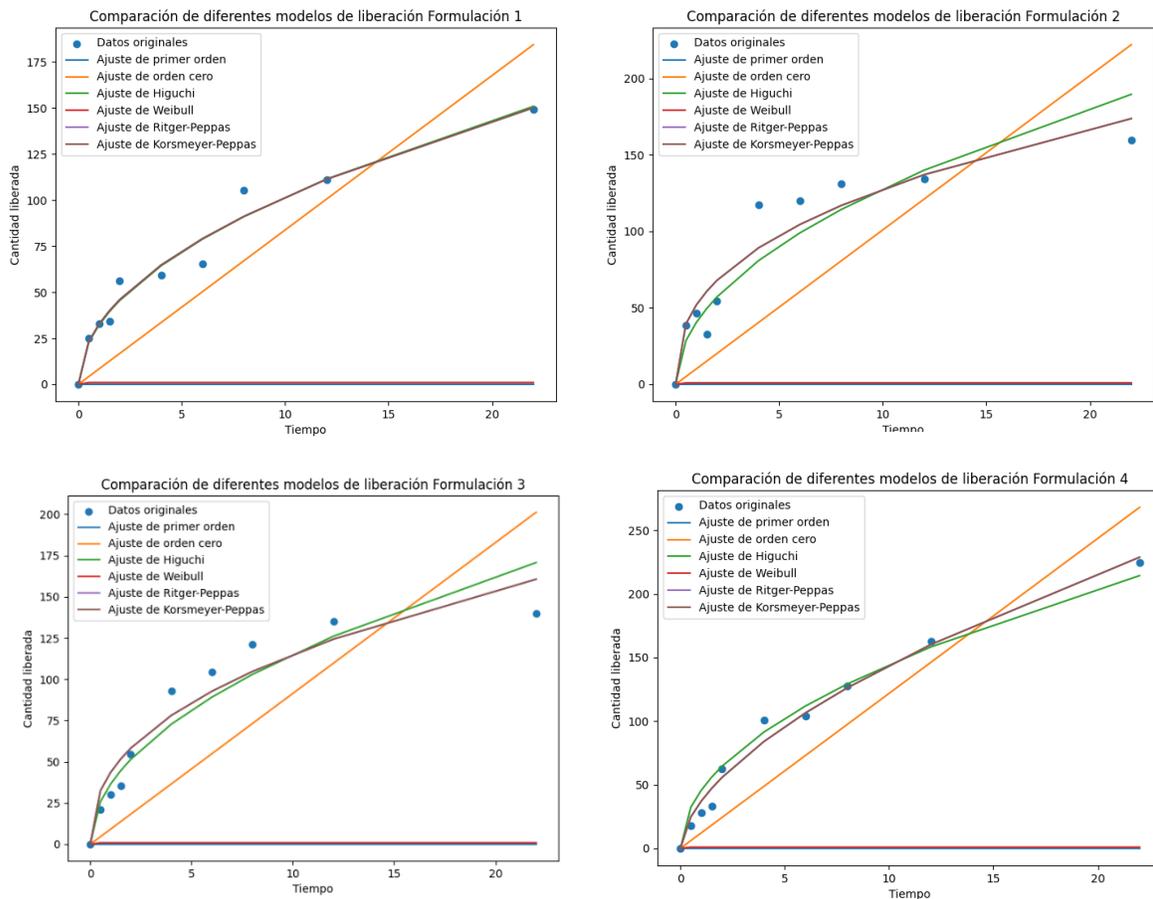


Figura 23. Perfil de liberación de indometacina de nanoetosomas en términos de concentración acumulativa de fármaco liberado en µg/mL contra el tiempo en horas.

En la gráfica superior (Figura 23) se observa la liberación para las formulaciones 1 a 9. Se aprecia que la mayor liberación acumulativa para la formulación 8 es de 183.018 µg/mL a las 12 hrs, siendo la liberación en este punto con respecto al punto previo de 68.946 µg/mL.

Además, se puede apreciar en la (Figura 23) que a mayor tiempo que transcurre efectivamente la concentración acumulativa es mayor y concuerda con una liberación modificada. Se consideró que la cinética de liberación corresponde con una de tipo fickiana (ecuación de Fick), ya que el valor del exponente de liberación difusiva fue de alrededor de 0.5 para cada una de las 9 formulaciones, este valor se calculó graficando el log de la concentración acumulativa contra el log del tiempo, lo cual indica una liberación fickiana en estado estacionario.

De igual forma se aproximó la liberación para las 9 formulaciones empleando distintos modelos.



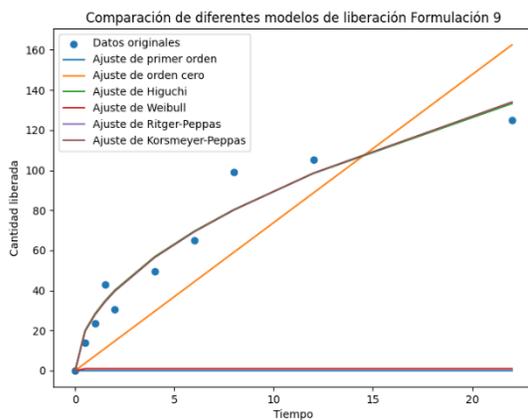
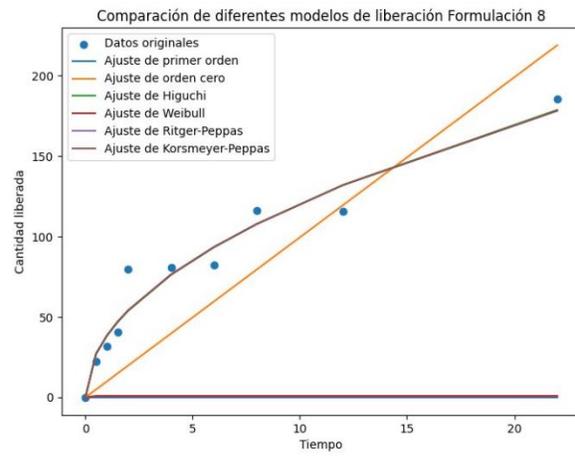
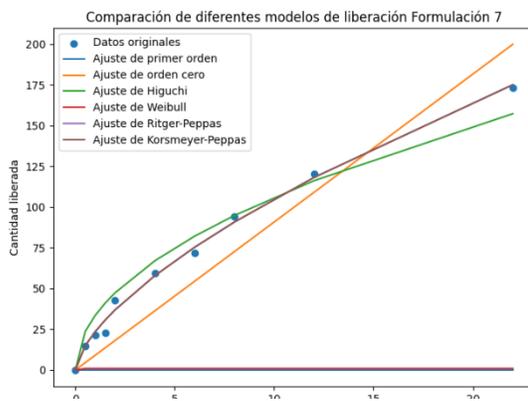
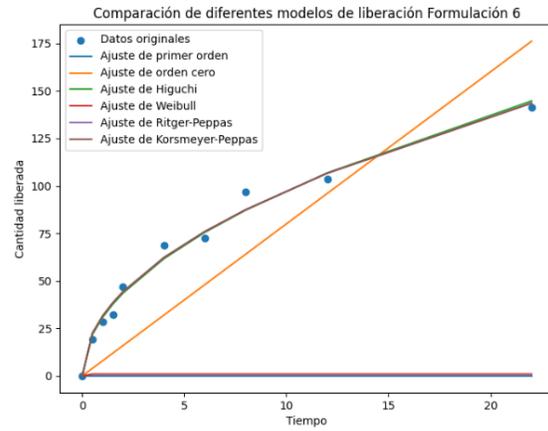
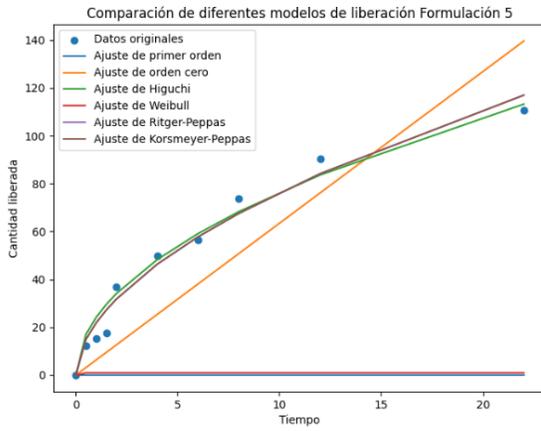


Figura 24. Gráficas aproximación a datos de liberación para 9 formulaciones por distintos métodos.

Siendo el modelo que mejor se ajusta para la formulación 8 el de Korsmayer Peppas con una n de 0.4962 sugiriendo una liberación de tipo Fickiana.

Modelo de Korsmayer- Peppas

$$F = \left(\frac{M_t}{M} \right) = K_m t^n$$

Donde:

Q(t) es la cantidad de fármaco liberado en el tiempo t.

K es una constante de liberación.

n es el exponente de liberación que depende del mecanismo de liberación.

8.5.2 RESULTADOS DE LIBERACIÓN EN TERMINOS DE % DE LIBERACIÓN

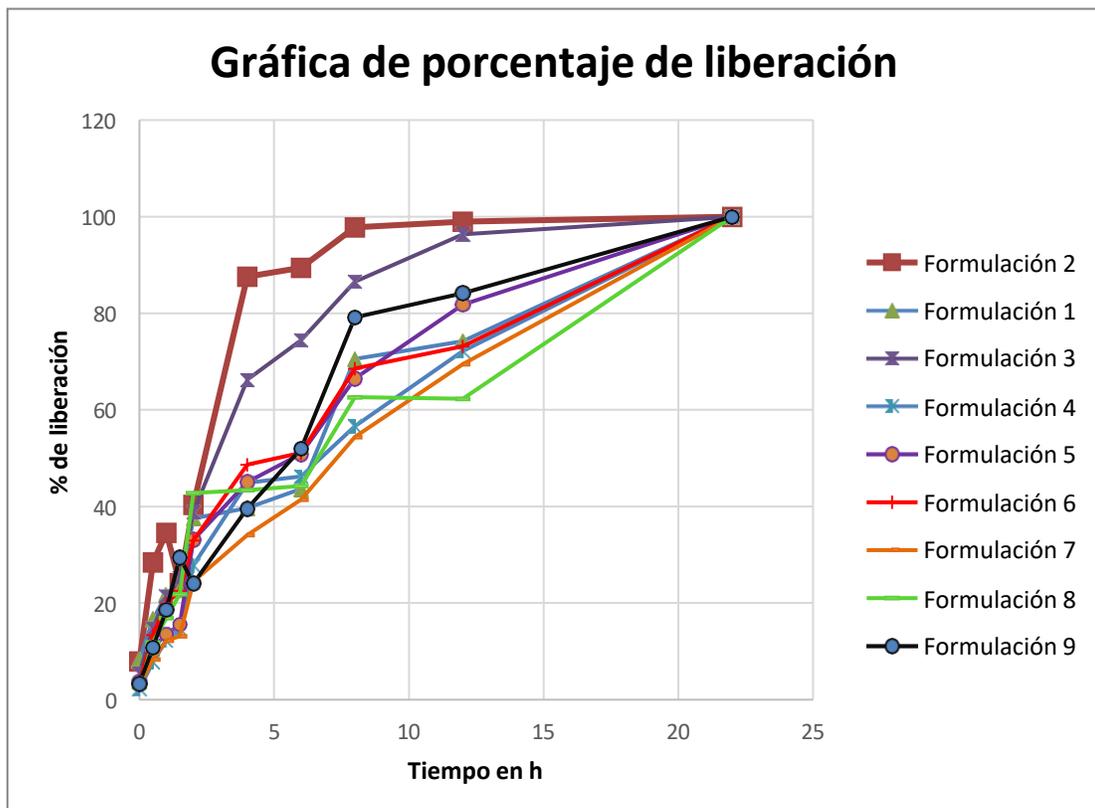


Figura 25. Gráfica de porcentaje de liberación contra tiempo en horas.

En la Figura 25 se puede apreciar que la mayoría de nanoformulaciones sobrepasa el 50% de liberación de IND al haber transcurrido 8 horas de experimento.

En la Tabla 11. Se muestra un resumen de las variables de respuesta, incluyendo la potencial zeta, tamaño de partícula y eficiencia de encapsulación para todas las combinaciones del diseño Taguchi empleado.

Tabla 11. Tabla que agrupa resultados de combinación Taguchi, %EE, potencial zeta y tamaño de partícula.

Orden de corrida	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Experimento	1	1	1	2	2	2	3	3	3
%Lecitina	1	2	3	1	2	3	1	2	3
%Etanol	35	40	45	40	45	35	45	35	40
%Eficiencia Encapsulamiento.	98.56	95.07	97.79	98.62	98.27	98.09	98.64	98.28	97.72
Potencial zeta (mV)	-21.7	-24.73	-24.23	-17.6	-5.69	-8.82	-21.96	-55.73	-8.61
Tamaño de partícula (nm)	448.56	460.26	466.29	571.73	537.83	555.1	741.93	158.5	578.7

8.6 COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE LIBERACIÓN MEDIANTE PRUEBA ESTADÍSTICA ANOVA DE UN FACTOR

A continuación, se muestran los resultados del análisis estadístico (ANOVA de un factor). Con estos datos se concluye que las diferencias entre formulaciones no son estadísticamente significativas ($p > 0.05$) y por lo tanto no hay variación significativa en términos de liberación entre las diferentes formulaciones de nanoetosomas. Al llegar a este punto conjuntar resultados de, Modelo: se optimizó (Taguchi) en función de potencial zeta y tamaño de partícula quedando una formulación con las siguientes características (tal % 2 de fosfolípidos y % 35 etanol).

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Formulación 1	10	641.172	64.1172	1875.03482
Formulación 2	9	675.237	75.0263333	2315.03764
Formulación 3	10	731.518	73.1518	2449.77728
Formulación 4	10	854.431	85.4431	4907.53829
Formulación 5	10	459.241	45.9241	1276.55146
Formulación 6	10	605.505	60.5505	1812.15768
Formulación 7	10	616.08	61.608	2813.99866
Formulación 8	10	748.283	74.8283	2859.84709
Formulación 9	10	544.507	54.4507	1701.34559

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	11694.0385	8	1461.75481	0.59728505	0.77741883	2.05637261
Dentro de los grupos	195786.559	80	2447.33199			

Dado que de las 9 formulaciones evaluadas no hubo diferencias en cuanto al % liberado se considera que la formulación optimizada en base al punto anterior posee las mejores propiedades de liberación *in vitro*. Por lo anterior se procedió a realizar la prueba comparativa permeación en piel de rata.

8.7 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PERMEACIÓN *IN-VITRO* EN CELDA DE DIFUSIÓN FRANZ

Como parte de la metodología planteada, y una vez corroborado la obtención de liposomas de tamaños definidos con y sin principio activo, se evaluó la permeación cutánea de Net-IND en un modelo *in vitro*, mediante el arreglo de la celda de difusión de Franz esquematizada en la Figura 26, además de una evaluación de su perfil de liberación mediante una curva de tiempo contra liberación acumulativa, corroborando así la funcionalidad del sistema.

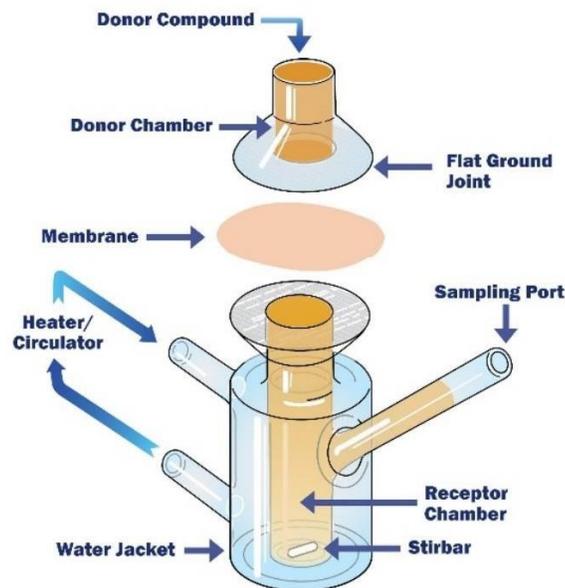


Figura 26. Celda de difusión tipo Franz.

Finalmente, el sistema de celdas de Franz con piel de rata como membrana de permeación se mantuvo en agitación constante a temperatura de 35°C y se tomaron muestras de 1 µL, reponiéndolas con 1 µL de PBS pH 7.14 cada hora hasta construir la gráfica de difusión. Los tiempos de muestreo fueron 0, 1, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 24 hrs. En la Figura 26 en color azul se aprecia el perfil de permeación de Net-IND y el perfil de permeación de Indaflex® en color rojo, medido en términos de concentración acumulativa vs tiempo en horas.

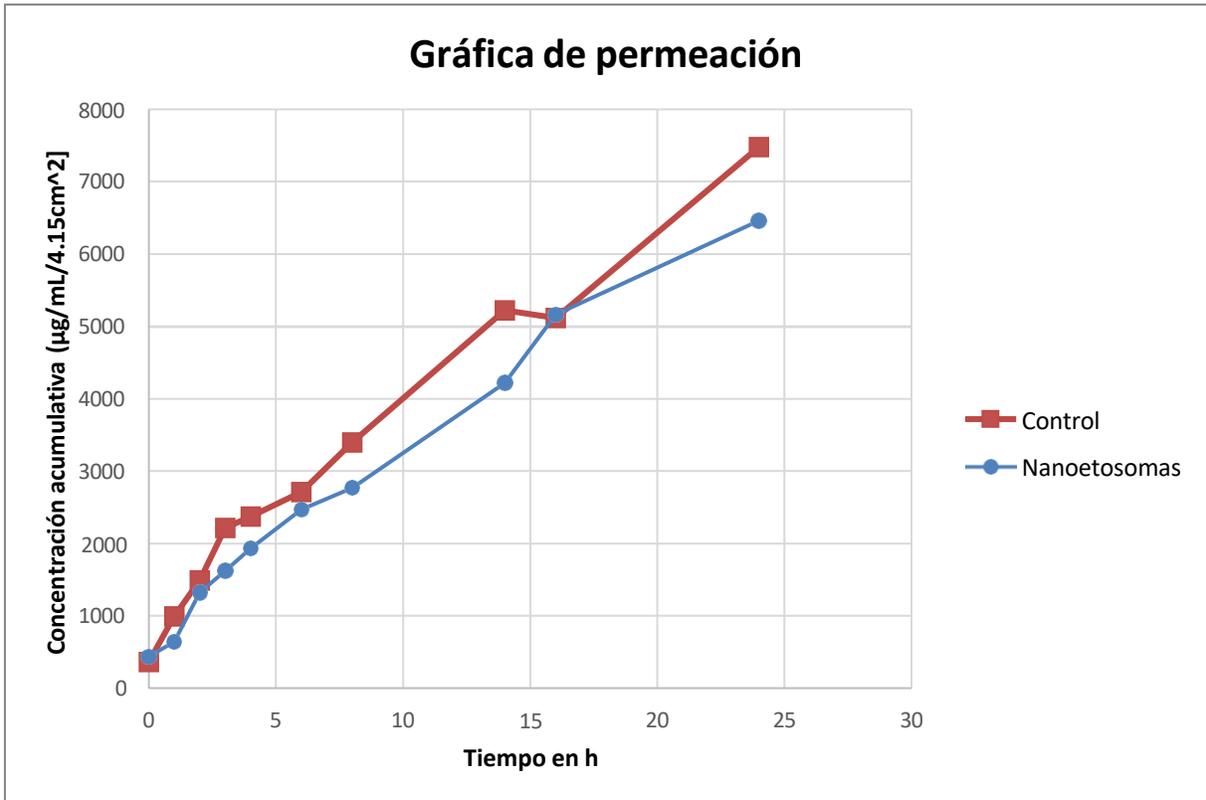


Figura 27. Gráfica comparativa del perfil de permeación de NeT-IND vs perfil de permeación de Indaflex®.

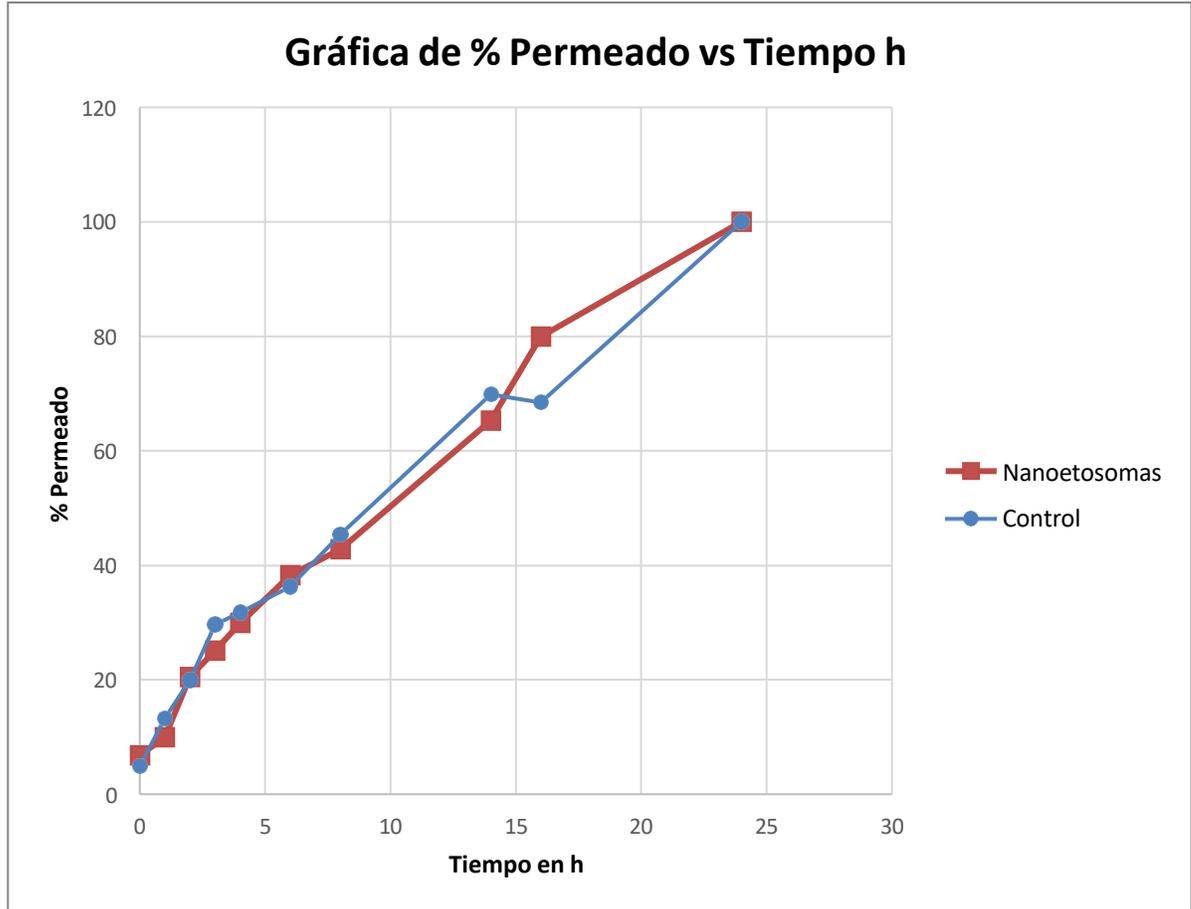


Figura 28. Gráfica comparativa del perfil de % permeación de Net-IND vs % de permeación de Indaflex®.

Por otra parte, en la Figura 28 se aprecia el porcentaje de permeación de Net-IND en color rojo contra el porcentaje de permeación de Indaflex® en color azul, se puede apreciar que las 10 horas de experimento ambas formulaciones alcanzan el 50% de formulación permeada.

Cálculo del flujo y constante de permeación

Para el cálculo del flujo se emplean dos aproximaciones por regresión lineal, una para los primeros 6 datos y la otra para los 4 restantes y la constante de permeación (K_p) se calculó dividiendo el flujo entre la concentración, todo ello se realizó mediante un

código en Python que se encuentra en la sección de anexos.

Tabla 12. Constantes de Permeación K1 y K2 para experimento de Franz.

	K1	K2
Net-IND 8	0.3579	0.03408
Net-IND 8	0.13119	0.02375
Net-IND 8	0.5666	0.02752
Promedio	0.2634	0.02845
Control	0.6657	0.0355
Control	0.3503	0.032
Control	0.3248	0.0339
Promedio	0.4469	0.0338

Las unidades de la constante de permeación son en cm/min, y se muestran en la Tabla, tanto el promedio para las 3 réplicas de la formulación final en gel seleccionada, como para las 3 réplicas de Indaflex®.

Tabla 13. Flujo (J) en ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$) para la formulación final en gel seleccionada (por triplicado) y para Indaflex® igualmente por triplicado.

	J tiempo 1 –6	R ²	J tiempo 7 – 10	R ²
	($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$)		($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$)	

Net-IND 8	0.012171	0.9927	0.006954	0.9644
Net-IND 8	0.006559	0.9528	0.004916	0.9999
Net-IND 8	0.006799	0.9796	0.005587	0.9780
Promedio	0.008509		0.005819	
Control	0.013314	0.9873	0.00803	0.9718
Control	0.015414	0.9894	0.00737	0.9815
Control	0.011371	0.9888	0.00618	0.969
Promedio	0.013366		0.00719	

8.8 VISTA AL MICROSCOPIO ÓPTICO

En la imagen (Figura 29) al microscopio óptico se pueden observar pequeños puntos esféricos que son los nanoetosomas sin IND. En la imagen (Figura 30) al microscopio óptico se aprecian nanoetosomas de mayor tamaño, esto se la atribuye a la incorporación de la indometacina. La tercera imagen (Figura 31) se muestra una vista al microscopio óptico de la crema comercial Indaflex® de indometacina, que no contiene nanoetosomas. En esta imagen, no se observan estructuras esféricas o vesículas características de los nanoetosomas presentes en las figuras anteriores.

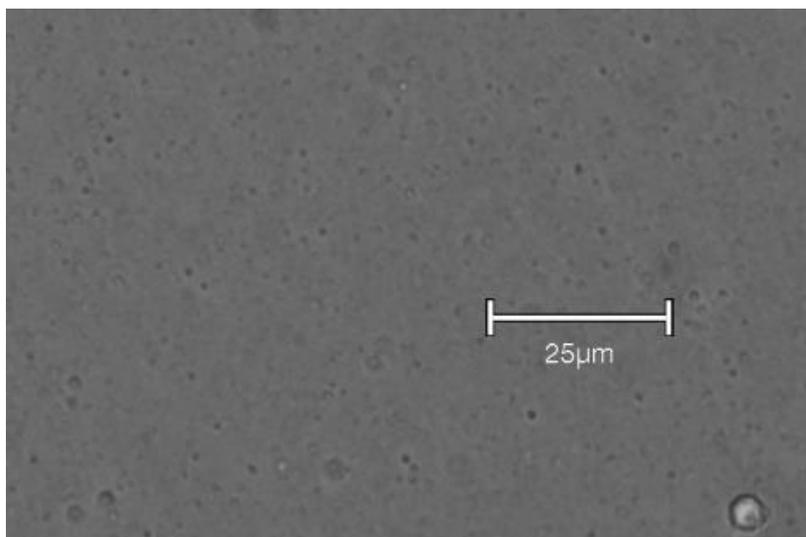


Figura 29. Vista al microscopio óptico (40X) de nanoetosomas sin IND.

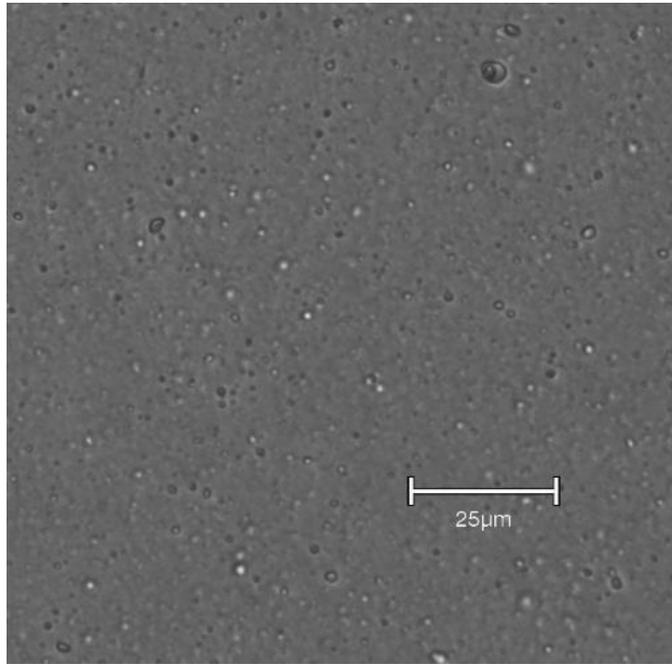


Figura 30. Vista al microscopio óptico (40X) de nanoetosomas con IND.

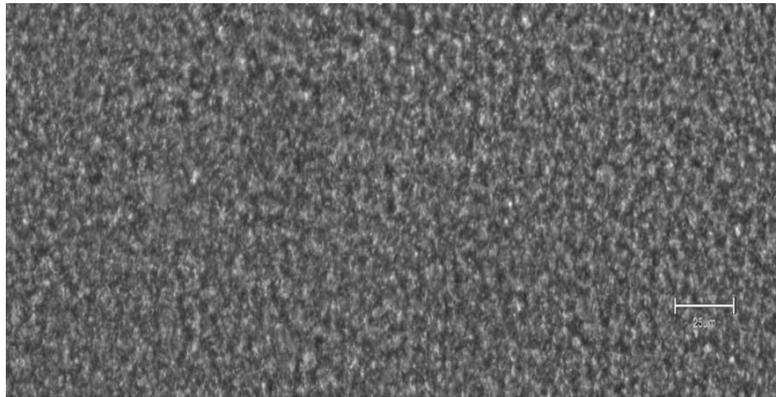


Figura 31. Vista al microscopio óptico (40X) de la formulación comercial.

9 DISCUSIÓN

Es bien conocido que las enfermedades reumáticas ocasionan daños tanto en las personas afectadas como en sus seres queridos. Para su tratamiento la indometacina se suele emplear de manera tópica, ya que disminuye los síntomas asociados al inhibir las COX. Sin embargo, comercialmente en México solo existe la formulación Indaflex®, que se caracteriza por ser una crema con concentración de Indometacina al 2.5%. Para superar los obstáculos biofarmacéuticos, hemos optado por desarrollar una nanoformulación de nanoetosomas transdérmicos de indometacina (IND), que es un sistema de transporte de fármacos útil en nanomedicina. Esta estrategia se basa en la incorporación de etanol en la estructura de los nanoetosomas, lo que les confiere una mayor flexibilidad y, por ende, reduce el riesgo de ruptura. Este aumento en la flexibilidad se traduce en una mayor capacidad de penetración en comparación con los liposomas convencionales [Paiva-Santos et al., 2021b].

En la literatura se ha utilizado formulaciones liposomales para aplicaciones transdérmicas de fármacos tipo AINEs. Por ejemplo, Ghanbarzadeh y Arami [2013] encapsularon diclofenaco en sistemas liposomales, obteniendo eficiencias de encapsulamiento entre 42.61% y 51.72% y tamaños de vesícula entre 145 y 202 nm. Otro estudio realizado por [Gaur et al., 2014] encapsuló aceclofenaco en sistemas liposomales para aplicaciones transdérmicas, obteniendo potenciales zeta entre 16-25 mV, eficiencia de encapsulación de 78.9% y tamaño de partícula de 147 nm.

Considerando que se ha reportado que la indometacina tiene una potencia farmacéutica elevada en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, superior a la de otros AINEs [Gliszczynska & Nowaczyk, 2021], lo que se traduciría en una mayor reducción de la inflamación y el alivio del dolor [Evans et al., 2021], es claro que contar con formulaciones de uso tópico que incluyan este AINE aportarían a la terapéutica de padecimientos inflamatorios. En ese sentido [Ricci et al., 2005] propusieron el

encapsulamiento de indometacina en sistemas lipídicos basados en una mezcla de mono-, di-, y triglicéridos de ácido behénico (Compritol®) de tamaño nanométrico con capacidad de absorción percutánea. Ese sistema permitió una tasa máxima de permeación de $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en comparación con los $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ que se obtuvo en nuestro estudio.

En el presente estudio, se eligieron componentes principales de la nanoformulación: lecitina, etanol y agua por las características deseadas en el constructo, en tanto que se seleccionó el método en frío para el ensamblaje de los Net-IND debido a sus ventajas: preservación de fármacos sensibles al calor, mayor eficiencia de encapsulación, menor riesgo de degradación química [Surdana et al., 2021]. Con la finalidad de optimizar el diseño de los nanoetosomas, se utilizó un diseño de experimentos Taguchi L9 (3^3) que considera las variables de respuesta: potencial zeta y tamaño de partícula. Tales variables fueron seleccionadas debido a que se sabe que en el rango de valores de potencial zeta menores a -30 mV y con tamaños de partícula menores a 200 nm las nanoestructuras presentan propiedades favorables como mayor estabilidad que facilitarían el paso a través de las capas de piel [Villarreal et al., 2022].

En nuestro caso, la formulación de Net-IND se optimizó cuando se usó una mezcla de 2% de lecitina y 35% de etanol (formulación número 8). Las propiedades críticas de esta formulación: partículas con tamaño promedio de 158 nm y potencial zeta negativo de -58 mV sugieren que esta podría ser de utilidad en una futura formulación para uso terapéutico, ya que trabajos previos han demostrado que tamaños menores a 300 nm son eficaces en un sistema liposomal para el transporte de fármacos por vía transdérmica, mientras que potenciales zeta superiores a $+50 \text{ mV}$ o inferiores a -50 mV se han asociado con partículas estables [Chavarría Rojas et al., 2022; Mayoral et al., 2014].

Respecto del proceso de liberación de IND desde el sistema Net-IND desarrollado, este resultó controlado alcanzando el 50% de liberación en un plazo de 8 horas y continuó hasta las 24 horas. El comportamiento de liberación controlada resultó de tipo fickiano y el exponente de liberación difusional fue de alrededor de 0.5, lo que indica que la liberación de IND de los nanoetosomas es lineal y se da por difusión, esto sugiere que dicha liberación es predecible por la ecuación de Fick [Chourasia et al., 2011].

Por lo tanto, nuestro sistema de Net-IND, además de observar la morfología esférica de los nanoetosomas y distribución adecuada al microscopio óptico, mostró una eficiencia de encapsulación superior al 95% y perfiles de liberación adecuados, lo cual representa una ventaja con importantes implicaciones farmacológicas y clínicas. Esta característica sugiere la posibilidad de establecer un régimen de dosificación más conveniente y efectivo en comparación con otras formas farmacéutica como la oral o aún la tópica actualmente disponible, que requiere ser administrada cada 6 u 8 horas [Andromaco, 2023]. En este contexto la nanoformulación es mejor por los siguientes puntos:

- Dosificación conveniente: La liberación controlada del fármaco que se mantiene durante un período de 24 horas indica que, en teoría, un solo suministro diario puede ser suficiente para mantener una concentración terapéutica efectiva del fármaco en el cuerpo. Esto simplifica la administración para los pacientes, evitando la necesidad de tomar medicamentos repetidamente a lo largo del día [Domínguez, 2008].
- Mejora de la adherencia: Un régimen de dosificación una vez al día tiene el potencial de mejorar la adherencia del paciente al tratamiento. La necesidad de recordar y tomar medicamentos con menos frecuencia puede aumentar la probabilidad de que los pacientes sigan el plan de tratamiento correctamente, lo

que es esencial para lograr resultados terapéuticos óptimos [Dilla et al., 2009].

- Estabilidad de los niveles sanguíneos: La liberación continua y sostenida del fármaco a lo largo del día puede ayudar a mantener niveles sanguíneos más estables y uniformes en comparación con dosis más frecuentes. Esto puede resultar en un control más eficaz de los síntomas o la afección médica en cuestión [UAG, 2021].

Una vez que se caracterizó el sistema nanoetosomal de IND, se procedió a vehiculizarlo en forma de un gel usando carbopol y trietanolamina. Ese sistema ha sido previamente descrito en diversos trabajos por las ventajas que ofrece: adecuada viscosidad, buena tolerancia cutánea, estabilidad de la formulación, y principalmente por la compatibilidad con los materiales de los nanoetosomas [Muñiz y Cervantes-Martínez, 2012]. Hablando de biocompatibilidad, estos, suelen ser componentes de los geles antibacteriales comerciales, siempre y cuando estén en concentraciones adecuadas, y mientras la persona no padezca de hipersensibilidad a los componentes, son seguros para su uso en piel [Aleph, 2021]. Entre las ventajas que ofrece un gel como vehículo de un fármaco se encuentran mejora de la biodisponibilidad, minimización de efectos sistémicos, comodidad de aplicación para el paciente y protección del fármaco [Hernández-Adame et al., 2021].

Finalmente, el sistema de Net-IND vehiculizado en gel se comparó respecto de las propiedades de permeación frente al producto de uso tópico actualmente disponible en México, Indaflex® de Laboratorios Andrómaco. Se utilizó piel de rata (procedente de una donación) en el sistema de celdas de Franz, en lugar de una membrana artificial debido a, entre otras ventajas, el realismo del fenómeno biológico: la piel real proporciona un modelo más realista y fisiológicamente relevante en comparación con las membranas artificiales [Takeuchi et al., 2011]. Esto significa que los resultados del

experimento pueden reflejar de manera más precisa cómo interactúan los compuestos con la piel en un entorno biológico. Esto es, la piel real puede replicar de manera más precisa las propiedades de la barrera cutánea, incluida su permeabilidad y resistencia a la penetración de sustancias químicas [Schmidt et al., 2020]. Este escenario de evaluación ha sido previamente empleado por diversos autores [Komatsu & Sakurada, 2012; Leanpolchareanchai & Teeranachaideekul, 2023] los cuales han descrito las ventajas de evaluar la penetración transdérmica con piel real de rata y ratón como predictores de la eficacia de formulaciones para uso tópico.

Ahora bien, la absorción percutánea del fármaco es un proceso que implica pasos tales como (i) la disolución y liberación del fármaco desde el vehículo/formulación, (ii) la partición del fármaco en el estrato córneo, (iii) la difusión del fármaco solubilizado a través del estrato córneo y (iv) la penetración del fármaco en las capas de la piel. El objetivo en el desarrollo de cualquier formulación de fármaco tópico/transdérmico es lograr el máximo flujo (flux) a través de la piel sin ninguna acumulación de fármaco [Milanowski B et al., 2021]. En nuestro estudio, se demostró que el flux promedio del sistema Net-IND 8 fue similar al de la formulación control (0.0085 vs 0.0136 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$), es decir, la tasa de permeación del sistema Net-IND pareció ser menor a la de Indaflex®. Este resultado podría explicarse considerando la alta cantidad de etanol (alrededor del 30%) empleada en la elaboración y en la solubilización completa de IND en el gel. El etanol, de hecho, puede influir en la absorción percutánea mejorando la solubilidad del fármaco en la matriz del estrato córneo. Los potenciadores de la penetración, como el etanol, se usan ampliamente para aumentar el flujo del fármaco a través de la piel y numerosas formulaciones tópicas que contienen AINEs poco solubles. Aunque este estudio no incluyó evaluaciones del efecto *in vivo* de la formulación, otros trabajos han sugerido que las formulaciones liposomales (y nanoliposomales) permitirían la formación de un reservorio en el estrato corneo capaz de garantizar la liberación sostenida del fármaco hacia las capas más profundas de la piel, generando así un efecto farmacológico prolongado. En su conjunto, los resultados

de nuestro sistema Net-IND mostraron un buen perfil de permeación de IND, al menos comparable con Indaflex®. La relevancia de lo anterior es significativa por varias razones:

- Eficiencia de entrega: la semejanza en el perfil de permeación sugiere que la nanoformulación de nanoetosomas de indometacina en gel tiene el potencial de administrar el fármaco de manera efectiva a través de la piel, de manera similar a una formulación comercialmente exitosa como Indaflex®. Esto es importante porque demuestra que la nanoformulación podría ser una alternativa eficaz para los pacientes [Andleeb et al., 2021].
- Competitividad y desarrollo de medicamentos: para los desarrolladores de medicamentos, lograr un perfil de permeación similar al de una formulación comercial existente es un indicio positivo de que su nuevo producto tiene el potencial de competir en el mercado [Dea Herrera Ruiz, 2011].
- Facilitación de aprobación regulatoria: al demostrar que la nanoformulación tiene un perfil de permeación similar al de una formulación ya aprobada y ampliamente utilizada, podría simplificar el proceso de aprobación regulatoria, ya que se podría utilizar la experiencia previa con el fármaco en términos de seguridad y eficacia como base para la aprobación [Panalytical, 2023].

Queda pendiente para estudio futuros la evaluación del efecto farmacológico *in vivo* de nuestra formulación de Net-IND en comparación con Indaflex® u otros productos conteniendo AINEs de uso tópico, para demostrar que el perfil favorable aquí demostrado.

10 CONCLUSIONES

Se desarrolló un nanosistema de liberación de indometacina (nanoetosomas) vehiculizada en un gel de carbopol, optimizado a través de un diseño de experimentos

Taguchi L9(3³) que contiene una concentración de 2% de lecitina y 35% de etanol, presentando tamaño de partícula de 158.5 nm y un potencial zeta -55.73 mV. Los perfiles de liberación de IND en el sistema Net-IND muestran una liberación controlada del fármaco, siendo el modelo que mejor se ajusta para la formulación 8 el de Korsmeyer Peppas con una n de 0.4962 sugiriendo una liberación de tipo Fickiana. Estas características fisicoquímicas son teóricamente favorables y se pudo demostrar que el sistema Net-IND presenta un perfil de permeación semejante al de una formulación comercialmente disponible en una concentración de IND de 2.5% (Indaflex®).

11 REFERENCIAS

- [1] MedlinePlus, “Capas de la piel: MedlinePlus enciclopedia médica ilustración,” *MedlinePlus*, 2022. https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/8912.htm (accessed Mar. 23, 2023).
- [2] H. M. S. Julia Benedetti , MD, “Estructura y funcionamiento de la piel - Trastornos de la piel - Manual MSD versión para público general,” 2021. <https://www.msmanuals.com/es-mx/hogar/trastornos-de-la-piel/biología-de-la-piel/estructura-y-funcionamiento-de-la-piel> (accessed Jul. 12, 2023).
- [3] H. Yousef, M. Alhaji, and S. Sharma, “Anatomy, Skin (Integument), Epidermis,” *StatPearls*, Nov. 2022, Accessed: Jul. 13, 2023. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>.
- [4] M. del P. García-Corvillo, “Nanopartículas poliméricas de administración intranasal para la liberación de activos en el sistema nervioso central,” *Ars Pharm.*, vol. 57, no. 1, pp. 27–35, Mar. 2016, doi: 10.30827/ARS.V57I1.4384.
- [5] K. C. Madison, “Barrier function of the skin: ‘la raison d’être’ of the epidermis,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 121, no. 2, pp. 231–241, Aug. 2003, doi: 10.1046/J.1523-1747.2003.12359.X.
- [6] et. al. Brunton L. L., Chabner B.A., *Las bases farmacológicas de La Terapéutica*, 13th ed. 2012.
- [7] B. G. Katzung y Susan B. Masters, “Basic & Clinical Pharmacology, Fourteenth Edition,” *Basic Clin. Pharmacol.*, pp. 1497–1509, 2018, Accessed: Sep. 20, 2023. [Online]. Available: www.mhprofessional.com.
- [8] L. Brunton and R. Hilal-Dandan, “Las bases farmacológicas de la terapéutica Goodman & Gilman,” *Mc Graw Hill Educ.*, vol. Decimo cua, p. 1441, 2017.
- [9] G. Hijos-Mallada, C. Sostres, and F. Gomollón, “AINE, toxicidad gastrointestinal y enfermedad inflamatoria intestinal,” *Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 45, no. 3, pp. 215–222, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.GASTROHEP.2021.06.003.
- [10] S. Theimer, “Relación entre riesgo de enfermedad cardíaca y AINES,” *MAYO CLINIC*, 2017. <https://newsnetwork.mayoclinic.org/es/2017/07/25/relacion-entre-riesgo-de-enfermedad-cardiaca-y-aines/> (accessed Jul. 13, 2023).
- [11] A. Martinez, “Boletín 351. Interacciones Medicamentosas de los AINES,” 2021. <http://www.draurelio.com.mx/boletin-351-interacciones-medicamentosas-de-los-aines/> (accessed Jul. 13, 2023).

- [12] K. Brune and P. Patrignani, "New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs," *J. Pain Res.*, vol. 8, pp. 105–118, Feb. 2015, doi: 10.2147/JPR.S75160.
- [13] AEP, "Indometacina. Asociación Española de Pediatría," 2020. <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/indometacina> (accessed Jul. 15, 2023).
- [14] L. Helleberg, "Clinical Pharmacokinetics of indomethacin," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 6, no. 4, pp. 245–258, 1981, doi: 10.2165/00003088-198106040-00001.
- [15] ASHP, "Indometacina: MedlinePlus medicinas," *Biblioteca Nacional de Medicina*, 2021. <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a681027-es.html> (accessed Jul. 13, 2023).
- [16] M. L. Mcpherson and N. M. Cimino, "Topical NSAID formulations," *Pain Med.*, vol. 14 Suppl 1, no. SUPPL1, 2013, doi: 10.1111/PME.12288.
- [17] M. Panalytical, "Nanotecnología farmacéutica para formulación de medicamentos, Malvern Panalytical," 2023. <https://www.malvernpanalytical.com/es/industries/pharmaceuticals/pharmaceutical-formulation-development/liposomes-nanoparticles> (accessed Sep. 13, 2023).
- [18] AEMPS, "PROSPECTO REUSIN 8 MG/ML SOLUCIÓN PARA PULVERIZACIÓN CUTÁNEA," 2023. .
- [19] M. Ricci, C. Puglia, F. Bonina, C. Di Giovanni, S. Giovagnoli, and C. Rossi, "Evaluation of indomethacin percutaneous absorption from nanostructured lipid carriers (NLC): in vitro and in vivo studies," *J. Pharm. Sci.*, vol. 94, no. 5, pp. 1149–1159, 2005, doi: 10.1002/JPS.20335.
- [20] J. Ma *et al.*, "Tissue distribution and dermal drug determination of indomethacin transdermal-absorption patches," *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 7, no. 5, pp. 617–624, Oct. 2017, doi: 10.1007/S13346-017-0392-5.
- [21] NIH, "Nanotecnología," 2023. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Nanotecnologia> (accessed Mar. 28, 2022).
- [22] J. Wang *et al.*, "Field application of nanoliposomes delivered quercetin by inhibiting specific hsp70 gene expression against plant virus disease," *J. Nanobiotechnology*, vol. 20, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/S12951-021-01223-6.
- [23] S. Ferraris, M. Cazzola, V. Peretti, B. Stella, and S. Spriano, "Zeta Potential Measurements on Solid Surfaces for in Vitro Biomaterials Testing: Surface Charge, Reactivity Upon Contact With Fluids and Protein Absorption," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 6, no. MAY, p. 60, May 2018, doi: 10.3389/FBIOE.2018.00060.
- [24] M. Chavarría Rojas, N. Vega-Sánchez, M. F. Montero-Jara, R. Marín-Fajardo, and M. Chavarría-

- Rojas, "Liposomas en el desarrollo de formas farmacéuticas semisólidas," *Ars Pharm.*, vol. 63, no. 4, pp. 372–386, Sep. 2022, doi: 10.30827/ARS.V63I4.26059.
- [25] A. C. Paiva-Santos *et al.*, "Ethosomes as Nanocarriers for the Development of Skin Delivery Formulations," *Pharm. Res.*, 2021, doi: 10.1007/S11095-021-03053-5.
- [26] T. A. Ismail, T. M. Shehata, D. I. Mohamed, H. S. Elsewedy, and W. E. Soliman, "Quality by Design for Development, Optimization and Characterization of Brucine Ethosomal Gel for Skin Cancer Delivery," *Molecules*, vol. 26, no. 11, Jun. 2021, doi: 10.3390/MOLECULES26113454.
- [27] C. K. Song, P. Balakrishnan, C. K. Shim, S. J. Chung, S. Chong, and D. D. Kim, "A novel vesicular carrier, transethosome, for enhanced skin delivery of voriconazole: characterization and in vitro/in vivo evaluation," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 92, pp. 299–304, Apr. 2012, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2011.12.004.
- [28] K. K. Mishra *et al.*, "Transethosomes and Nanoethosomes: Recent Approach on Transdermal Drug Delivery System," *Nanomedicines*, Feb. 2019, doi: 10.5772/INTECHOPEN.81152.
- [29] A. Zeb *et al.*, "Potential of nanoparticulate carriers for improved drug delivery via skin," *J. Pharm. Investig.*, vol. 49, no. 5, pp. 485–517, Sep. 2019, doi: 10.1007/S40005-018-00418-8.
- [30] R. A. Rozendal, T. H. J. A. Sleutels, H. V. M. Hamelers, and C. J. N. Buisman, "Effect of the type of ion exchange membrane on performance, ion transport, and pH in biocatalyzed electrolysis of wastewater," *Water Sci. Technol.*, vol. 57, no. 11, pp. 1757–1762, Jun. 2008, doi: 10.2166/WST.2008.043.
- [31] S. H. Abd El-Alim, A. A. Kassem, M. Basha, and A. Salama, "Comparative study of liposomes, ethosomes and transfersomes as carriers for enhancing the transdermal delivery of diflunisal: In vitro and in vivo evaluation," *Int. J. Pharm.*, vol. 563, pp. 293–303, May 2019, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2019.04.001.
- [32] A. Gouda, O. S. Sakr, M. Nasr, and O. Sammour, "Ethanol injection technique for liposomes formulation: An insight into development, influencing factors, challenges and applications," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 61, p. 102174, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.JDDST.2020.102174.
- [33] N. Mendoza-Muñoz, S. Alcalá-Alcalá, and D. Quintanar-Guerrero, "Preparation of Polymer Nanoparticles by the Emulsification-Solvent Evaporation Method: From Vanderhoff's Pioneer Approach to Recent Adaptations," *Polym. Nanoparticles Nanomedicines*, pp. 87–121, 2016, doi: 10.1007/978-3-319-41421-8_4.
- [34] Y. Thabet, M. Elsabahy, and N. G. Eissa, "Methods for preparation of niosomes: A focus on thin-film hydration method," *Methods*, vol. 199, pp. 9–15, Mar. 2022, doi:

10.1016/J.YMETH.2021.05.004.

- [35] N. Chauhan *et al.*, "Ethosomes: A novel drug carrier," *Ann. Med. Surg.*, vol. 82, p. 104595, Oct. 2022, doi: 10.1016/J.AMSU.2022.104595.
- [36] M. J. Rosen and J. T. Kunjappu, "Surfactants and Interfacial Phenomena: Fourth Edition," *Surfactants Interfacial Phenom. Fourth Ed.*, Jan. 2018, doi: 10.1002/9781118228920.
- [37] K. M. Berthely Cardoso and N. G. Rojano, "Factores que influyen en la estimación del tamaño de partícula promedio por dispersión de luz dinámica para nanopartículas," *Simp. Metrol.*, 2016.
- [38] F. Paraguay-Delgado and F. Paraguay-Delgado, "Técnicas de microscopía electrónica usadas en el estudio de nanopartículas," *Mundo nano. Rev. Interdiscip. en nanociencias y nanotecnología*, vol. 13, no. 25, pp. 101–131, Jun. 2020, doi: 10.22201/CEIICH.24485691E.2020.25.69626.
- [39] S. Benjamin, S. Sharma, and R. Ameta, "Nanomaterials," *Microwave-Assisted Org. Synth. A Green Chem. Approach*, pp. 287–309, 2014, doi: 10.1201/b17953.
- [40] J. B. Mayoral, A. C. Moreno, and E. San Martín-Martínez, "Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas I. INTRODUCCIÓN," *Am. J. Phys. Educ*, vol. 8, no. 4, 2014, Accessed: Jul. 16, 2023. [Online]. Available: <http://www.lajpe.org>.
- [41] J. Deprez *et al.*, "Transport by circulating myeloid cells drives liposomal accumulation in inflamed synovium," *Nat. Nanotechnol.* 2023, pp. 1–10, Jul. 2023, doi: 10.1038/s41565-023-01444-w.
- [42] J. J. J.-S. et. al Carlos T. Quirino-Barreda, César Gazga-Urioste, "Vista de Cristales líquidos liotrópicos. Nanoestructuras biomiméticas para uso tópico medicinal. Mundo Nano.," *Rev. Interdiscip. en Nanociencias y Nanotecnología*, vol. 10, 2017, Accessed: Jul. 15, 2023. [Online]. Available: <http://mundonano.unam.mx/ojs/index.php/nano/article/view/57559/61662>.
- [43] A. C. Paiva-Santos *et al.*, "Ethosomes as Nanocarriers for the Development of Skin Delivery Formulations," *Pharm. Res.*, 2021, doi: 10.1007/s11095-021-03053-5.
- [44] P. K. Gaur, S. Mishra, and V. Aeri, "Formulation and evaluation of guggul lipid nanovesicles for transdermal delivery of aceclofenac," *ScientificWorldJournal.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/534210.
- [45] A. Gliszczyńska and M. Nowaczyk, "Lipid formulations and bioconjugation strategies for indomethacin therapeutic advances," *Molecules*, vol. 26, no. 6, 2021, doi: 10.3390/molecules26061576.
- [46] P. Evans, D. O'Reilly, J. N. Flyer, R. Soll, and S. Mitra, "Indomethacin for symptomatic patent ductus arteriosus in preterm infants," *Cochrane Database Syst. Rev.*, vol. 2021, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1002/14651858.CD013133.PUB2.

- [47] G. J. Surdana, K. Arshad, A. Khan, P. R. Prakash, and N. Vijaya Bhaskar, "Nanoethosomes: A Novel Revolutionary Approach for Transdermal Drug Delivery," *Saudi J Med Pharm Sci*, vol. 7, no. 2, pp. 91–101, 2021, doi: 10.36348/sjmps.2021.v07i02.004.
- [48] O. S. Villarreal, A. I. Domínguez, A. Faustino-Vega, C. T. Quirino-Barreda, P. García-Gutiérrez, and J. E. Miranda-Calderón, "Caracterización fisicoquímica y evaluación in vitro de Sistemas autoemulsionables de liberación de Indometacina," *Rev. Colomb. Ciencias Químico-Farmacéuticas*, vol. 51, no. 1, pp. 185–212, Jul. 2022, doi: 10.15446/rcciquifa.v51n1.95366.
- [49] M. K. Chourasia, L. Kang, and S. Y. Chan, "Nanosized ethosomes bearing ketoprofen for improved transdermal delivery," *Results Pharma Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 60–67, 2011, doi: 10.1016/j.rinphs.2011.10.002.
- [50] Andromaco, "Indaflex®," 2023. <http://andromaco.com.mx/productos/indaflex.html> (accessed Sep. 13, 2023).
- [51] P. Domínguez, "Nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada: revisión y relevancia," 2008.
- [52] T. Dilla, A. Valladares, L. Lizán, and J. A. Sacristán, "Adherencia y persistencia terapéutica: causas, consecuencias y estrategias de mejora," *Atención Primaria*, vol. 41, no. 6, pp. 342–348, Jun. 2009, doi: 10.1016/J.APRIM.2008.09.031.
- [53] UAG, "Liberación farmacológica - PROCESO DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS Las formas farmacéuticas de liberación - Studocu," 2021. <https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-tecnologica-de-guadalajara/medicina-general/liberacion-farmacologica/14218710> (accessed Sep. 13, 2023).
- [54] T. B. E. Muñiz, Diana Elizabeth Lázaro, María de Lourdes Cervantes Martínez, "Preformulación y formulación de un gel reductor con extracto de toronja," 2012.
- [55] Aleph, "qué es el carbopol y la trietanolamina," 2021. <https://aleph.org.mx/que-es-el-carbopol-y-la-trietanolamina> (accessed Sep. 13, 2023).
- [56] L. Hernández-Adame, N. Estrada, E. Diaz-Cervantes, and L. A. García Pérez, "Nanogelatin: Transport and delivery systems for drugs and biomolecules," *Recur. Nat. y Soc.*, vol. 7, no. 3, 2021, doi: 10.18846/renaysoc.2021.07.07.03.0008.
- [57] H. Takeuchi *et al.*, "Usefulness of Rat Skin as a Substitute for Human Skin in the in Vitro Skin Permeation Study," *Exp. Anim.*, vol. 60, no. 4, pp. 373–384, 2011, doi: 10.1538/EXPANIM.60.373.
- [58] F. F. Schmidt, S. Nowakowski, and P. J. Kluger, "Improvement of a Three-Layered in vitro Skin Model for Topical Application of Irritating Substances," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, p. 528082,

May 2020, doi: 10.3389/FBIOE.2020.00388/BIBTEX.

- [59] T. Komatsu and T. Sakurada, "Comparison of the efficacy and skin permeability of topical NSAID preparations used in Europe.," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 47, no. 5, pp. 890–895, Dec. 2012, doi: 10.1016/J.EJPS.2012.08.016.
- [60] J. Leanpolchareanchai and V. Teeranachaideekul, "Topical Microemulsions: Skin Irritation Potential and Anti-Inflammatory Effects of Herbal Substances," *Pharmaceuticals (Basel)*., vol. 16, no. 7, Jul. 2023, doi: 10.3390/PH16070999.
- [61] B. Milanowski *et al.*, "Optimization and Evaluation of the In Vitro Permeation Parameters of Topical Products with Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs through Strat-M® Membrane," *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 8, Aug. 2021, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13081305.
- [62] M. Andleeb, H. M. Shoaib Khan, and M. Daniyal, "Development, Characterization and Stability Evaluation of Topical Gel Loaded With Ethosomes Containing Achillea millefolium L. Extract," *Front. Pharmacol.*, vol. 12, p. 603227, Apr. 2021, doi: 10.3389/FPHAR.2021.603227/BIBTEX.
- [63] E. H. B. Dea Herrera Ruiz, "Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos," 2011. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000100003 (accessed Sep. 13, 2023).

12 PRODUCTOS GENERADOS

El trabajo se presentó en el Congreso Estatal de Ciencia e Ingeniería en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica (Ipicyt).

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN IN VITRO DE NANOETOSOMAS DE INDOMETACINA VEHICULIZADO EN GEL COMPARADO CON UNA CREMA COMERCIAL

Ing. Miguel Rodríguez Espino, Dr. José Trinidad Pérez Urizar, Dra. Patricia Aguirre Bañuelos, Dr. Juan Ramón Zapata Morales

Universidad Autónoma de San Luis Potosí

INTRODUCCIÓN

Las ER constituyen un reconocido problema de salud a nivel mundial; por su morbilidad, por la discapacidad que provocan, por su repercusión en el plano económico debido a los altos costos ocasionados a las instituciones sanitarias, así como a las personas aquejadas.

OBJETIVO

Diseñar, optimizar, caracterizar y evaluar *in-vitro* un nanosistema basado en nanoetosomas de indometacina vehiculado en gel y su comparación con una crema comercial



METODOLOGIA

ENSAMBLAJE DE NANOETOSOMAS POR EL MÉTODO FRÍO

Se realizó un diseño de experimentos Taguchi L9(3³) en el software minitab.



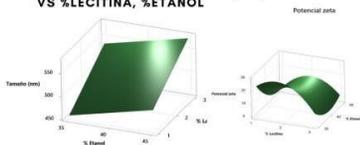
LIBERACIÓN IN-VITRO EN MEMBRANA DE DIALISIS Y EFICIENCIA DE ATRAPAMIENTO

$$Eficiencia\ de\ atrapamiento = \frac{(A_{total\ de\ fármaco} - A_{fármaco\ libre})}{A_{fármaco\ total}}$$

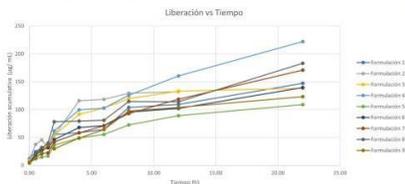
RESULTADOS

POTENCIAL ZETA, TAMAÑO DE PARTÍCULA, EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN Y COMBINACIONES TAGUCHI

GRÁFICA DE SUPERFICIE DE TAMAÑO (nm) VS %LECITINA, %ETANOL



PERFIL DE LIBERACIÓN



Orden de corrida	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Experimento	1	1	1	2	2	2	3	3	3
% Lecitina	1	2	3	1	2	3	1	2	3
% Etanol	35	40	45	40	45	35	45	35	40
%EE	98.56	95.0753	97.7974	98.6172	98.2738	98.0954	98.644	98.283	97.7272
Potencial zeta (mV)	-21.7	-24.73	-24.23	-17.6	-5.69	-8.82	-21.96	-55.73	-8.61
Tamaño de partícula (nm)	448.56	460.26	466.29	571.73	537.83	555.1	741.93	158.5	578.7

CONCLUSIÓN

- El método de optimización y diseño de Taguchi permitió encontrar la formulación más estable en un diseño L9(3³).
- Los resultados para potencial zeta, tamaño de partícula concuerdan en que la mejor formulación es la número 8, cuya presenta porcentaje de encapsulación del 98% y adecuados perfiles de liberación.
- La gráfica de superficie de respuesta permitió conocer que, a mayores concentraciones de Lecitina, se obtienen partículas de mayor tamaño y menor estabilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS





El Capítulo Estudiantil de la Sociedad Mexicana de Materiales de San Luis Potosí otorga la siguiente:

CONSTANCIA

Rodríguez-Espino Miguel, Trinidad-Pérez Urizar José, Aguirre-Bañuelos Patricia,
Montero-Morán Gabriela, Zapata-Morales Juan Ramón.

A: _____

Por su participación como **Ponente** en el Congreso Estatal de Ciencia e Ingeniería 2023: "Ciencia, Innovación y Sostenibilidad" en la modalidad de **Cartel** con el trabajo titulado "DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN IN VITRO DE NANOETOSOMAS DE INDOMETACINA VEHICULIZADO EN GEL COMPARADO CON UNA CREMA COMERCIAL".

2 al 4 de mayo de 2023, San Luis Potosí, México

Fis. Verónica Alexandra Quilumba Dutan
Presidenta del CE-SMMater-SLP

Mtra. Hilda Guadalupe Cisneros Ontiveros
Vicepresidenta del CE-SMMater-SLP

Así como también se presentó en la edición 31 del congreso internacional de materiales (IMRC) en Cancún Quintana Roo el 16 de agosto de 2023] y el resumen se publicó en las memorias del congreso.

DESIGN, FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF INDOMETHACIN NANOETHOSOMES FOR THE DEVELOPMENT OF A TRANSDERMAL FORMULATION

Miguel Rodríguez Espino, Patricia Aguirre Bañuelos, Gabriela Montero, José Pérez Urizar
Faculty of Chemical Sciences, UASLP, Mexico

¹ MRE is a CONAHCYT Fellow

INTRODUCTION

In order to be effective topically, in addition to presenting good anti-inflammatory and analgesic potency, NSAIDs must have or be formulated to present physicochemical characteristics that facilitate cutaneous penetration.

OBJECTIVE

To design, optimize, characterize, and in-vitro evaluate a nano-system based on indomethacin-loaded nanoethosomes in a gel formulation, as compared to a marketed cream-based formulation.

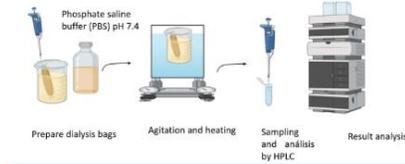
METHODOLOGY

A Taguchi L9(3³) experimental design was conducted using the Minitab software.

1 ASSEMBLY OF NANOETHOSOMES USING THE COLD METHOD



3 IN-VITRO RELEASE IN DIALYSIS MEMBRANE.

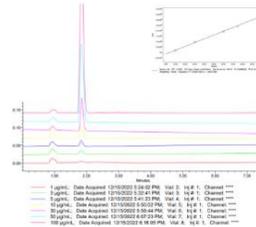


2 TRAPPING EFFICIENCY

$$\text{Trapping efficiency} = \frac{\text{Arrest drug} - \text{Avalanch drug}}{\text{Arrest drug}}$$

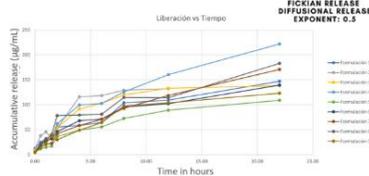


4 IN-VITRO EVALUATION IN FRANZ CELL

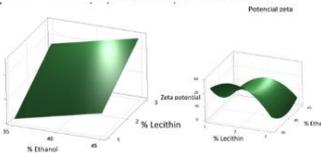


RESULTS

1 RELEASE PROFILE



2 SURFACE PLOT OF SIZE (nm) vs. % LECITHIN, % ETHANOL



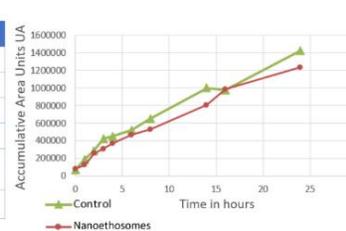
3 FINAL GEL FORMULATION



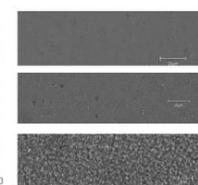
4 ZETA POTENTIAL, PARTICLE SIZE, ENCAPSULATION EFFICIENCY, AND TAGUCHI COMBINATIONS.

Run order	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Experiment	1	1	1	2	2	2	3	3	3
% Lecithin	1	2	3	1	2	3	1	2	3
% Ethanol	35	40	45	40	45	35	45	35	40
% EE	98.560	95.075	97.797	98.617	98.273	98.095	98.644	98.283	97.727
Zeta potential (mV)	-21.7	-24.73	-24.23	-17.6	-5.69	-8.82	-21.96	-55.73	-8.61
Particle size (nm)	448.56	460.26	466.29	571.73	537.83	555.1	741.93	158.5	578.7

5 PERMEATION IN FRANZ CELL



6 OPTICAL MICROSCOPY



CONCLUSIONS

A nanosystem for the release of indomethacin with permeation behavior similar to the commercial formulation was formulated. The best formulation in a Taguchi L9(3³) design is number 8 with a concentration of 2% lecithin and 35% ethanol, particle size of 158.5 nm, and zeta potential of -55.73 mV. As the amount of lecithin and hydroethanolic solution decreases, the particle size decreases, and as the amount of ethanol and lecithin decreases, the zeta potential increases. The nanoethosome formulation with the desired physicochemical characteristics and its semisolid gel pharmaceutical form were obtained using carbopol and triethanolamine.

REFERENCES



DESIGN, FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF INDOMETHACIN NANOETHOSOMES FOR THE DEVELOPMENT OF A TRANSDERMAL FORMULATION

Jose Perez-Urizar¹, Miguel Rodríguez Espino¹, Patricia Aguirre Bañuelos¹, Gabriela Montero Moran¹

¹Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, Mexico.

In order to be effective topically, in addition to presenting good anti-inflammatory and analgesic potency, NSAIDs must have or be formulated to present physicochemical characteristics that facilitate cutaneous penetration. Nanoethosomes are liposomal systems with a high alcohol content that improves solubility, biodistribution, and slow down the biotransformation of active substances. The aim of this study was to develop and characterize nanoethosomes containing indomethacin (IND) for transdermal administration of the anti-inflammatory drug. We used a Taguchi statistical experimental design considering combinations of factors/levels of cholesterol and ethanol concentration. The formulations were prepared to calculate encapsulation efficiency, zeta potential, nanovesicle size, and % drug release after 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, and 24 h. The mean vesicle size for 9 formulations ranged between 51 nm and 198, while the trapping efficiency was between 85% and 97%, and the drug release percentage after 24 h was between 90% to 94%. After applying the model optimization process, a final formulation was obtained with particle size characteristics of 158.5 nm, zeta potential of -55.73, and encapsulation efficiency of 98.23%, which is compatible with improved transdermal administration of IND.

Keywords: Nanoethosomes, Nanoformulation, Transdermal indomethacin

Acknowledgment:

Miguel Espino Rodríguez is a CONACYT fellow

Presenting author's email: jperezurizar@gmail.com

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN IN VITRO DE NANOETOSOMAS DE INDOMETACINA VEHICULIZADO EN GEL COMPARADO CON UNA CREMA COMERCIAL

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

ÍNDICE DE SIMILITUD

Código para aproximación de liberación por distintos métodos.

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy.optimize import curve_fit
from sklearn.metrics import r2_score

# Datos de tiempo y cantidad liberada (ejemplo)
tiempo = np.array([0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 22])
cantidad_liberada = np.array([0, 19.21, 28.41, 32.16, 46.88, 68.97, 72.44,
96.99, 103.52, 141.33])

# Modelos de liberación
def liberacion_primer_orden(t, k):
    return cantidad_liberada[0] * (1 - np.exp(-k * t))

def liberacion_orden_cero(t, k):
    return k * t

def modelo_higuchi(t, k):
    return k * np.sqrt(t)

def modelo_weibull(t, tau, beta):
    return 1 - np.exp(-((t / tau) ** beta))

def modelo_ritger_peppas(t, k, n):
    return k * t ** n

def modelo_korsmeyer_peppas(t, k, n):
    return k * t ** n

# Ajuste de modelos a los datos usando curve_fit de SciPy
parametros_primer_orden, _ = curve_fit(liberacion_primer_orden, tiempo,
cantidad_liberada)
parametros_orden_cero, _ = curve_fit(liberacion_orden_cero, tiempo,
cantidad_liberada)
parametros_higuchi, _ = curve_fit(modelo_higuchi, tiempo, cantidad_liberada)
parametros_weibull, _ = curve_fit(modelo_weibull, tiempo, cantidad_liberada)
parametros_ritger_peppas, _ = curve_fit(modelo_ritger_peppas, tiempo,
cantidad_liberada)
parametros_korsmeyer_peppas, _ = curve_fit(modelo_korsmeyer_peppas, tiempo,
cantidad_liberada)

# Función para calcular R^2
def calcular_r2(y, y_pred):
    return r2_score(y, y_pred)
```

```

# Predicción de valores utilizando los modelos ajustados y cálculo de R^2
prediccion_primer_orden = liberacion_primer_orden(tiempo,
*parametros_primer_orden)
r2_primer_orden = calcular_r2(cantidad_liberada, prediccion_primer_orden)
print(f"Coeficiente de determinación (R^2) para Ajuste de primer orden:
{r2_primer_orden}")
print(f"Valor de k para Ajuste de primer orden:
{parametros_primer_orden[0]}")

prediccion_orden_cero = liberacion_orden_cero(tiempo,
*parametros_orden_cero)
r2_orden_cero = calcular_r2(cantidad_liberada, prediccion_orden_cero)
print(f"Coeficiente de determinación (R^2) para Ajuste de orden cero:
{r2_orden_cero}")
print(f"Valor de k para Ajuste de orden cero: {parametros_orden_cero[0]}")

prediccion_higuchi = modelo_higuchi(tiempo, *parametros_higuchi)
r2_higuchi = calcular_r2(cantidad_liberada, prediccion_higuchi)
print(f"Coeficiente de determinación (R^2) para Ajuste de Higuchi:
{r2_higuchi}")
print(f"Valor de k para Ajuste de Higuchi: {parametros_higuchi[0]}")

prediccion_weibull = modelo_weibull(tiempo, *parametros_weibull)
r2_weibull = calcular_r2(cantidad_liberada, prediccion_weibull)
print(f"Coeficiente de determinación (R^2) para Ajuste de Weibull:
{r2_weibull}")
print(f"Valor de tau para Ajuste de Weibull: {parametros_weibull[0]}, Valor
de beta para Ajuste de Weibull: {parametros_weibull[1]}")

prediccion_ritger_peppas = modelo_ritger_peppas(tiempo,
*parametros_ritger_peppas)
r2_ritger_peppas = calcular_r2(cantidad_liberada, prediccion_ritger_peppas)
print(f"Coeficiente de determinación (R^2) para Ajuste de Ritger-Peppas:
{r2_ritger_peppas}")
print(f"Valor de k para Ajuste de Ritger-Peppas:
{parametros_ritger_peppas[0]}, Valor de n para Ajuste de Ritger-Peppas:
{parametros_ritger_peppas[1]}")

prediccion_korsmeyer_peppas = modelo_korsmeyer_peppas(tiempo,
*parametros_korsmeyer_peppas)
r2_korsmeyer_peppas = calcular_r2(cantidad_liberada,
prediccion_korsmeyer_peppas)
print(f"Coeficiente de determinación (R^2) para Ajuste de Korsmeyer-Peppas:
{r2_korsmeyer_peppas}")

```

```

print(f"Valor de k para Ajuste de Korsmeyer-Peppas:
{parametros_korsmeyer_peppas[0]}, Valor de n para Ajuste de Korsmeyer-
Peppas: {parametros_korsmeyer_peppas[1]}")

# Gráfica de datos originales y modelos ajustados
plt.figure(figsize=(8, 6))
plt.scatter(tiempo, cantidad_liberada, label='Datos originales')
plt.plot(tiempo, prediccion_primer_orden, label='Ajuste de primer orden')
plt.plot(tiempo, prediccion_orden_cero, label='Ajuste de orden cero')
plt.plot(tiempo, prediccion_higuchi, label='Ajuste de Higuchi')
plt.plot(tiempo, prediccion_weibull, label='Ajuste de Weibull')
plt.plot(tiempo, prediccion_ritger_peppas, label='Ajuste de Ritger-Peppas')
plt.plot(tiempo, prediccion_korsmeyer_peppas, label='Ajuste de Korsmeyer-
Peppas')
plt.xlabel('Tiempo')
plt.ylabel('Cantidad liberada')
plt.legend()
plt.title('Comparación de diferentes modelos de liberación Formulación 6')
plt.show()

```

Código para cálculo de constante de permeación y flujo J.

```

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

# Datos de tiempo y concentración de permeación a través de celda de Franz
(simulados)
tiempo = np.array([0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 14, 16, 24], dtype=float) # Tiempo
en horas
concentracion = np.array([0, 0.051, 0.122, 0.213, 0.308, 0.441, 0.6, 0.806,
1.023, 1.282], dtype=float) # Concentración en alguna unidad

# Aproximación 1 - Regresión lineal para los primeros 6 datos
tiempo_primeros = tiempo[:6]
concentracion_primeros = concentracion[:6]

coeficientes_primeros = np.polyfit(tiempo_primeros, concentracion_primeros, 1)
pendiente_primeros, intercepto_primeros = coeficientes_primeros

# Cálculo del flujo para la primera aproximación
flujo_primeros = pendiente_primeros

# Cálculo de coeficientes de permeación para cada concentración en la
primera aproximación
constante_permeacion_primeros = []

```

```

for i in range(len(concentracion_primer)):
    C0_primer = concentracion_primer[i]
    constante_permeacion_primer.append(pendiente_primer / C0_primer)

# Cálculo del coeficiente de determinación (R^2) para la primera
aproximación
p_primer = np.poly1d(coeficientes_primer)
y_pred_primer = p_primer(tiempo_primer)
R2_primer = 1 - (np.sum((concentracion_primer - y_pred_primer) ** 2) /
np.sum((concentracion_primer - np.mean(concentracion_primer)) ** 2))

# Gráfica de la aproximación 1
plt.figure(figsize=(12, 6))
plt.subplot(1, 2, 1)
plt.scatter(tiempo_primer, concentracion_primer, label='Datos 1-6',
color='blue')
plt.plot(tiempo_primer, pendiente_primer * tiempo_primer +
intercepto_primer, label='Regresión 1', color='red')
plt.title('Aproximación al flujo de los primeros 6 datos')
plt.xlabel('Tiempo (horas)')
plt.ylabel('Concentración')
plt.legend()
plt.grid(True)

# Imprimir resultados para la aproximación 1
print("Aproximación 1 - Primeros 6 datos:")
print(f"Flujo total del sistema: {flujo_primer}")
print(f"Coeficientes de permeación para cada concentración:
{constante_permeacion_primer}")
print(f"Coeficiente de determinación (R^2): {R2_primer}\n")

# Aproximación 2 - Regresión lineal para los 4 datos restantes
tiempo_segundo = tiempo[6:]
concentracion_segundo = concentracion[6:]

coeficientes_segundo = np.polyfit(tiempo_segundo, concentracion_segundo, 1)
pendiente_segundo, intercepto_segundo = coeficientes_segundo

# Cálculo del flujo para la segunda aproximación
flujo_segundo = pendiente_segundo

# Cálculo de coeficientes de permeación para cada concentración en la
segunda aproximación
constante_permeacion_segundo = []
for i in range(len(concentracion_segundo)):

```

```

C0_segundo = concentracion_segundo[i]
constante_permeacion_segundo.append(pendiente_segundo / C0_segundo)

# Cálculo del coeficiente de determinación (R^2) para la segunda
aproximación
p_segundo = np.poly1d(coeficientes_segundo)
y_pred_segundo = p_segundo(tiempo_segundo)
R2_segundo = 1 - (np.sum((concentracion_segundo - y_pred_segundo) ** 2) /
np.sum((concentracion_segundo - np.mean(concentracion_segundo)) ** 2))

# Gráfica de la aproximación 2
plt.subplot(1, 2, 2)
plt.scatter(tiempo_segundo, concentracion_segundo, label='Datos 7-10',
color='green')
plt.plot(tiempo_segundo, pendiente_segundo * tiempo_segundo +
intercepto_segundo, label='Regresión 2', color='orange')
plt.title('Aproximación al flujo de los 4 datos restantes')
plt.xlabel('Tiempo (horas)')
plt.ylabel('Concentración')
plt.legend()
plt.grid(True)

# Imprimir resultados para la aproximación 2
print("Aproximación 2 - 4 datos restantes:")
print(f"Flujo total del sistema: {flujo_segundo}")
print(f"Coeficientes de permeación para cada concentración:
{constante_permeacion_segundo}")
print(f"Coeficiente de determinación (R^2): {R2_segundo}\n")

# Mostrar la gráfica
plt.tight_layout()
plt.show()

```