

**EVALUACIÓN DE LA PERMEACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE FTALOCIANINA DE  
ALUMINIO CLORADA (PcAlCl) APLICADA TÓPICAMENTE EN RATAS  
WISTAR**

**CLAUDIA INÉS RICO CONDE**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA  
2013**

**EVALUACIÓN DE LA PERMEACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE FTALOCIANINA DE  
ALUMINIO CLORADA (PcAlCl) APLICADA TÓPICAMENTE EN RATAS  
WISTAR**

**CLAUDIA INÉS RICO CONDE**

**Tesis de grado presentada como requisito para optar el título de  
MAESTRO EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

**Directora:**

**PATRICIA ESCOBAR RIVERO  
BACTERIÓLOGA, M.Sc., Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA**

**2013**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Patricia Escobar por la dirección, orientación y apoyo en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Carlos Conde, a Jesús Rodríguez, al Dr. Julio Cesar Mantilla, al Dr. Eduardo Ricci, a Victoria Ospina, al personal del Bioterio Central Departamento de Ciencias Básicas (UIS) y al personal del laboratorio de Patología HUS, por contribuir al desarrollo de este trabajo y aportar en gran medida sus ideas, conocimiento, dedicación, apoyo y valiosas asesorías.

A los profesores de la Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas (UIS), al Laboratorio de quimioterapia (UIS) y al Instituto Colombiano Francisco José de Caldas, "COLCIENCIAS" por permitir la realización de este proyecto y por contribuir a mi formación profesional.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	22
1.1 LA PIEL	22
1.1.1 Estructura y función de la piel	22
1.1.2 Piel de ratas Wistar	28
1.2 ABSORCIÓN PERCUTÁNEA O DÉRMICA	29
1.2.1 Generalidades	29
1.2.2 Aspectos teóricos de difusión en absorción percutánea	32
1.3 EVALUACIÓN DE LA ABSORCIÓN PERCUTÁNEA O DÉRMICA	33
1.3.1 Pruebas <i>in vitro</i> para evaluar la absorción dérmica	34
1.3.1.1 Principios de las pruebas <i>in vitro</i> que utilizan muestras de piel	34
1.3.1.2 Dosis finita e infinita	35
1.3.1.3 Elección y preparación de la piel	35
1.3.1.4 Aplicación de compuestos	36
1.3.1.5 Otros métodos <i>in vitro</i>	37
1.3.2 Pruebas <i>in vivo</i> para evaluar absorción dérmica y distribución	38
1.3.2.1 Transporte de compuestos a través de la piel y su distribución	38
1.4 POTENCIADORES DE LA PERMEACIÓN Y SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS	40
1.4.1 Potenciadores químicos de la permeación	40
1.4.2 Sistemas de liberación de fármacos	40
1.4.2.1 Sistemas de liberación de fármacos aplicados tópicamente	41
1.4.3 La nanotecnología aplicada a sistemas de liberación de fármacos	42
1.4.3.1 Nanoemulsiones	44
1.5 APROXIMACIÓN A LA FARMACOCINÉTICA	46

1.5.1 Generalidades y principios farmacocinéticos	46
1.5.2 Distribución de fármacos	47
1.5.2.1 Unión a proteínas plasmáticas	47
1.5.2.2 Distribución tisular	47
1.5.2.3 Paso de la barrera hematoencefálica	48
1.5.2.4 Cinética de distribución	48
1.5.3 Vías de administración de fármacos	49
1.5.4 Modelos experimentales de estudios farmacocinéticos	49
1.6 LEISHMANIASIS: LEISHMANIASIS CUTÁNEA	50
1.6.1 Generalidades	50
1.6.2 Tratamiento	53
1.6.2.1 Tratamientos locales en leishmaniasis cutánea	54
1.7 TERAPIA FOTODINÁMICA (TFD)	55
1.7.1 Generalidades	55
1.7.2 Fotosensibilizadores (FS)	56
1.7.3 Ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl)	57
1.7.4 Terapia fotodinámica en el tratamiento de LC	58
2. OBJETIVOS	60
2.1 OBJETIVO GENERAL	60
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
3. MATERIALES Y MÉTODOS	61
3.1 DISEÑO METODOLÓGICO	61
3.2 COMPUESTOS Y FORMULACIONES	62
3.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: RATAS WISTAR	64
3.4 ENSAYOS DE PERMEACIÓN Y RETENCIÓN EX VIVO	66
3.4.1 Obtención de la piel de los animales	66
3.4.2 Ensayo de permeación de PcAlCl en piel ( <i>ex vivo</i> )	66
3.4.3 Ensayo de retención de PcAlCl en piel ( <i>ex vivo</i> )	70
3.5 ENSAYOS DE DISTRIBUCIÓN DE PcAlCl EN RATAS WISTAR	72

3.5.1 Preparación de la piel de los animales	72
3.5.2 Grupos experimentales y aplicación del tratamiento	74
3.5.3 Sacrificio de los animales, obtención y procesamiento de órganos	75
3.5.4 Cuantificación de PcAICI en órganos	76
3.6 DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LA PIEL	76
3.7 ANÁLISIS DE RESULTADOS	77
4. RESULTADOS	79
4.1 FORMULACIONES DE PcAICI	79
4.1.1 Propiedades foto-físicas de la PcAICI en F1 y F2: Espectroscopía de absorción y emisión de fluorescencia	79
4.1.2 Detección de PcAICI en F1 y F2 a través del tiempo	84
4.2 PERMEACIÓN Y RETENCIÓN <i>ex vivo</i> DE LA PcAICI EN PIEL DORSAL DE RATAS WISTAR	86
4.2.1 Características de la piel utilizada en los ensayos	86
4.2.2 La PcAICI contenida en las formulaciones 1 y 2 no permeo la piel de ratas Wistar hacia el medio receptor	92
4.2.3 La PcAICI se retuvo en las capas de la piel de ratas Wistar	92
4.2.3.1 El tiempo y la formulación influyeron en la concentración de PcAICI obtenida en estrato córneo y en epidermis más dermis	97
4.2.3.2 La interacción entre las variables influyó sobre las concentraciones de PcAICI en piel de ratas Wistar	100
4.3 DISTRIBUCIÓN <i>in vivo</i> DE PcAICI EN PIEL Y ÓRGANOS DE RATAS WISTAR	103
4.3.1 Características de la piel en el sitio de las aplicaciones	103
4.3.2 Distribución de PcAICI en piel y en órganos de ratas Wistar con piel normal y con lesiones quirúrgicas inducidas en piel	112
4.3.2.1 La aplicación tópica de las formulaciones en animales con piel sana retuvo la PcAICI en las capas de la piel	112

4.3.2.2 Después de la aplicación tópica de las formulaciones en animales con piel sana, se observó concentración de PcAlCl en pulmón	113
4.3.2.3 La aplicación tópica de las formulaciones en animales con piel lesionada quirúrgicamente retuvo la PcAlCl en las capas de la piel	114
4.3.2.4 En animales con piel lesionada la distribución se presentó en función de la formulación aplicada	115
4.3.2.5 No se detectaron concentraciones de PcAlCl después de aplicar los vehículos de las formulaciones, en animales control ni en las muestras de piel distantes del sitio de aplicación de formulaciones	116
4.3.2.6 Existieron diferencias significativas en la distribución de PcAlCl en ratas Wistar con piel sana y con lesiones quirúrgicas inducidas según la formulación aplicada	117
5. DISCUSIÓN	123
6. CONCLUSIONES	138
7. BIBLIOGRAFÍA	140

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Estructura y características químicas de PcAICI	62
<b>Tabla 2.</b> Grupos experimentales en el ensayo de distribución de PcAICI	75
<b>Tabla 3.</b> Cuantificación de PcAICI en las formulaciones a través del tiempo	85
<b>Tabla 4.</b> Retención de PcAICI en piel de ratas Wistar	94
<b>Tabla 5.</b> Pruebas de los efectos inter-sujetos en el análisis de varianza (ANOVA)	98
<b>Tabla 6.</b> Prueba de Kruskal Wallis, estadísticos de contraste	117

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Esquema de la piel y sus anexos	23
<b>Figura 2.</b> Ilustración diagramática de la piel: Epidermis y Dermis	24
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo de las capas epidermis y dermis de la piel	26
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática del EC de la piel	31
<b>Figura 5.</b> Diagrama de la capa córnea	32
<b>Figura 6.</b> Nanosistemas para la liberación de fármacos	44
<b>Figura 7.</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania spp</i>	52
<b>Figura 8.</b> Diseño metodológico del estudio	61
<b>Figura 9.</b> Sistema de Celdas de Difusión de Franz	68
<b>Figura 10.</b> Ensayo de permeación en celdas de difusión de Franz	69
<b>Figura 11.</b> Discos de piel resultantes del ensayo de permeación	70
<b>Figura 12.</b> Tricotomía de ratas Wistar	72
<b>Figura 13.</b> Lesiones inducidas quirúrgicamente en ratas Wistar	73
<b>Figura 14.</b> Espectros de emisión de PcAlCl. Análisis por solvente	81
<b>Figura 15.</b> Espectros de absorción de PcAlCl. Análisis por solvente	82
<b>Figura 16.</b> Espectros de emisión de PcAlCl. Análisis por formulación	83
<b>Figura 17.</b> Espectros de absorción de PcAlCl. Análisis por formulación	84
<b>Figura 18.</b> Anatomía microscópica de piel dorsal de ratas Wistar una vez extraída de los animales	87
<b>Figura 19.</b> Anatomía microscópica de piel dorsal de ratas Wistar mantenida en congelación por 48 horas, después de su extracción	89
<b>Figura 20.</b> Anatomía microscópica de piel dorsal de ratas Wistar después de 12 horas de iniciados los ensayos de permeación y retención	90

<b>Figura 21.</b> Anatomía microscópica de la piel dorsal de ratas Wistar después de 24 horas de iniciados los ensayos de permeación y retención	91
<b>Figura 22.</b> Retención de PcAlCl en piel de ratas Wistar	96
<b>Figura 23.</b> Gráficos de contraste de las variables utilizadas en el modelo del experimento	99
<b>Figura 24.</b> Gráfico de perfil para la relación entre concentración de PcAlCl en las capas de la piel según la formulación de PcAlCl utilizada	101
<b>Figura 25.</b> Gráfico de perfil para la relación entre concentración de PcAlCl en las capas de la piel en los tiempos del ensayo	102
<b>Figura 26.</b> Gráfico de perfil para la relación entre concentración de PcAlCl según las formulaciones aplicadas y el tiempo	103
<b>Figura 27.</b> Anatomía microscópica de la piel extraída de animales sin lesión inducida (sitio de aplicación de las formulaciones)	105
<b>Figura 28.</b> Aspecto macroscópico de las lesiones después de 8 días de la aplicación de los tratamientos	107
<b>Figura 29.</b> Caracterización microscópica de las lesiones inducidas quirúrgicamente en piel de ratas Wistar	109
<b>Figura 30.</b> Caracterización microscópica de las lesiones inducidas: Ausencia de epidermis y regeneración de tejido	110
<b>Figura 31.</b> Caracterización microscópica de las lesiones inducidas: Infiltrado celular o inflamatorio	111
<b>Figura 32.</b> Caracterización microscópica de las lesiones inducidas: Neovascularización y regeneración de tejido conectivo denso irregular	112
<b>Figura 33.</b> Distribución de PcAlCl en las capas de piel de ratas Wistar sin lesión inducida quirúrgicamente	113
<b>Figura 34.</b> Distribución de PcAlCl en pulmón de ratas Wistar sin lesión quirúrgica inducida	114
<b>Figura 35.</b> Distribución de PcAlCl en las capas de piel de ratas Wistar con lesión quirúrgica inducida	115

<b>Figura 36.</b> Distribución de PcAlCl en órganos de ratas Wistar con lesión quirúrgica inducida después de la aplicación tópica de F1 y F2	116
<b>Figura 37.</b> Distribución de PcAlCl en las capas de piel y en órganos de ratas Wistar en animales con piel sana y en animales con lesiones inducidas, independiente de la formulación aplicada	119
<b>Figura 38.</b> Distribución de PcAlCl en las capas de piel y en órganos de ratas Wistar con piel sana y con piel con lesión quirúrgica inducida	121

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALA	Ácido aminolevulínico
DMSO	Dimetil sulfóxido
EC	Estrato córneo
E+D	Epidermis más dermis
F1	Formulación 1
F2	Formulación 2
FS	Fotosensibilizador
LC	Leishmaniasis cutánea
NE	Nanoemulsión
PBS	Búfer fosfato salino
Pc	Ftalocianinas
PcAlCl	Ftalocianina de aluminio clorada
PcZn	Ftalocianina de Zinc
PcZnSO <sub>4</sub>	Ftalocianina de Zinc tetrasulfonada
Pp IX	Protoporfirina IX
r. p. m.	Revoluciones por minuto
SDS	Sodio dodecilsulfato
TFD	Terapia fotodinámica
U.A.	Unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia
UV-Vis	Ultravioleta Visible

## RESUMEN

**TÍTULO:** EVALUACIÓN DE LA PERMEACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE FTALOCIANINA DE ALUMINIO CLORADA (PcAlCl) APLICADA TÓPICAMENTE EN RATAS WISTAR\*

**AUTORES:** RICO CONDE, Claudia Inés; ESCOBAR RIVERO, Patricia\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Permeación, retención, distribución, ftalocianina de aluminio clorada, ratas Wistar, leishmaniasis cutánea.

La terapia fotodinámica (TFD) utilizando tópicamente formulaciones con ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) en leishmaniasis cutánea (LC) debe garantizar que este fotosensibilizador (FS) se acumule en la dermis, donde se encuentran los macrófagos infectados con *Leishmania*. El objetivo del estudio fue determinar *ex vivo* la permeación y retención de PcAlCl en piel de ratas Wistar e *in vivo* su distribución en animales con piel sana y piel lesionada quirúrgicamente.

Se prepararon dos formulaciones. La permeación se determinó utilizando celdas de difusión de Franz con piel de ratas Wistar, después de 12 y 24 horas. La retención en estrato córneo (EC) y en epidermis más dermis (E+D) se determinó por el método de *tape stripping* y extracción con solvente. La distribución se realizó después de la aplicación tópica de las formulaciones analizando la concentración del FS en piel y órganos.

Las formulaciones mantuvieron la solubilidad del FS. El compuesto se retuvo en piel, encontrándose valores de concentración de 75,716 y 58,905 nM/cm<sup>2</sup> en EC y E+D, respectivamente. La PcAlCl *in vivo* se limitó a la piel en la mayoría de los casos. En animales con piel sana se registraron valores de 19,153 y 117,796 nM/mg de tejido en EC y E+D, respectivamente y en animales con piel lesionada 3,469 nM/mg de tejido en EC y 40,458 nM/mg de tejido en E+D. La distribución de PcAlCl en órganos sólo se registró en animales con lesión. La retención de PcAlCl en piel se consideró un efecto positivo. La distribución del FS dependió de su concentración y del estado de la piel. La F2, fue eficaz por su capacidad de retención. Este estudio es la base para la aplicación de TFD con PcAlCl en el tratamiento de LC; los resultados aportan conocimiento respecto a la localización del FS y su distribución en un organismo.

---

\* Tesis de grado. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

\*\* Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director de tesis: Patricia Escobar Rivero. Bacterióloga. M.Sc. Ph.D.

## ABSTRACT

**TITLE:** EVALUATION OF DISTRIBUTION AND PERMEATION OF ALUMINUM PHTHALOCYANINE CHLORIDE (AICIPc) APPLIED TOPICALLY IN WISTAR RATS\*

**AUTHORS:** RICO CONDE, Claudia Inés; ESCOBAR RIVERO, Patricia\*\*

**KEYWORDS:** Permeation, retention, distribution, chlorinated aluminum phthalocyanine, Wistar rats, cutaneous leishmaniasis.

Photodynamic therapy (PDT) using topically formulations with aluminum phthalocyanine chloride (AICIPc) in cutaneous leishmaniasis (CL) should ensure that this photosensitizer (PS) is accumulated in the dermis, where macrophages infected with *Leishmania* are located. The aim of this study was to determine *ex vivo* permeation and AICIPc retention in Wistar rat skin and *in vivo* its distribution in animals with healthy skin and surgically damaged skin.

Two formulations were prepared. The permeation was determined using Franz diffusion cells with Wistar rats skin after 12 and 24 hours. Retention in stratum corneum (SC) and epidermis plus dermis (E+D) was determined by the tape stripping method and solvent extraction. The distribution was performed after the topical application of formulations analyzing the PS concentration in the skin layers and organs.

Formulations were effective in maintaining the PS solubility. The compound was retained in skin, being average concentration values of 75,716 and 58,905 AICIPc nM/cm<sup>2</sup> in SC and E + D, respectively. The AICIPc *in vivo* was limited to the skin in most cases. In animals with healthy skin were registered values of 19,153 and 117,796 nM/mg tissue in SC and E+D, respectively, and in animals with damaged skin 3,469 nM/mg tissue in SC and 40,458 nM/mg tissue in E+D. The AICIPc distribution in organs was recorded only in animals with injury. The retention of AICIPc in skin was considered a positive effect. FS distribution depended on its concentration and skin state. The F2 was effective for retention capacity. This study is the basis for the application of PDT with AICIPc in LC treatment; the findings provide knowledge about the location of the FS and its distribution in a body.

---

\* Thesis of grade. Master in Basic Biomedical Sciences

\*\* Faculty of Health. Master in Basic Biomedical Sciences. Thesis director: Patricia Escobar Rivero. Bacteriologist. M.Sc. Ph.D.

## INTRODUCCIÓN

Debido a los efectos colaterales que se presentan con los tratamientos sistémicos actuales para la leishmaniasis cutánea (LC), como toxicidad generalizada, dolor en la aplicación, efectividad variable, ausencia de resultados cosméticos efectivos y resistencia de los parásitos, el desarrollo y la aplicación de un tratamiento tópico, efectivo y seguro para LC es prioritario (Pelo *et al.*, 2011). La terapia fotodinámica (TFD) ha sido utilizada en el tratamiento de enfermedades de la piel como queratosis actínica, carcinomas y enfermedad de Bowen (Allison *et al.*, 2006b) y en la erradicación de parásitos *Leishmania* (Akilov *et al.*, 2007a). Dutta *et al.*, 2005 y Escobar *et al.*, 2006 encontraron actividad de la TFD utilizando ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) *in vitro* contra especies de *Leishmania*. La PcAlCl también ha sido utilizada tópicamente y ha mostrado ser activa en hámsters con LC (Hernández, 2010).

Dada la actividad contra *Leishmania* mostrada por la TFD, utilizando PcAlCl como fotosensibilizador, es necesario el diseño de formulaciones tópicas con este compuesto para ser aplicado en modelos experimentales de LC. A la fecha, no existe un estudio de permeación y distribución de una formulación con este compuesto a través de las capas de la piel. En este trabajo se plantea como objetivo evaluar la permeación y distribución de PcAlCl aplicada tópicamente en ratas Wistar.

Se presenta una conceptualización de la permeación y distribución de compuestos aplicados tópicamente describiendo inicialmente la piel en cuanto a su estructura de capas o estratos, los componentes anexiales y celulares en cada una de ellas y sus respectivas funciones. Dado que los compuestos aplicados tópicamente pueden permear a través de la piel o mantenerse retenidos debido ya sea a las propiedades del compuesto o a las estructuras de las capas de dicha piel, se

presentan aspectos generales sobre absorción dérmica con el fin de hacer más comprensibles estos procesos. De igual forma se revisan aspectos teóricos de difusión descritos por las leyes de Fick aplicadas en diversos estudios de permeación transdérmica y se muestran los sistemas de evaluación de absorción dérmica tanto *in vitro* como *in vivo* donde se pueden simular los procesos de penetración, permeación y resorción de un compuesto desde su aplicación en la capa externa de la piel hacia las capas más profundas y hacia la circulación sistémica.

Uno de los principales retos en la optimización de una formulación tópica es que el compuesto, posterior a su aplicación supere la barrera del estrato córneo; aquí juegan un papel muy importante los potenciadores de la permeación y los sistemas de liberación de fármacos contenidos en formulaciones tópicas. A este respecto, se presenta una revisión de los sistemas de liberación de fármacos con aplicación de herramientas nanotecnológicas para su diseño, lo cual optimiza sus funciones en procesos de administración tópica. Por otra parte, se realiza una aproximación a la farmacocinética teniendo en cuenta las generalidades y principios de esta rama de la farmacología. Uno de los temas de estudio en el presente trabajo de investigación es la distribución de la PcAICI en los órganos, por lo cual la conceptualización se basa en la explicación de este proceso y los factores asociados a él. Debido a que las formulaciones de PcAICI tendrán un uso para el tratamiento de LC, se hace una descripción general de la enfermedad, enfocada en su tratamiento actual y en tratamientos locales que han sido propuestos. También se hace referencia al potencial uso de la TFD explicando sus generalidades y principios, haciendo énfasis en la utilización de la PcAICI como FS en el tratamiento de la LC.

Para lograr la realización de los objetivos propuestos se diseñó una metodología orientada en primer lugar a la realización de ensayos de permeación y retención *ex vivo* en piel dorsal de ratas Wistar y en segundo lugar al desarrollo de ensayos

de distribución *in vivo* en estos animales. Inicialmente se describen los procedimientos utilizados en la preparación de las formulaciones de PcAlCl. Seguidamente, se presenta la aplicación de estas formulaciones en los ensayos de permeación y retención en celdas de difusión, utilizando como membrana piel dorsal extraída de ratas Wistar. Dado que algunos procedimientos fueron estandarizados en este trabajo se presentan en detalle las condiciones en el desarrollo de cada ensayo. En estas pruebas se manejan variables como tiempo y formulación evaluando su influencia en los resultados. Para los experimentos *in vivo* se presenta el modelo utilizado y la manera como se realizan los ensayos de distribución en capas de la piel y órganos de ratas Wistar con piel sana y con piel lesionada quirúrgicamente, después de la aplicación tópica de las formulaciones de PcAlCl. Se realiza análisis de fluorimetría para determinar la distribución del compuesto dependiendo de la formulación aplicada y del estado de la piel. Debido a la influencia que pueden tener las variaciones de la anatomía microscópica de la piel en el desarrollo de los ensayos, se realizan estudios histológicos conducidos al conocimiento de las características microscópicas de la piel y sus posibles alteraciones dependiendo de las técnicas aplicadas.

En el capítulo de resultados se presentan en primer lugar las propiedades fotofísicas de la PcAlCl dentro de las formulaciones utilizadas. Estas propiedades se determinaron mediante espectros de emisión de fluorescencia y absorción del compuesto. Posteriormente, se muestran los resultados de la permeación de PcAlCl a través de la piel hacia el medio receptor y su retención en estrato córneo y en epidermis más dermis. Las diferencias significativas de las variables tenidas en cuenta en estos ensayos se analizan estadísticamente. Finalmente, se presentan los resultados de distribución de PcAlCl en piel y órganos de ratas Wistar. Se establecen las correspondientes similitudes y diferencias entre la distribución del compuesto en animales con piel sana y en animales con lesiones inducidas a los cuales se les aplican los tratamientos

Con el desarrollo del presente trabajo se logra conocer el comportamiento de la PcAICI al ser aplicada tópicamente desde la superficie externa de la piel de ratas Wistar hacia las capas internas de esta. Específicamente se logran determinar los procesos de permeación y retención del compuesto y la influencia de variables como el tiempo y el tipo de formulación en estos resultados. Posteriormente se logra conocer el proceso de distribución de PcAICI en ratas Wistar según el estado de la piel en el sitio de aplicación. Con los resultados obtenidos se demuestra las ventajas de algunas de las formulaciones utilizadas en cuanto a retención del compuesto en las capas de la piel y no distribución de este hacia órganos.

Teniendo en cuenta que el presente estudio es la base para la aplicación de TFD con PcAICI en el tratamiento de LC, los resultados obtenidos aportan el conocimiento de la localización del FS en las capas de la piel de ratas Wistar y su posible distribución en órganos de estos mismos animales después de la aplicación de formulaciones tópicas.

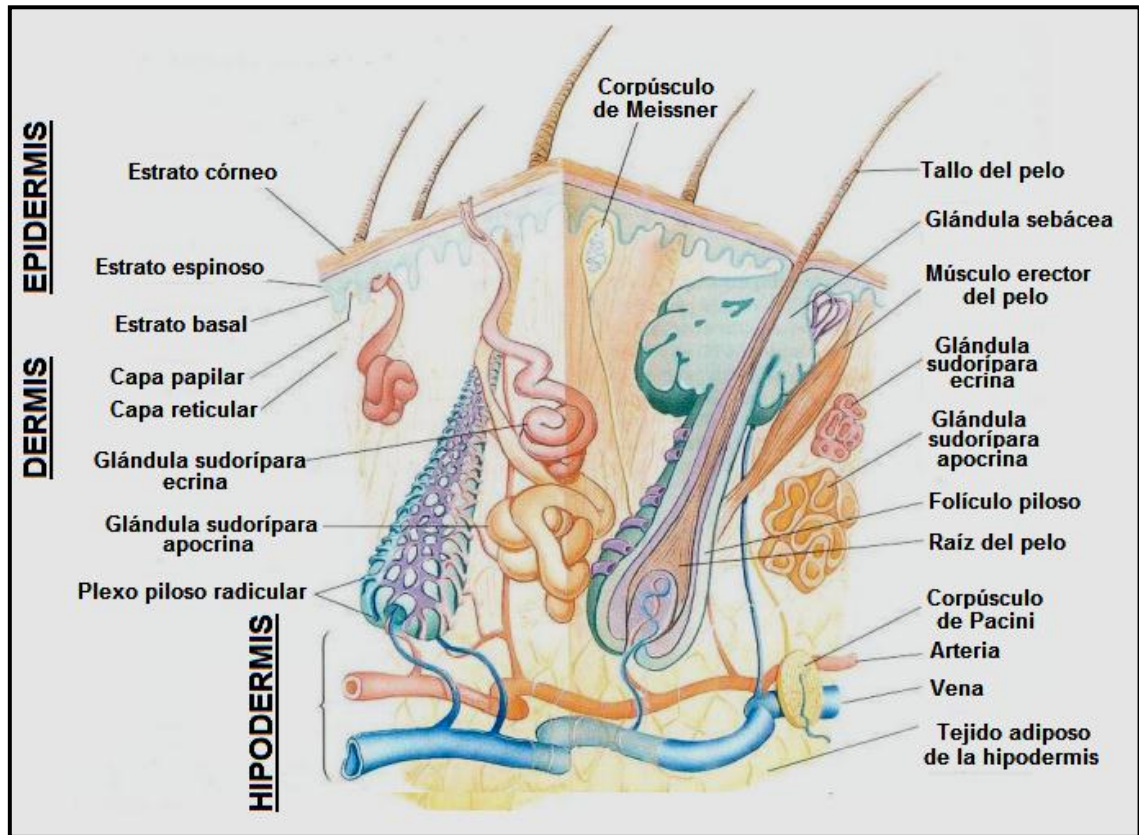
## 1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

En el presente marco teórico se exponen los aspectos más relevantes de la piel, su estructura y función y se presentan las características de la piel de ratas Wistar. Posteriormente, se define el proceso de absorción percutánea o dérmica de la piel, las generalidades y los aspectos teóricos de difusión. La evaluación de la absorción dérmica se presenta en el siguiente capítulo, con el fin de exponer las pruebas *in vitro* e *in vivo* que se llevan a cabo en estos procesos. Luego, se presentan los avances científicos y tecnológicos más importantes sobre potenciadores de permeación y sistemas de liberación de fármacos, principalmente aquellos aplicados tópicamente así como el uso de la nanotecnología en el desarrollo de estos sistemas. Seguidamente se hace una aproximación a la farmacocinética, específicamente en procesos de distribución de fármacos. Finalmente se enfatiza en la leishmaniasis cutánea como enfermedad parasitaria caracterizada por lesiones en piel, sus generalidades, tratamiento actual y estado del arte sobre posibles tratamientos locales mediante la aplicación de terapia fotodinámica (TFD), especialmente mediante la utilización de ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) como fotosensibilizador (FS) eficaz en el tratamiento de esta enfermedad.

### 1.1 LA PIEL

**1.1.1 Estructura y función de la piel.** La piel es el órgano más grande en el cuerpo de los mamíferos y funciona como una barrera protectora en la interfase entre el cuerpo y el entorno circundante. (Groeber *et al.*, 2011). La piel consta de cuatro capas (Figura 1): el estrato córneo (epidermis no viable), las restantes capas de la epidermis (epidermis viable), la dermis y los tejidos subcutáneos (Figura 2) (Walters & Roberts, 2002).

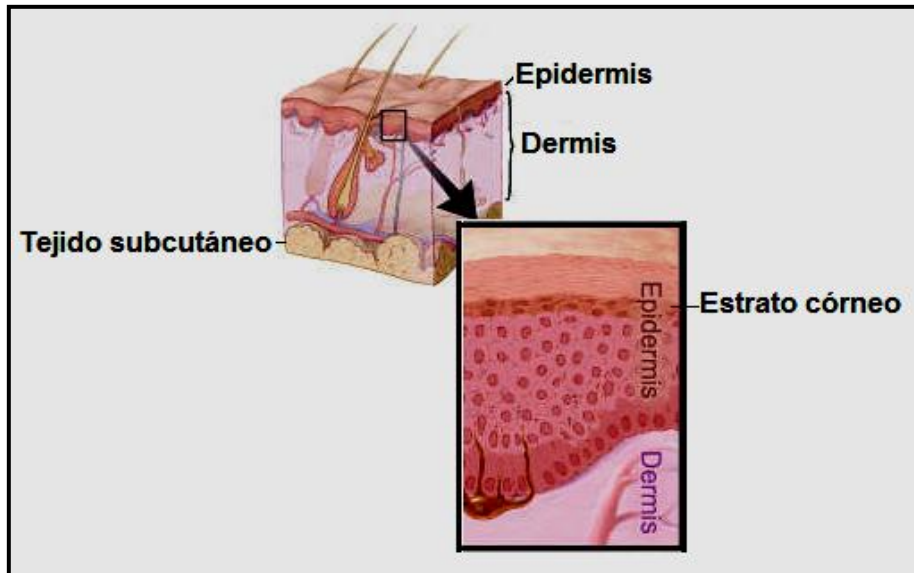
**Figura 1.** Esquema de la piel y sus anexos. Se muestran las capas: Epidermis (estrato córneo, estrato espinoso, estrato basal), dermis e hipodermis.



Fuente: Tomado de Gartner & Hiatt, (2007).

La epidermis y la dermis están interdigitadas a través de crestas epidérmicas y papilas dérmicas, separadas por una membrana basal (Gartner & Hiatt, 2007).

**Figura 2.** Ilustración diagramática de la piel: Epidermis y Dermis.

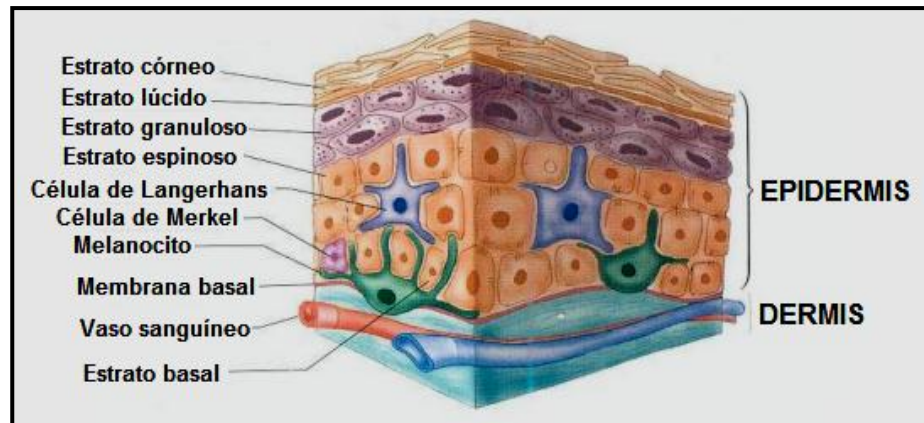


Fuente: Tomado de Gartner & Hiatt, (2007).

De acuerdo con el espesor de la capa de queratina la piel se clasifica en gruesa o fina. La epidermis de la piel gruesa está compuesta por cinco capas (Figura 3). La capa más profunda, se denomina *estrato basal o germinativo*, consiste de una sola lámina de células cúbicas o cilíndricas. Estas células tienen la función de renovación celular mediante mitosis y son desplazadas hacia la superficie para dar origen a una capa más gruesa conocida como *estrato espinoso*. Esta capa está compuesta de células espinosas poliédricas caracterizadas por gran cantidad de desmosomas (puentes intercelulares) que establecen con células vecinas. Las células del estrato espinoso también muestran actividad mitótica. La capa basal y la capa espinosa de la epidermis reciben el nombre de estrato de Malpighi y su constante actividad mitótica es la causa de su migración hacia la siguiente capa, el *estrato granuloso*. Las células de este estrato acumulan gránulos de queratohialina, que al final sobrecargan la célula y destruyen su núcleo y orgánulos citoplasmáticos. La cuarta capa de la epidermis es el *estrato lúcido*, es más o menos delgado y no siempre visible. Las células del estrato lúcido carecen

de núcleo y orgánulos, pero contienen filamentos de queratina y de eleidina, un producto de transformación de la queratohialina. La capa más superficial de la epidermis es el *estrato córneo*, compuesto por restos apilados de células muertas que reciben el nombre de escamas. Las capas superficiales del estrato córneo se exfolian con el mismo ritmo con que son reemplazadas por la actividad mitótica de los estratos basal y espinoso (Walters & Roberts, 2002). Una de las funciones más importantes que cumple la epidermis es la generación de la capa córnea, la cual a su vez, ejerce la función de barrera en la piel, propiedad relacionada con su alto valor de densidad, su baja hidratación y su reducida área de superficie para transporte de solutos (Thakur *et al.*, 2008). Hermann Rein fue quien demostró por primera vez la presencia de una barrera entre el estrato córneo y la epidermis viable basado en el comportamiento fisiológico de piel humana aislada (Rein, 1924). Estudios desarrollados durante los siguientes años proporcionaron mayor definición respecto a las propiedades de barrera de esta membrana biológica (Menon *et al.*, 2012), actualmente se sabe que cada célula del estrato córneo está compuesta principalmente de queratina insoluble (aproximadamente 70%) y lípidos (aproximadamente 20). La región intercelular consiste principalmente de lípidos y desmosomas para la cohesión de los corneocitos. El EC también funciona como barrera para prevenir la pérdida de componentes internos del cuerpo (Walters & Roberts, 2002; Gartner & Hiatt, 2007; Thakur *et al.*, 2008).

**Figura 3.** Esquema representativo de la epidermis y la dermis de la piel. Se muestran los estratos que conforman la epidermis: estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal y, también los tipos celulares presentes en esta capa de la piel.



Fuente: Tomado de Gartner & Hiatt, (2007).

En la epidermis se encuentran cuatro tipos celulares (Figura 3): queratinocitos, células más abundantes encargadas de la producción de queratina; melanocitos, encargados de elaborar la melanina, sintetizada en orgánulos especializados llamados melanosomas. Los melanocitos son el segundo tipo celular en frecuencia y están dispersos entre los queratinocitos del estrato basal; células de Langerhans (células dendríticas), están situadas especialmente en el estrato espinoso y actúan como células presentadoras de antígenos en las respuestas inmunitarias y células de Merkel que están dispersas entre las células del estrato basal.

La diferencia entre piel gruesa y piel fina radica en los estratos de la epidermis. En la piel fina no se presenta el estrato lúcido, los estratos córneo y espinoso están muy poco desarrollados y sólo hay un estrato granuloso incompleto (Gartner & Hiatt, 2007).

La dermis (Figura 1), es un componente vital de la piel, no sólo ofrece el sistema de soporte, nutritivo e inmunológico de la epidermis a través de una delgada capa papilar adyacente a esta, sino que también desempeña un papel en la temperatura, la presión y la regulación del dolor (Walters & Roberts, 2002). La dermis, está compuesta por tejido conjuntivo denso no modelado colágeno, con fibras colágenas elásticas abundantes (70%) que contribuyen a la adhesión de la piel a la hipodermis subyacente. La dermis está subdividida en una capa papilar laxa (región superficial inter-digitada con las crestas epidérmicas) y una capa reticular más densa, gruesa y profunda (Gartner & Hiatt, 2007). Las células principales en la dermis son los fibroblastos, que producen los componentes del tejido conectivo del colágeno: laminina, fibronectina y vitronectina; mastocitos, implicados en las respuestas inmunes e inflamatorias y melanocitos, involucrados en la producción del pigmento melanina. Contendida dentro de la dermis, se encuentra una extensa red vascular que proporciona a la piel nutrición, reparación y respuesta inmune. En esta capa de la piel también están presentes diferentes tipos de fibras nerviosas encargadas de la presión, el dolor y la temperatura (Thakur *et al.*, 2008).

La capa más profunda de la piel es el tejido subcutáneo o hipodermis (figura 1) que actúa como un aislante térmico, amortiguador y como una región de almacenamiento de energía. La hipodermis es una red de células de grasa dispuestas en lóbulos y unidas a la dermis por interconexiones de fibras de elastina y colágeno. Además de las células de grasa, en la hipodermis también se encuentran fibroblastos y macrófagos. Una de las principales funciones de la hipodermis es llevar los sistemas vascular y neural a la piel. De igual forma, cumple la función de anclaje de la piel al músculo subyacente (Davis, 2008).

La piel presenta algunos anexos (Figura 1) como el pelo, que es una proliferación epidérmica incluida en la dermis o la hipodermis. Otras estructuras anexiales de la

piel son las glándulas sebáceas, las glándulas sudoríparas y las uñas (Thakur *et al.*, 2008).

La mayoría de las funciones de la piel son esenciales para la supervivencia del cuerpo de seres humanos y mamíferos en general. Estas funciones se pueden clasificar como: protección, mantenimiento de la homeostasis y detección. La importancia de la función protectora y homeostática de la piel se determina por su propiedad de barrera (Gartner & Hiatt, 2007). Esta propiedad permite la supervivencia de los organismos en entornos variables en cuanto a temperatura, humedad, presencia de peligros ambientales y radiación. Por ejemplo, las propiedades de barrera a una entidad química implican resistencia a su entrada (barrera proporcionada por la capa córnea), metabolismo para la porción de esta entidad que atraviese el estrato córneo (en la epidermis viable), detección y atención a los daños causados por la entrada de esta entidad (mediador inflamatorio liberado en la epidermis con participación de la dermis) y eliminación de la entidad del sitio por suministro sanguíneo dérmico y distribución en los órganos del cuerpo específicamente en órganos responsables de la eliminación de la entidad por metabolismo (hígado) y excreción (riñón) (Walters & Roberts, 2002). En un segundo contexto, la piel mantiene la homeóstasis del cuerpo, especialmente en términos de su composición, regulación del calor, control de la presión sanguínea y funciones excretoras (Thakur *et al.*, 2008). La regulación del calor se produce a través del uso de almohadillas de grasa subcutánea y por la regulación fisiológica del flujo sanguíneo. En tercer lugar, la piel es un órgano sensorial muy importante en términos de detección de influencias ambientales como calor, presión, dolor, alérgenos y la entrada de microorganismos. (Gartner & Hiatt, 2007).

**1.1.2 Piel de ratas Wistar.** La piel de ratas Wistar presenta gran similitud estructural con la piel humana pero también difiere en algunas características. Microscópicamente, está formada por una epidermis delgada y una dermis más

gruesa y profunda (Franklin, 2005). La epidermis está compuesta de epitelio estratificado escamoso, que a su vez, está dividido dentro de capas. La capa basal o estrato basal, está en un estado de continuo crecimiento mientras que la capa superficial, el estrato córneo, consiste de material no vivo. Entre las capas basal y córnea hay varias capas de células que están en diferentes estados de queratinización, el cual aumenta cuando se acercan a la capa superficial. Estas capas son: (desde la más profunda a la superficial): estrato espinoso, estrato granuloso y el delgado estrato lúcido (Wingerd, 1988). La dermis, está compuesta de tejido conectivo denso. Dentro de esta capa se encuentran: los folículos pilosos, glándulas sebáceas, vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas sensoriales. Debajo de la dermis en la piel de rata se encuentra una capa de grasa y tejido conectivo laxo que une la piel y el tejido muscular subyacente, llamado fascia superficial (Quiller, 1960). La rata no posee glándulas sudoríparas y en su estructura los folículos pilosos están demasiado juntos. La rata es un animal tan pequeño que no requiere un efecto de enfriamiento (Wingerd, 1988).

Macroscópicamente, la piel de la rata está cubierta de pelos en su totalidad, es delgada, elástica y con libertad de movimiento (Franklin, 2005). Los pelos presentes en la piel mantienen una capa de aire que proporciona aislamiento y mantiene una temperatura constante en el cuerpo. El pelo se mantiene “en punta” por medio de pequeños músculos erectores. Esta reacción ocurre en respuesta al frío, el miedo o la ira, lo cual aumenta el efecto aislante y hace que el animal se vea de mayor tamaño (Wingerd, 1988).

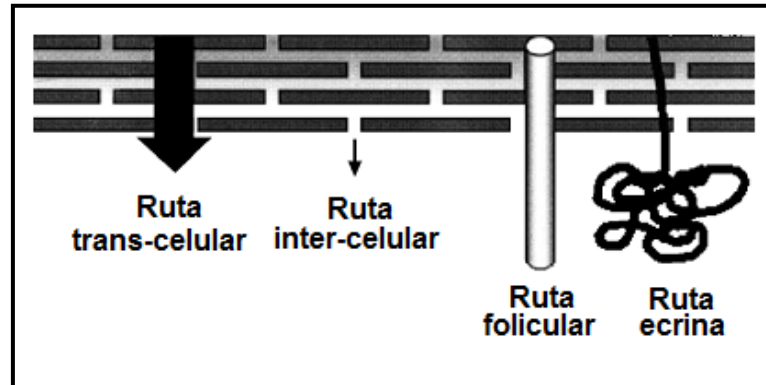
## **1.2 ABSORCIÓN PERCUTÁNEA O DÉRMICA**

**1.2.1 Generalidades.** La absorción percutánea o dérmica es un término global que describe el transporte de productos químicos desde la superficie externa de la piel hacia la circulación sistémica, este término se divide en: (i) *Penetración*, entrada de una sustancia en una capa o estructura particular, como la entrada de

un compuesto en el estrato córneo. (ii) *Permeación*, penetración a través de una capa hacia una segunda capa que es a la vez, funcional y estructuralmente diferente de la primera capa, y (iii) *Resorción*, absorción de una sustancia en la piel y el sistema linfático vascular local y en la mayoría de los casos dará lugar a la entrada en la circulación sistémica (absorción sistémica) (WHO, 2006).

Así, la absorción percutánea incluye la penetración y permeación a través de la epidermis y la absorción por la red capilar en la unión dermo-epidérmica (Kalluri & Banga, 2011). La permeación de moléculas a través de la piel y su suministro percutáneo están limitados por la función de barrera del EC, estructura altamente organizada (Lopez *et al.*, 2011). Para muchos compuestos el EC lipofílico es la principal barrera de permeación. Sin embargo, la difusión a través de la epidermis viable y la dermis, capas hidrofílicas, también puede ser limitantes de la difusión, especialmente para compuestos lipofílicos cuando el EC está dañado o afectado por enfermedad. Posteriormente, el fármaco se difunde en un medio principalmente acuoso (epidermis viable y dermis) y es llevado dentro del sistema sanguíneo y linfático cutáneo (resorción). La estructura del EC se representa como una red en donde los corneocitos, ricos en queratina, están dentro de la matriz intercelular rica en lípidos. A partir de esta organización se da la permeación dérmica de compuestos mediante tres diferentes vías: trans-celular, inter-celular y mediante apéndices (glándulas ecrinas y folículos pilosos con sus respectivas glándulas sebáceas) (Figura 4) (Hadgraft, 2001).

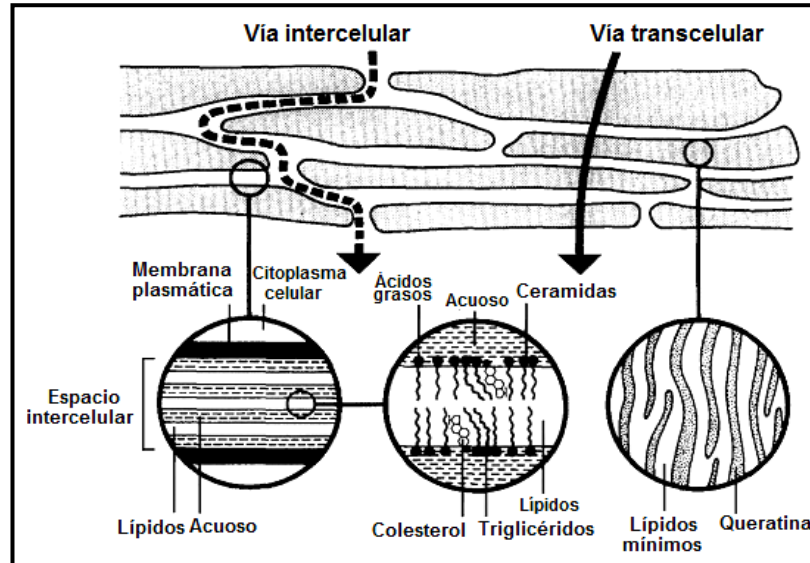
**Figura 4.** Representación esquemática del EC de la piel. Se muestran las posibles rutas o vías de permeación: Ruta transcelular, ruta intercelular y rutas folicular y ecrina.



Fuente: Tomado de Hadgraft, (2001)

En condiciones normales, la ruta de permeación mediante apéndices de la piel es menos significativa, debido a que dichos apéndices ocupan un área superficial muy baja en humanos (Hadgraft, 2001). Sin embargo, Otberg *et al.* (2004), contrastaron esta idea, demostraron que el número folicular, el diámetro y el volumen folicular son consideraciones importantes en la administración de fármacos. Las rutas transcelular e intercelular son consideradas vías trans-epidérmicas. La vía transcelular no solo requiere la difusión a través de queratina, sino a través de los lípidos intercelulares. La vía intercelular es considerada como la ruta principal de permeación, a pesar del área de superficie, relativamente pequeña disponible para esta vía. Todas las moléculas se desplazan por una combinación de las tres vías, la elección de una de ellas para mayor permeación depende de las características fisicoquímicas del fármaco (Figura 5) (El Maghraby *et al.*, 2008b).

**Figura 5.** Diagrama de la capa córnea. Se muestra una organización simplificada laminar de dominios intercelulares con los principales lípidos. También se muestran las vías intercelular y transcelular de permeación de fármacos.



Fuente: Tomado de El Maghraby *et al.*, (2008b)

**1.2.2 Aspectos teóricos de difusión en absorción percutánea.** Aunque la piel es una membrana heterogénea se pueden realizar aproximaciones de la difusión de un compuesto a través de ella mediante las leyes de difusión de Fick. Al aplicar estas leyes se pueden indicar posibles mecanismos de penetración en la piel (Guy *et al.*, 1990).

La primera ley de Fick describe la difusión de compuestos a través de una membrana y se describe como: (Crank, 1975; WHO, 2006):  $J = -D * dc/dx$ , la cual establece que el flujo (tasa de transferencia por unidad de área) de un compuesto ( $J$ , masa/cm<sup>2</sup>, por segundo) en un momento y posición dados, es proporcional al cambio de concentración diferencial  $dc$  sobre una distancia diferencial  $dx$  (es decir, el gradiente de concentración  $dc/dx$ ). El signo negativo indica que el flujo neto está en dirección de disminución de la actividad termodinámica, que a menudo puede ser representada por la concentración (WHO, 2006).

Durante la difusión de un compuesto en el estrato córneo, el gradiente de concentración en el área de distribución está en disminución. La segunda ley de Fick describe la concentración dentro de una membrana (Crank, 1975; WHO, 2006):  $dc/dt = D (d^2c/dx^2)$ , se deriva mediante la combinación de un balance diferencial de masas en una membrana con la primera ley de Fick y, cuando se considera la piel, asumiendo que el compuesto no se une, no se metaboliza y su coeficiente de difusión no varía con la posición o con la composición (WHO, 2006).

Después de la transformación matemática, se encuentra que la cantidad de sustancia que difunde desde el sitio de aplicación a una distancia  $d$  es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo de difusión. Esto significa que la tasa de penetración disminuye durante la difusión de una sustancia en el EC. Sin embargo, a una distancia muy corta, la difusión (y el coeficiente de difusión) pueden ser considerados como constantes. Además, la relación entre la concentración del fármaco en la formulación y en la superficie de la piel es una función de  $K_m$ , (coeficiente de distribución entre el vehículo y la membrana). Si la diferencia en la concentración en la parte superior e inferior de la membrana es establecida como  $\Delta C$ , y el grosor de la membrana como  $d$ , la ecuación puede ser formulada así:  $J = K_m * D * C/d = K_p * \Delta C$ ;  $K_p = K_m * D/d$ , donde  $J$  es el flujo del fármaco;  $K_m$  es el coeficiente de distribución vehículo/membrana;  $D$  es el coeficiente de difusión;  $\Delta C$  es la diferencia de concentración en la parte superior e inferior de la membrana;  $d$  es el grosor de la membrana y  $K_p$  es el coeficiente de permeabilidad (Jamouille & Schaefer, 1993).

### **1.3 EVALUACIÓN DE LA ABSORCIÓN PERCUTÁNEA O DÉRMICA**

La evaluación de la absorción percutánea de moléculas es un paso muy importante en la valoración de un sistema de suministro fármaco dérmico o transdérmico. Un objetivo clave en el diseño y optimización de formulaciones

permite la comprensión de factores que determinen un buen rendimiento *in vivo* (Godin & Touitou, 2007).

**1.3.1 Pruebas *in vitro* para evaluar la absorción dérmica.** Los métodos *in vitro* se han desarrollado para medir la penetración de fármacos y demás compuestos químicos a través de la permeación de las capas de la piel y su posterior entrada en un depósito fluido. Se puede utilizar piel no viable para medir sólo penetración y permeación o piel fresca y metabólicamente activa para medir simultáneamente penetración y metabolismo (OECD, 2004). La permeación a través de la capa externa de la piel no viable, el EC, es generalmente la etapa limitante en la absorción dérmica. La permeación de un compuesto a través del EC depende de factores específicos del propio compuesto, como el peso molecular, solubilidad, polaridad y estado de ionización (van Ravenzwaay & Leibold, 2004). Las propiedades de permeabilidad de la capa córnea no cambian después de la escisión del tejido del cuerpo y existe relación entre experimentos *in vivo* e *in vitro*. Así, los experimentos *in vitro* son apropiados para predecir la penetración dérmica tanto en animales como en el hombre (Scott et al, 1992; Howes *et al.*, 1996).

**1.3.1.1 Principios de las pruebas *in vitro* que utilizan muestras de piel.** Los métodos más comunes para evaluar la penetración y permeación *in vitro* en la piel son las celdas de difusión, las cuales varían en complejidad desde celdas estáticas simples de dos compartimentos hasta celdas con flujo multi chaquetas. En todos los casos, la piel extirpada es colocada como barrera entre el compartimento donador y receptor de las celdas y, la cantidad de compuesto prueba o ensayo que permea desde la cámara donante hacia el medio receptor se determina en función del tiempo. Es esencial la agitación constante de la fase receptora (WHO, 2006). Las celdas de difusión son de tipo vertical o de tipo horizontal, las cámaras receptoras tienen aproximadamente un volumen entre 0,5 y 10 mL y el área de superficie de las membranas expuestas es aproximadamente de 0,2 a 2 cm<sup>2</sup>. El compartimento donador de las celdas se puede cubrir, para

proporcionar condiciones oclusivas o se puede mantener abierto, depende de los objetivos del estudio (OECD, 2004).

**1.3.1.2 Dosis finita e infinita.** Una dosis infinita, se define como la cantidad del compuesto prueba aplicado sólo o en un vehículo en ensayos de permeación, de tal manera que dicho compuesto alcanza y mantiene una velocidad máxima de absorción (por unidad de área). El volumen aplicado debe ser lo suficientemente grande para que no se agote la concentración del compuesto. Bajo las condiciones de una dosis finita, la velocidad máxima de absorción puede ser alcanzada en un tiempo determinado, pero no se mantiene o puede no ser alcanzada. La concentración del compuesto en el medio donante cambia debido a la absorción en la piel o a la evaporación. La dosis semi-infinita se simula como un caso intermedio entre la dosis infinita verdadera (sin disminución de la concentración en el vehículo durante la exposición) y una dosis finita (en la cual se reduce la concentración en el vehículo a menos del 10% de la concentración inicial después de 20 a 24 horas de exposición) (WHO, 2006; OECD, 2004).

**1.3.1.3 Elección y preparación de la piel.** Es posible utilizar piel de fuente humana o de animales de laboratorio. Aunque el uso de muestras de piel humana permite obtener datos más apropiados (para humanos) en condiciones *in vivo*, estas muestras no siempre están disponibles con facilidad. Los experimentos *in vitro* con piel humana viable generalmente se realizan con piel femenina abdominal o con piel de la mama, obtenida en autopsia o en cirugía cosmética. También se utiliza piel no viable de diferentes sitios anatómicos de cadáveres de hombres y mujeres (Bronaugh, 2004). La piel de rata es utilizada frecuentemente en estudios toxicológicos y en pruebas de pesticidas y la piel de cerdo es utilizada para pruebas cosméticas. Las guías OECD, (OECD, 2004) permiten algunos tipos de piel y sus métodos de preparación para ser utilizadas en ensayos de absorción.

Entre los modelos de piel animal utilizados en ensayos de permeación percutánea se encuentran: primates, porcinos, ratón, rata, conejillo de indias, y modelos de serpientes. El uso de primates se encuentra muy restringido en investigación. La piel porcina es obtenida con mayor facilidad y sus propiedades histológicas y bioquímicas han demostrado ser más similares a las de la piel humana. Debido a la disponibilidad, la piel de roedores es la más comúnmente utilizada en estudios de permeación *in vitro* e *in vivo*. Entre los roedores, la piel de rata tiene más similitudes estructurales y en cuanto a cinética de permeación con el tejido humano (Godin & Touitou, 2007), ya que la piel de los demás roedores generalmente muestra tasas más altas de penetración que la piel humana (Sato *et al.*, 1991; Godin & Touitou, 2007). La piel de serpiente fue propuesta como membrana en experimentos de permeación en piel. A través de termogramas y espectros infra-rojo se demostró que el EC de piel de serpientes, porcinos y humanos presenta algunas similitudes en estructura y composición. La característica distintiva en la piel mudada de serpiente es la falta de folículos (Godin & Touitou, 2007).

En cuanto a la preparación de las membranas de piel existen diferentes métodos que pueden ser utilizados: (i) Grosor completo de la piel, incluye el EC, epidermis viable y dermis (ii) Eliminación de la dermis profunda, para obtener muestras de piel de espesor y forma uniforme. (iii) Membranas epidérmicas, comprenden la epidermis viable y el estrato córneo. (iv) Sólo el EC (Brain *et al.*, 1998).

**1.3.1.4 Aplicación de compuestos.** Antes de la aplicación de la sustancia prueba o de ensayo, se deben considerar factores que pueden tener influencia sobre la permeación como la naturaleza del vehículo y la dosis dérmica (la cual es dependiente de la concentración de la sustancia prueba en el vehículo y de la cantidad aplicada por centímetro cuadrado de piel). Otros factores incluyen el régimen de dosificación (finito o infinito) y condiciones post-dosis como la oclusión.

El tipo de vehículo aplicado tendrá influencia directa en la penetración y en la permeación. En principio, el flujo máximo de un soluto desde soluciones saturadas a través de una membrana debe ser idéntico e independiente del vehículo, siempre que el vehículo no afecte la membrana y no ocurra sobresaturación. Por lo tanto, al comparar los flujos de soluto a partir de una concentración dada en diferentes vehículos, el efecto del vehículo también puede ser visto como una modulación del coeficiente de partición  $K_m$ , vehículo/EC, el cual es un importante factor en la determinación de la velocidad de penetración de una sustancia química en el EC. El coeficiente de partición vehículo/EC describe la afinidad relativa de una sustancia química por el vehículo en el cual se aplica. Cuanto más soluble el compuesto en el vehículo, mayor es la probabilidad de que se mantenga en él (WHO, 2006).

El fluido receptor no debe actuar como un paso limitante en el proceso de permeación y además, no debe afectar la integridad de la piel. Para compuestos solubles en agua, el uso de solución salina o solución salina tamponada isotónica es suficiente. Para compuestos lipofílicos el fluido receptor puede contener mezclas de solventes como etanol : agua, (aunque se puede sobre-estimar la permeación) éter oleílico en agua o albúmina de suero bovino. El tiempo de exposición de los ensayos puede variar de unos pocos minutos a un máximo de 24 horas. El aumento en el tiempo de exposición es apropiado sólo en caso de largas fases de retardo o para aplicación de dosis infinita. El aumento de tiempo puede deteriorar el estado de la piel (Roberts *et al.*, 2002).

**1.3.1.5 Otros métodos *in vitro*.** Para determinar el potencial de la piel para actuar como un depósito de almacenamiento de una sustancia o compuesto específico, se analizan las muestras de piel utilizadas en las celdas de difusión. La sustancia previamente radiomarcada se aplica a la superficie de la piel por un tiempo determinado. Después de este tiempo el experimento finaliza y la sustancia prueba ya se ha difundido a través de la piel y en el líquido receptor,

posteriormente se analiza el reservorio del compuesto aplicado. Diversos estudios han evaluado el uso de la técnica de extracción con cinta “*tape stripping*” *in vitro*, esta técnica es utilizada para la eliminación del EC (Rougier *et al.*, 1986).

**1.3.2 Pruebas *in vivo* para evaluar la absorción dérmica y la posible distribución en órganos.** Los métodos *in vivo* permiten la determinación de la captación cutánea así como de la absorción sistémica de la sustancia prueba. La ventaja principal de la realización de un estudio *in vivo* en lugar de un estudio *in vitro*, es que en el primero se utiliza un sistema fisiológico y metabólico real (Brain *et al.*, 1998; WHO, 2006). En estudios *in vivo* la penetración dérmica se lleva a cabo en animales de laboratorio, generalmente en roedores. La rata es la especie comúnmente utilizada en estos ensayos, sin embargo otras especies animales como monos y cerdos también han demostrado absorción en la piel, similar a la de los seres humanos. Las desventajas de utilizar estos modelos animales son los costos de mantenimiento y las dificultades en su manipulación. Actualmente, los métodos utilizados en absorción dérmica tienen dos objetivos: (i) *eficacia*, los métodos seguidos deben permitir la selección de la mejor formulación para un compuesto dado, y (ii) *seguridad*, los métodos también deben entregar la cantidad apropiada del compuesto ya sea para mantenerse como reservorio en la piel o liberarse a la corriente sanguínea y a diferentes órganos y tejidos (Godin & Touitou, 2007).

**1.3.2.1 Transporte de compuestos a través de la piel y su distribución.** En la distribución de un compuesto a partir de la piel hacia los órganos, juegan un papel importante los mecanismos de cada capa de la piel (Roberts *et al.*, 2002). En el EC el transporte se da por difusión pasiva, por vía inter o transcelular. La permeación a lo largo de estas vías depende de la afinidad del compuesto por los entornos lipídicos, el medio interno de los corneocitos y de la capacidad de las moléculas para permear la pared celular de los corneocitos. La importancia relativa de estas vías se ha convertido recientemente en un enfoque de

investigación en la distribución de compuestos aplicados tópicamente (Bouwstra *et al.*, 2003). Seguidamente, la difusión del fármaco en la epidermis viable puede ser considerada como un proceso de difusión a través de un medio acuoso que se ve obstaculizado por la presencia de proteínas y cruces de membrana celular (Bhatt *et al.*, 2008). Otro proceso de la epidermis viable durante la penetración y distribución de fármacos es la unión y retención del compuesto dentro de esta capa de la piel, el metabolismo y el transporte activo que allí se empieza a presentar. De forma similar a la epidermis viable, la difusión de compuestos a través de la dermis está obstaculizada a través de un medio acuoso. Sin embargo, hay diferencias importantes como la vascularización, que contribuye al transporte y distribución de los compuestos en y a través de la piel hacia el interior de un organismo y las opciones que provee esta capa para la unión y retención de compuestos. El sistema vascular cutáneo tiene una importante relación con la permeación y distribución de compuestos. En ensayos *in vivo* se ha observado aumento de la distribución de compuestos en sitios contralaterales debido a la vasodilatación y distribución reducida en estos sitios por fenómenos de vasoconstricción (Clough *et al.*, 2002).

Posterior a la distribución de un compuesto en las capas de la piel, la cinética de liberación tópica en la circulación sistémica puede ser distintiva, en comparación con la administración intravenosa, debido a las diferencias significativas en las tasas de absorción. En la administración intravenosa la absorción es instantánea y mucho más rápida que la eliminación, para la administración tópica la absorción puede ser mucho más lenta que la eliminación. La penetración y permeación percutánea, no garantiza necesariamente una respuesta de absorción o eliminación. Así, dos factores determinantes en la elección de un compuesto son: el efecto que se desea causar con el estudio (local o sistémico) y la potencia del compuesto. Se ha señalado que la potencia y la penetración en la piel son igualmente importantes en la determinación de la eficacia de los productos tópicos. La penetración directa en la piel y su acumulación, se asocia con una

eficacia local sin efectos sistémicos adversos. En algunos casos incluso, los niveles de detección pueden ser limitantes (Lefevre *et al.*, 2007).

## **1.4 POTENCIADORES DE LA PERMEACIÓN Y SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS**

**1.4.1 Potenciadores químicos de la permeación.** Los potenciadores de la permeación son compuestos incorporados dentro de una formulación, que promueven la permeabilidad de la piel con el fin de lograr el flujo de un compuesto deseado. Un potenciador de la permeación debe ser: no irritante, no sensibilizante, no alergénico y no tóxico, debe trabajar rápidamente, y la actividad y duración del efecto debe ser predecible y reproducible. No debe tener actividad farmacológica dentro del cuerpo y debe trabajar unidireccionalmente. Debe mostrar compatibilidad con la formulación y los componentes del sistema, también debe ser inodoro, insípido, incoloro y cosméticamente aceptable y tener un parámetro de solubilidad aceptada (Marjukka *et al.*, 1999; Godin & Touitou, 2007). Las acciones de un potenciador en la bicapa lipídica del EC pueden implicar interacciones en los grupos de lípidos de cabeza polar de la bicapa lipídica y entre las colas hidrófobas de la bicapa (Marjukka *et al.*, 1999; Williams & Barry, 2004).

Entre las sustancias utilizadas, con actividad para mejorar la penetración de compuestos, se encuentran: El agua, sulfóxidos, azonas, pirrolidinas, ácidos grasos, alcoholes y glicoles, surfactantes, urea, aceites esenciales y fosfolípidos. Estos potenciadores de la permeación son los componentes principales de diferentes sistemas de liberación de fármacos (Williams & Barry, 2004).

**1.4.2 Sistemas de liberación de fármacos.** Los sistemas de liberación de fármacos surgen como consecuencia de la imposibilidad de trasladar de forma directa al organismo los principios activos que constituyen los medicamentos.

Estos sistemas de liberación están formados por un principio activo y un sistema transportador que puede dirigir la liberación del fármaco al sitio adecuado y en la cantidad apropiada. Es decir, los transportadores de fármacos son sistemas cuya función es transportar el fármaco hasta al lugar en donde debe ser liberado de manera específica. Estos vehículos deben tener: baja toxicidad, propiedades óptimas para el transporte y liberación del fármaco y vida media larga (Gonzales *et al.*, 2006).

**1.4.2.1 Sistemas de liberación de fármacos aplicados tópicamente.** Los sistemas de liberación de fármacos tópicos se diferencian en su composición y estructura, pero todos tienen en común los mismos objetivos: (i) ser capaces de transportar fármacos de manera específica y altamente controlada (ii) evitar problemas relacionados con la solubilidad del fármaco, y (iii) proporcionar alternativas a las vías de administración tradicionales, mucho más invasivas (Gonzales *et al.*, 2006). Así, estos sistemas se pueden clasificar dentro de tres generaciones. La primera generación, es responsable de la mayoría de parches transdérmicos para uso clínico. Los compuestos utilizados son de bajo peso molecular, lipofílicos y se manejan en bajas dosis. El enfoque de esta generación está limitado por la barrera que representa el EC. La segunda generación, reconoce la necesidad de hacer más eficaz la permeabilidad de la piel para ampliar el alcance de los fármacos. En esta generación un potenciador ideal debe: (i) Aumentar la permeabilidad de la piel mediante la interrupción reversible de la estructura del EC. (ii) Proporcionar una fuerza motriz adicional para el transporte en la piel. (iii) Evitar lesiones en los tejidos vivos (Prausnitz *et al.*, 2004). Esta generación ha avanzado principalmente en la mejora de la liberación o entrega de pequeñas moléculas en el sitio terapéutico localizado. Liposomas, dendrímeros y microemulsiones, se han utilizado como potenciadores con estructura supramolecular que no sólo pueden aumentar la permeabilidad sino que también aumentan la solubilidad del fármaco en la formulación y la partición en la piel (Kogan & Garti, 2006; Prausnitz & Langer, 2008). También se han desarrollado

formulaciones de liposomas ultradeformables y actualmente algunos estudios con estos métodos están en ensayos clínicos (Prausnitz & Langer, 2008). Otro enfoque de administración tópica que se ha aplicado es el uso de pro-drogas a través de la adición de algunos grupos químicos que aumentan la lipofiliidad de los fármacos y facilitan su transferencia. (Sloan *et al.*, 2006). La tercera generación, aplica un nuevo enfoque que permite crear efectos que mejoren la permeabilidad de la piel en el EC y evita la irritación en los tejidos más profundos, donde posiblemente la formulación se diluye o cambia. Recientemente los péptidos han sido examinados como potenciadores de la permeabilidad de la piel. La electroporación, según se ha demostrado, también altera las estructuras de la bicapa lipídica del EC, se ha probado en modelos de pequeños fármacos, péptidos y vacunas (Denet *et al.*, 2004). Durante la última década se han desarrollado microagujas como un medio de administración de fármacos en la piel de forma mínimamente invasiva (Sivamani *et al.*, 2007). La ablación térmica y la microdermoabrasión, han demostrado la capacidad para entregar diferentes compuestos a través de la piel. Estos avances científicos y tecnológicos que permiten la interrupción selectiva de la capa córnea, mientras se logra proteger los tejidos más profundos de la piel, han llevado a un nuevo nivel las capacidades de entrega de fármacos tópicos y a su vez han abierto el campo científico para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos (Prausnitz & Langer, 2008).

**1.4.3 La nanotecnología aplicada a sistemas de liberación de fármacos.** El propósito principal de la nanotecnología en cuanto a avances farmacéuticos es el diseño de sistemas de liberación de fármacos miniaturizados para lograr una adecuada estabilidad, mejorada absorción, liberación controlada, transferencia cuantitativa y por lo tanto, mayor actividad farmacodinámica (Huges, 2005). El tamaño de las partículas garantiza una mayor tolerancia del tejido y mejora la permeación y la distribución y no se presenta reacción a cuerpos extraños. El objetivo principal de la nanoterapia es orientar las moléculas específicas de un

fármaco a los tejidos enfermos. La investigación sobre sistemas de liberación controlada de fármacos ha alcanzado un gran progreso en cuanto a concentraciones específicas y dosificación en el sitio terapéutico (Santos-Magalhaes *et al.*, 2000). Las nanopartículas, al ser liberadas de forma específica sólo en los órganos, tejidos o células dañadas, disminuyen la toxicidad asociada al fármaco. Por otra parte, al ser posible la liberación paulatina del medicamento de acuerdo con las necesidades del paciente, se consiguen disminuir los posibles efectos adversos que puedan producirse como consecuencia de la ingesta masiva del fármaco (Wong *et al.*, 2012).

Los principales nanosistemas para el transporte y liberación de fármacos en nanomedicina son: micelas, liposomas, dendrímeros, nanopartículas, nanotubos, conjugados poliméricos y nanoemulsiones. Sus características principales observan en la figura 6.

**Figura 6.** Nanosistemas para la liberación de fármacos.



Fuente: Modificado de Gonzales *et al.*, (2006).

**1.4.3.1 Nanoemulsiones.** Las nanoemulsiones son dispersiones de aceite y agua, son termodinámicamente estables y presentan tamaños de gota entre 10 y 100 nm. Una de las ventajas de estos sistemas de liberación radica en que son

generados espontáneamente y pueden ser producidos a gran escala sin necesidad de alta energía de homogeneización (Sosnik *et al.*, 2010). Las nanoemulsiones solubilizan compuestos lipofílicos y son altamente biocompatibles. Debido a que muchos aceites utilizados en la elaboración de nanoemulsiones son comestibles, esta clase de nano transportadores son particularmente utilizados en fármacos de administración oral (Wong *et al.*, 2012).

Se han desarrollado diversas nanoemulsiones de diferentes compuestos con excelentes resultados. Ahmed *et al.*, (2008), desarrollaron diferentes nanoemulsiones aceite en agua de administración intravenosa utilizando excipientes farmacéuticamente aceptables en las fases oleosa y acuosa. Vyas *et al.*, (2008), prepararon una nanoemulsión con aceite comestible para la liberación de un inhibidor de proteasa. Esta nanoemulsión aumentó cinco veces la biodisponibilidad oral del fármaco al cerebro sin toxicidad.

De igual forma, se han llevado a cabo diversos estudios de incorporación de fármacos, especialmente de carácter lipofílico de aplicación tópica en nanoemulsiones. Mediante estos sistemas de liberación se incrementa la tasa de permeación y se mejora el efecto tópico debido al tiempo prolongado de residencia del fármaco en las capas de la piel (Fasolo *et al.*, 2007).

Cuando se aplica tópicamente una nanoemulsión, conteniendo en su dominio lipídico un fármaco lipofílico disuelto, se espera que dicha nanoemulsión penetre el EC alterando la estructura de bicapa y permanezca sin variaciones en las siguientes capas de la piel (Shakeel *et al.*, 2012). Por otra parte, el dominio hidrofílico de una nanoemulsión puede hidratar el EC en mayor grado y juega un importante papel en la difusión percutánea de fármacos. Cuando el fluido acuoso de la nanoemulsión entra a la vía polar, incrementa el volumen interlamelar de la bicapa lipídica del EC, lo cual conlleva a la ruptura de su estructura interfacial. Así, un fármaco lipofílico puede permear más fácilmente a través de las capas de la

piel. Por otra parte, el tamaño de las gotas de la nanoemulsión también puede afectar su eficiencia, las gotas de menor tamaño son un excelente vehículo para potenciar la permeabilidad en la piel (Abu-Elyazid *et al.*, 2011).

## 1.5 APROXIMACIÓN A LA FARMACOCINÉTICA

**1.5.1 Generalidades y principios farmacocinéticos.** La farmacocinética es la rama de la farmacología que estudia el paso de un fármaco a través de un organismo en función del tiempo y de la dosis aplicada (Winter, 2003). La interacción de un fármaco con un organismo requiere conocer qué sucede con el medicamento (aspectos farmacocinéticos) y que sucede con el organismo (aspectos farmacodinámicos) (Dagan, 2007). La farmacocinética comprende los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco, así como el estudio de los factores que pueden modificar la cantidad del compuesto disponible en el organismo (Rabasco, 2002).

La *liberación*, constituye la “salida” del fármaco de la forma farmacéutica que lo transporta. Por lo general, implica la disolución del compuesto en algún medio corporal. La velocidad de liberación depende de: el tamaño de partícula del fármaco, solubilidad del fármaco, formulación del medicamento, técnica de elaboración y forma farmacéutica utilizada. Después de acceder a la circulación general, el fármaco se reparte por todo el organismo transportado por la sangre, este proceso se conoce como *distribución*. Una vez en el espacio vascular, los fármacos pueden unirse a proteínas plasmáticas o penetrar en células sanguíneas. Después que el fármaco ha accedido a la sangre, el organismo reconoce la entrada de una sustancia extraña y pone en marcha una serie de mecanismos destinados a su expulsión (Winter, 2003). La *eliminación* se divide en dos grupos: biotransformación y excreción. La biotransformación, también denominada *metabolización*, es el proceso por el que se produce una modificación

en la estructura química del fármaco debido a la actuación de los sistemas enzimáticos del organismo. Como consecuencia de ello, se obtienen productos de transformación más hidrosolubles y menos activos que los productos iniciales. La *excreción* es el proceso por el que se elimina el fármaco sin sufrir modificaciones (Rabasco, 2002).

**1.5.2 Distribución de fármacos.** La distribución de fármacos en un organismo se refiere a la transferencia reversible de dicho fármaco entre diferentes localizaciones dentro del cuerpo. La información definitiva de la distribución de un fármaco depende de la concentración de este en varios tejidos (Patsalos, 2005; Rabasco, 2002).

**1.5.2.1 Unión a proteínas plasmáticas.** La unión de los fármacos a proteínas plasmáticas se efectúa a través de enlaces reversibles. Las proteínas que intervienen son: albúmina, alfa-1-glicoproteína ácida, globulinas y lipoproteínas. El porcentaje de unión a proteínas plasmáticas se puede considerar como una constante para cada fármaco, siendo independiente de su concentración plasmática. Los fármacos que son ácidos débiles se unen prioritariamente a la albúmina, mientras que las bases débiles lo hacen indistintamente a todas las proteínas antes citadas. En la fijación de los fármacos a las proteínas plasmáticas la fracción que se encuentra unida es farmacológicamente inactiva, actúa como un reservorio o una forma de transporte, permanece en la sangre y no es metabolizada ni excretada. La fracción libre es la que ejerce la acción farmacológica y se halla disponible para su distribución, biotransformación o excreción (Rabasco, 2002).

**1.5.2.2 Distribución tisular.** Constituye el proceso de reparto del fármaco en el conjunto de órganos y tejidos, esta distribución se presenta en el organismo a diferente velocidad, según el tipo de tejido. Entre otros, los factores que influyen sobre este proceso son: características fisicoquímicas del fármaco, su capacidad

para unirse a proteínas plasmáticas, irrigación del órgano y afinidad particular del fármaco por un tejido específico. En muchas ocasiones se ha podido detectar cierto tropismo del fármaco hacia determinados tejidos, hecho que puede facilitar su acción farmacológica (Patsalos, 2005).

**1.5.2.3 Paso de la barrera hematoencefálica.** El cerebro se encuentra protegido por un complejo sistema de barreras que regulan la composición del líquido cefalorraquídeo e impiden el acceso de numerosos fármacos (Wong *et al.*, 2012). La barrera hematoencefálica está constituida por los capilares del cerebro que de manera opuesta a otros capilares, están formados por células endoteliales estrechamente unidas por angostas zonas de conexión, que obligan a las moléculas a pasar a través de la membrana y el contenido de la célula. Las sustancias hidrosolubles tienen mayor dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica, mientras que los compuestos liposolubles penetran en el cerebro de una forma más fácil (Alavijeh *et al.*, 2005).

**1.5.2.4 Cinética de distribución.** Desde un punto de vista cinético se consideran tres compartimentos según la velocidad con que el fármaco los ocupa y abandona. El *compartimento central* incluye el líquido plasmático intersticial e intracelular fácilmente accesible, es decir, el medio acuoso de los tejidos bien irrigados como corazón, pulmón, hígado y riñón. El *compartimento periférico superficial* está formado por el líquido intracelular poco accesible, medio acuoso de tejidos menos irrigados como piel, grasa, músculo o médula ósea. Y el *compartimento periférico profundo*, incluye los depósitos tisulares a los que el fármaco se une más fuertemente y de los que se libera con mayor lentitud (Benet & Zia-Amirhosseini, 1995). La distribución de un fármaco se considera *monocompartimental* cuando se distribuye rápida y uniformemente por todo el organismo, es decir, el organismo se comporta como un único compartimento central. En el modelo de distribución *bicompartimental* los fármacos administrados difunden con rapidez al compartimento central y con más lentitud al compartimento periférico. Los

fármacos con distribución *tricompartimental* se fijan fuertemente a determinados tejidos en los que se acumulan y de los que se liberan con lentitud. La mayoría de fármacos se adaptan a un modelo bicompartimental, pero en algunos la distribución a los tejidos es tan pequeña que sólo se aprecia por vía intravenosa, por lo que se tratan cinéticamente como monocompartimentales (Castano *et al.*, 2005).

**1.5.3 Vías de administración de fármacos.** La vía de administración de un fármaco es la ruta que se elige para incorporar dicho compuesto a un organismo. Existen diversas vías de administración de fármacos entre las que se encuentra la *vía enteral*, la cual indica que un fármaco alcanza su objetivo después de sufrir absorción gastrointestinal. Las vías oral, sublingual, gastroentérica y rectal, hacen parte de esta clasificación. En segundo lugar está la *vía parenteral*, en la cual los fármacos se inyectan directamente dentro del organismo. Entre estas vías se encuentran: la vía subcutánea, vía intramuscular, vía intravenosa, vía intraarterial y vía intraperitoneal. En la *vía pulmonar*, la absorción se produce exclusivamente por difusión pasiva a través de las membranas de los bronquios, bronquiolos y alvéolos. Dada la gran superficie existente a este nivel y el elevado flujo sanguíneo que poseen los pulmones, se puede afirmar que esta vía constituye una excelente entrada de fármacos en el organismo. Finalmente, los fármacos administrados por *vía tópica* se aplican directamente en la piel o en las mucosas. Los fármacos tópicos se aplican en el sitio terapéutico a nivel local, por lo cual no tienen que cruzar otras barreras del cuerpo (Mendoza, 2008).

**1.5.4 Modelos experimentales de estudios farmacocinéticos.** El objetivo de los estudios farmacocinéticos es determinar la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de un fármaco en animales de experimentación. Al conocer estos parámetros, la información farmacológica y toxicológica del compuesto será más eficaz (Winter, 2003). No obstante, es importante destacar que no siempre se pueden extrapolar los resultados obtenidos con los modelos

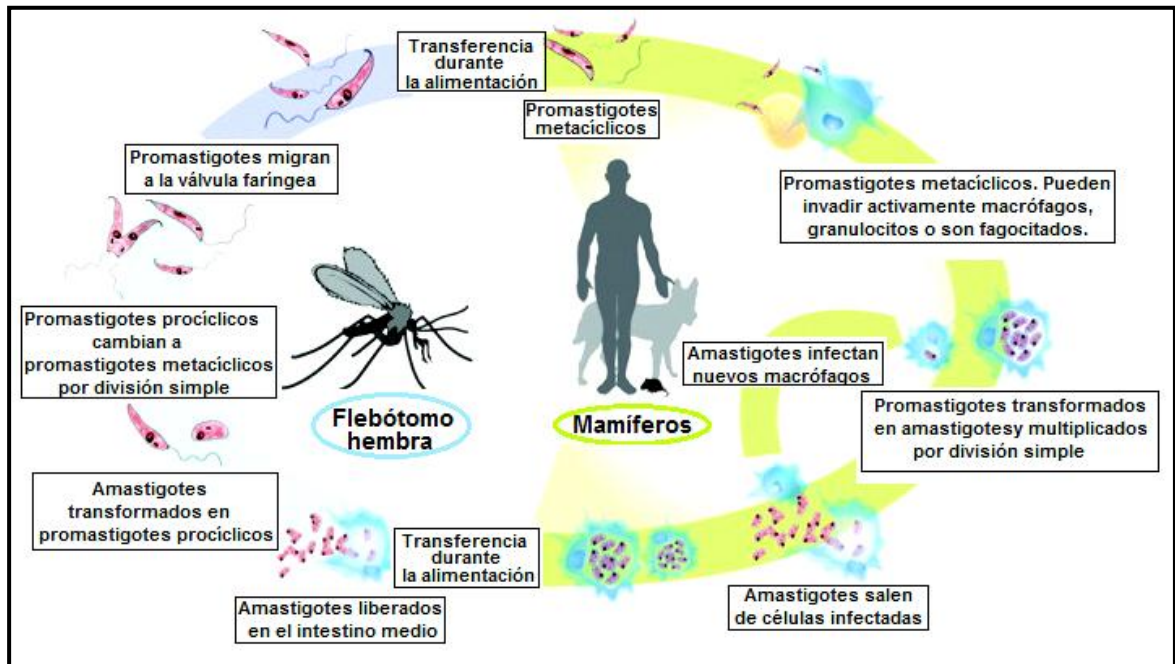
animales a los seres humanos. Se debe tener en cuenta que según la especie animal utilizada, los resultados obtenidos para un mismo fármaco pueden variar. Por ejemplo, el fenómeno del primer paso hepático es mucho mayor en perros y ratas, la eliminación suele ser más rápida en los roedores, excepto la rata y la semi- vida plasmática varía mucho según la especie animal (Mendoza, 2008). Sin embargo, en algunos casos los estudios pre-clínicos son la única opción para conocer determinados parámetros imposibles de estudiar en el ser humano, como la distribución de fármacos en los diferentes tejidos de un organismo. Por otro lado, el estudio de las interacciones farmacocinéticas y la relación concentración-efecto, puede ser un punto de referencia clave en la búsqueda de dosis y en la determinación de concentraciones plasmáticas eficaces en humanos (Hernández *et al.*, 2010).

## **1.6 LEISHMANIASIS: LEISHMANIASIS CUTÁNEA**

**1.6.1 Generalidades.** La leishmaniasis es una enfermedad transmitida por vectores infectados de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* causada por protozoos intracelulares del género *Leishmania*. Varias manifestaciones clínicas se conocen bajo el término leishmaniasis: leishmaniasis visceral (LV), leishmaniasis cutánea (LC) y leishmaniasis mucocutánea (LMC) (Herwaldt, 1999). El tipo de enfermedad depende de la especie de *Leishmania* involucrada y del estado inmunológico del paciente (Grimaldi & Tesh, 1993). La LC es endémica en más de 70 países en todo el mundo. Los datos de vigilancia indican que el número global de casos ha aumentado durante la última década en Afganistán, Bolivia, Brasil, Colombia, Perú y Siria (Reithinger *et al.*, 2007). Entre los agentes causales de LC se encuentran en El Viejo Mundo *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica* también *L. infantum* y *L. donovani*. En el Nuevo Mundo los agentes causales son especies del complejo *L. mexicana* especialmente *L. mexicana*, *L. (Leishmania) amazonensis* y *L. venezuelensis* y especies del sub género *Viannia* como *L. (V.)*

*braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) peruviana*. También organismos como *L. major* y *L. chagasi* (syn. *L. infantum*) (Young *et al.*, 1987; Herwaldt, 1999). La LC se caracteriza por el desarrollo de lesiones ulcerativas en piel. En Colombia, según el Ministerio de la Protección Social (2008), la presentación más frecuente es la úlcera indolora con compromiso linfático y adenopatía regional. La úlcera típica es redondeada, de bordes elevados, eritematosos, acordonados, con centro granulomatoso limpio y base infiltrada. Regularmente, son indoloras y de crecimiento lento. Cuando hay sobreinfección bacteriana se tornan dolorosas, de fondo sucio, secreción purulenta, recubiertas por costra, eritema en su periferia y signos inflamatorios locales, se pueden presentar como lesiones únicas o múltiples. La enfermedad puede tornarse crónica luego de doce semanas sin cierre de la úlcera o con la transformación de la misma en una placa verrugosa de bordes elevados recubiertos con escamas o costras que coinciden con los bordes de la cicatriz de la lesión inicial (Calvopina *et al.*, 2005). Histológicamente las lesiones presentan un infiltrado celular compuesto principalmente por macrófagos vacuolados en la dermis con amastigotes en su interior. También se presenta una mezcla de linfocitos y células gigantes multinucleadas, en algunos casos también hay presencia de neutrófilos y eosinófilos. Cuando el infiltrado invade la dermis, puede haber pérdida de estructuras anexiales (Moskowitz & Kurban, 1999). El ciclo de vida de parásitos *Leishmania* implica la alternancia entre un hospedero mamífero y un flebótomo (figura 7).

**Figura 7.** Ciclo de vida de *Leishmania* spp.



Fuente: Tomado de Harhay *et al.*, (2011).

En el hospedero mamífero, se presentan como promastigotes metacíclicos (formas infectivas del parásito) que se introducen en la piel por la picadura del vector. Posteriormente son encapsulados por macrófagos (células fagocíticas del sistema inmune), en donde se transforman en amastigotes intracelulares dentro de una vacuola parasitófora, allí evitan su degradación y establecen condiciones de proliferación. En el vector las especies de *Leishmania* se desarrollan en el tracto digestivo, en donde se han descrito varias morfologías que en conjunto se conocen como metaciclogénesis, la cual involucra la transformación de promastigotes no infectivos o poco infectivos (procíclicos) en promastigotes altamente infectivos (metacíclicos). Estos promastigotes metacíclicos serán introducidos de nuevo en el hospedero mamífero para continuar el ciclo (Descoteaux & Turco, 1999).

**1.6.2 Tratamiento.** Los fármacos de primera opción para el tratamiento de leishmaniasis son los antimoniales pentavalentes como el estibogluconato sódico o Pentostám<sup>®</sup> y el antimonio de meglumina o Glucantime<sup>®</sup> (Croft *et al.*, 2006). Antes de iniciar el tratamiento, el paciente debe evaluarse clínica y paraclínicamente para descartar alteraciones cardíacas, hepáticas o renales. A los individuos mayores de 45 años y a quienes se les detecten alteraciones clínicas, deben practicárseles: electrocardiograma, pruebas de función renal, pancreática y hepática. Dado que en los casos de leishmaniasis cutánea y mucosa el tratamiento debe hacerse en forma ambulatoria, sistémica y prolongada, éste deberá efectuarse bajo supervisión del personal de los servicios de salud para garantizar la adherencia al tratamiento. Las fallas en el tratamiento se deben, primordialmente, a la administración de dosis sub-terapéuticas. Al considerar el esquema terapéutico óptimo para leishmaniasis cutánea se recomienda una dosis única diaria de antimonio pentavalente de 20 mg/kg de peso/día durante 20 días, sin dosis límite, lo que garantiza 90 a 95% de curación (Soto *et al.*, 2004). Entre las desventajas que ha presentado este tratamiento se encuentran: dolor en el sitio de aplicación, vómito, náuseas, mialgias, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, cefalea y diarrea (Oliveira *et al.*, 2009). El tratamiento de segunda elección, incluye el Isotianato de Pentamidina (Pentacarinat<sup>®</sup>), sin embargo, desde 1983 su efecto terapéutico ha disminuido significativamente hasta un 70%, reduciendo su utilización en diferentes áreas (Pérez-Victoria *et al.*, 2006). La Anfotericina B (Fungizone<sup>®</sup>), originalmente desarrollado como un antimicótico sistémico, también presenta actividad anti-*Leishmania*; sin embargo, tiene el inconveniente de ser altamente tóxico y por lo tanto su administración requiere cuidados especiales. Su formulación liposomal AmBisome<sup>®</sup>, ha mostrado un 95% de cura en pacientes de la India con LV no obstante, el alto costo limita su uso (Croft *et al.*, 2006). La miltefosina (Impavido<sup>®</sup>) es un alkyfosfolípido inicialmente desarrollada como un fármaco anti-cáncer. Es el primer tratamiento oral para la leishmaniasis (Croft & Coombs, 2003). En una serie de pacientes colombianos se alcanzaron tasas de curación de 94% con una dosis de 2 a 2.2 mg/kg/día durante tres a cuatro

semanas. En otro estudio de 68 pacientes colombianos, sin documentar claramente la especie infectante, las tasa de curación (entendida como ausencia de parásitos en la lesión y re-epitelización de la lesión luego de seis meses de tratamiento) con un esquema de 2.5mg/kg/día por 28 días fue de 91%. La miltefosina ha demostrado ser efectiva y segura en el tratamiento de LV en la India, pero al comparar la efectividad in vitro entre aislamientos de *leishmania donovani* (productora de leishmaniasis visceral en el Viejo Mundo) y especies productoras de leishmaniasis cutánea en Perú (*L. (V.) braziliensis*, *L. mexicana*, *L. guyanensis*) la efectividad es menor en estas ultimas (Soto *et al.*, 2004).

**1.6.2.1 Tratamientos locales en leishmaniasis cutánea.** Los tratamientos locales para el tratamiento de la LC incluyen terapias tanto farmacológicas como no farmacológicas o una mezcla de las dos. El interés por las terapias tópicas se inició con los estudios de El-On *et al.*, (1984) con Paromomicina (PM), un antibiótico aminoglucósido identificado originalmente como anti-*Leishmania* en la década de 1960. En esta investigación se demostró la curación completa de lesiones por *L. major* en ratones BALB/c. En la misma serie de experimentos, la PM combinada con otros aminoglucósidos o con potenciadores de penetración dieron altos niveles de actividad (Garnier & Croft, 2002). Entre los efectos adversos de esta formulación se encuentran irritación severa e intolerancia. (Soto *et al.*, 1998). Soto *et al.*, (2002), estudiaron la eficacia de WR279396, una formulación tópica de aminoglucósidos en un ensayo clínico de LC realizado en Colombia concluyendo que la formulación es no tóxica y acelera significativamente el tiempo de curación en pacientes infectados con *L. (V.) panamensis*. Debido a que la administración oral de miltefosina presentó baja eficacia y efectos secundarios, se incorporó en una formulación tópica (6%) (Dummer *et al.*, 1993). Esta formulación conocida comercialmente como Miltex<sup>®</sup> ha sido aprobada en el tratamiento de tumores cutáneos pero en LC no se ha demostrado su eficacia (Soto *et al.*, 2001). Las formulaciones lipídicas de Anfotericina B (AmB) han reducido la toxicidad en comparación con la formulación original Fungizone).

Cuando se dispersan en una solución acuosa como Amphocil® (dispersión coloidal de sulfato de colesterol y AmB) y Abelcet® (complejo fosfolípidos/AmB), demostraron un efecto curativo sobre lesiones causadas por *L. major* (Frankenburg *et al.*, 1998). La terapia no farmacológica o física, incluye cauterización, escisión quirúrgica, crioterapia, termoterapia y terapia fotodinámica. Se ha demostrado que algunas especies de *Leishmania*, agentes causales de LC son sensibles a temperaturas mayores a 39°C por lo cual la termoterapia representa gran utilidad como tratamiento único o combinado (Palumbo, 2009). En un estudio realizado utilizando crioterapia, la tasa de curación fue de 73%, comparada con una tasa de curación de 85% en terapia con Pentostam (Gurei *et al.*, 2000). La terapia combinada de crioterapia y antimoniales pentavalentes ha mostrado mejores resultados que las terapias individuales (Asilian *et al.*, 2004)

## 1.7 TERAPIA FOTODINÁMICA (TFD)

**1.7.1 Generalidades.** Si bien, existen numerosos enfoques para el tratamiento de enfermedades cutáneas, la TFD ha pasado al primer plano en cuanto a elección del tratamiento a nivel mundial, debido a su capacidad de tratar una gran variedad de lesiones cutáneas. La (TFD) se basa en el uso de fotosensibilizadores (FS) aplicados tópicamente o sistémicamente, que son captados o retenidos selectivamente por células del tejido a tratar seguido de la aplicación local de dosis ópticas de luz (Vollet-Filho *et al.*, 2010). La foto-activación con luz visible a una longitud de onda apropiada excita el FS y la energía de este se transfiere a oxígeno molecular que conduce a la liberación de especies reactivas de oxígeno que a su vez desencadenan muerte celular y destrucción de tejidos (Paszko *et al.*, 2010). La base de la TFD es la interacción de la luz con el FS que conlleva a una transferencia de energía y un efecto químico local (Yslas *et al.*, 2009). La terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento mínimamente invasivo y mínimamente tóxico.

**1.7.2 Fotosensibilizadores (FS).** Los FS son compuestos químicos que pueden ser excitados (elevación en el nivel de energía) por la luz a una longitud de onda específica. Entre las características que debe presentar un FS para ser utilizado en TFD se encuentran: ser puros y bien caracterizados, presentar propiedades citotóxicas sólo en presencia de luz, ser retenidos en el órgano blanco y tener altos coeficientes de generación de especies reactivas de oxígeno y oxígeno singlete, el cual es el estado de excitación del oxígeno molecular, generado fotoquímicamente causando daños oxidativos. Un FS también debe ser eliminado rápidamente del organismo y no producir fotosensibilidad en el sitio de aplicación (Allison & Sibata, 2010). Los FS son abundantes en la naturaleza, sin embargo, muy pocos son comercialmente disponibles para uso clínico. (Dougherty *et al.*, 1998) redescubrieron la familia de porfirinas, FS de primera opción clínica (Allison *et al.*, 2006a). Photofrin<sup>®</sup> fue la primera porfirina disponible en el mercado, con un historial clínico largo y exitoso. Posteriormente, se desarrollaron otros FS sistémicos como: Verteporfina, NPe6 o MACE, Foscan<sup>®</sup>, Purlytin y Photoclor. Estos FS presentan acumulación tanto en tumores malignos como en tejidos, bajos coeficientes de actividad, requieren la administración de grandes cantidades, presentan máximos de absorción a una longitud de onda relativamente corta y presentan una alta tasa de acumulación en la piel, lo cual conduce a una prolongada sensibilidad. Con base en estas desventajas se han desarrollado FS de aplicación tópica. Los más exitosos y disponibles comercialmente son los derivados del ácido aminolevulínico (ALA). ALA, es un profármaco que se convierte enzimáticamente a protoporfirina IX (Pp IX). La metilación de ALA parece aumentar selectivamente su acumulación en tumores malignos. Esto ha llevado a una continua investigación sobre variaciones de ALA, con el objetivo de mejorar aún más la actividad y la selectividad (Allison *et al.*, 2006a). Actualmente se han realizado investigaciones respecto a otros FS entre los que se encuentran: ftalocianinas (Brasseur *et al.*, 1988; Rosenthal, 1991), naftalocianinas y clorinas (Magenheim *et al.*, 1993). Estos compuestos tienen la ventaja de ser puros y bien caracterizados, son generadores efectivos de oxígeno singlete y tienen un fuerte

pico de absorción en el rango de 650 a 800 nm de longitud de onda, lo que hace más efectiva la penetración de luz en el tejido. Presentan alta selectividad por el tejido blanco y rápida eliminación del cuerpo. Sin embargo, la mayoría de estos FS son hidrofóbicos, por esta razón es necesario desarrollar otros sistemas de aplicación como dispersiones oleosas, liposomas y partículas poliméricas o conjugados polímero-hidrofílico/FS, que actúan como sistemas de liberación (Oenbrink *et al.*, 1988).

**1.7.3 Ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl).** Las ftalocianinas son potentes FS (Allen *et al.*, 2001), su estructura está basada en las porfirinas y generalmente incluyen un átomo central metálico como el zinc, silicio o aluminio para aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno y oxígeno singlete. Presentan altos niveles de absorción en el rango de 670 nm y tienen capacidades fluorescentes. Debido a que estos FS son altamente hidrofóbicos, están encapsulados dentro de formulaciones tópicas para un uso adecuado. Las ftalocianinas metálicas presentan mejor actividad que las ftalocianinas sin metal. Las metaloftalocianinas han generado considerable atención en los últimos años debido a su uso potencial como FS en TFD de enfermedades neoplásicas (Chan *et al.*, 1997). Entre ellas la PcAlCl, es un eficiente FS en estudios de TFD, tiene la ventaja de ser fácilmente sintetizada, presenta bajo costo, está disponible en el mercado, es parcialmente soluble en agua y altamente citotóxica contra el tejido blanco (Rosenthal, 1991). Se ha determinado que promastigotes de *L. (V.) panamensis*, *L. chagasi* (syn. *L. infantum*) y *L. (Leishmania) amazonensis* son altamente fotosensibles a la TFD utilizando PcAlCl (Escobar *et al.*, 2006). A pesar del creciente conocimiento de los aspectos fotofísicos y fotoquímicos de la PcAlCl, hay una lenta evolución en los métodos analíticos para su distribución en sistemas biológicos. Por lo tanto, es de gran importancia evaluar su biodistribución y fototoxicidad en modelos experimentales, para su posible aplicación en pruebas clínicas. En este contexto sólo se ha reportado un estudio desarrollado por Kyriazi *et al.*, (2008) en el cual se examinó la farmacocinética de PcAlCl en un modelo

murino de piel normal y carcinoma de piel no melanoma. En el estudio se obtuvieron resultados positivos de absorción y penetración de PcAlCl en el tejido tumoral.

**1.7.4 Terapia fotodinámica en el tratamiento de LC.** Existen diversas aplicaciones de la TFD en medicina ya sea en procesos antitumorales o antimicrobianos, en los cuales los FS juegan un papel primordial (Ben-Hur & Rosenthal, 1985). Recientemente la TFD ha sido utilizada en el tratamiento de LC (Enk *et al.*, 2003) y su uso es soportado por demostraciones *in vitro* de la actividad anti leishmania y por reportes sobre las propiedades antimicrobianas de las porfirinas (Stojiljkovic *et al.*, 2001). Algunos resultados de ensayos clínicos, utilizando (ALA), precursor metabólico de protoporfirinas, en TFD en pacientes infectados con *L. major* y *L. donovani*, presentaron destrucción de tejido no específico acompañado de sobrevivencia de parásitos (Akilov *et al.*, 2007b). Entre otros estudios de TFD en LC se encuentra el desarrollado por Bristow *et al.*, (2006), quienes investigaron el potencial de cuatro porfirinas catiónicas para inactivar promastigotes de *L. major*. Paralelamente, realizaron ensayos de fototoxicidad contra queratinocitos y macrófagos que mostraron diferencias significativas entre la actividad fotodinámica en microorganismos y en células de mamífero. En este trabajo inactivaron fotodinámicamente macrófagos infectados con leishmania y promastigotes libres, minimizando el daño de tejido circundante. Morgenthaler *et al.*, (2008), evaluaron ketales de carbaporfirina como agentes potenciales en TFD para leishmaniasis. Los estudios estuvieron dirigidos a la inhibición del crecimiento de promastigotes axénicos de *L. tarentolae in vitro*. También se centró la atención en la producción de especies reactivas de oxígeno inducida por la presencia de ketales de carbaporfirina. Al emplear PcAlCl en TFD para el tratamiento de LC *in vitro* se han obtenido resultados positivos. Dutta *et al.*, (2005), utilizaron PcAlCl como FS contra *L. (Leishmania) amazonensis* extracelulares e intracelulares, determinando lisis de promastigotes y amastigotes axénicos después de la irradiación. Escobar *et al.*, (2006) determinaron la

actividad fotodinámica *in vitro* de la PcAlCl y de la Ftalocianina de zinc (PcZn) en parásitos de *L. (V.) panamensis* y *L. chagasi* (syn. *L. infantum*). Los resultados de estas investigaciones sugieren que al utilizar la PcAlCl como FS se inhibe el crecimiento *in vitro* de algunas especies de *Leishmania*. En modelos experimentales la actividad de PcAlCl, sólo se ha conocido en la investigación desarrollada por Hernández (2010), en la cual se observó que la TFD con PcAlCl aplicada tópicamente curó lesiones causadas por *L. amazonensis* sin embargo, no eliminó completamente amastigotes en el sitio de la lesión. Este estudio sugiere optimizar las formulaciones tópicas de PcAlCl, determinando concentraciones efectivas que logren la eliminación del parásito en las lesiones de los animales. Según las investigaciones realizadas se puede determinar que la TFD con PcAlCl sería una estrategia prometedora para el tratamiento de LC, es conveniente realizar un estudio de permeación y biodistribución de PcAlCl en modelos *ex vivo* e *in vivo* con el fin de determinar su comportamiento y evaluar el nivel de seguridad, lo cual permitirá su posible utilidad en el tratamiento de LC.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la permeación y biodistribución de PcAlCl aplicada tópicamente en piel de Ratas Wistar.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar la permeación de PcAlCl en piel de ratas Wistar después de la aplicación tópica en solución y en nanoemulsión.

Determinar la retención de PcAlCl en piel de ratas Wistar después de la aplicación tópica en solución y en nanoemulsión.

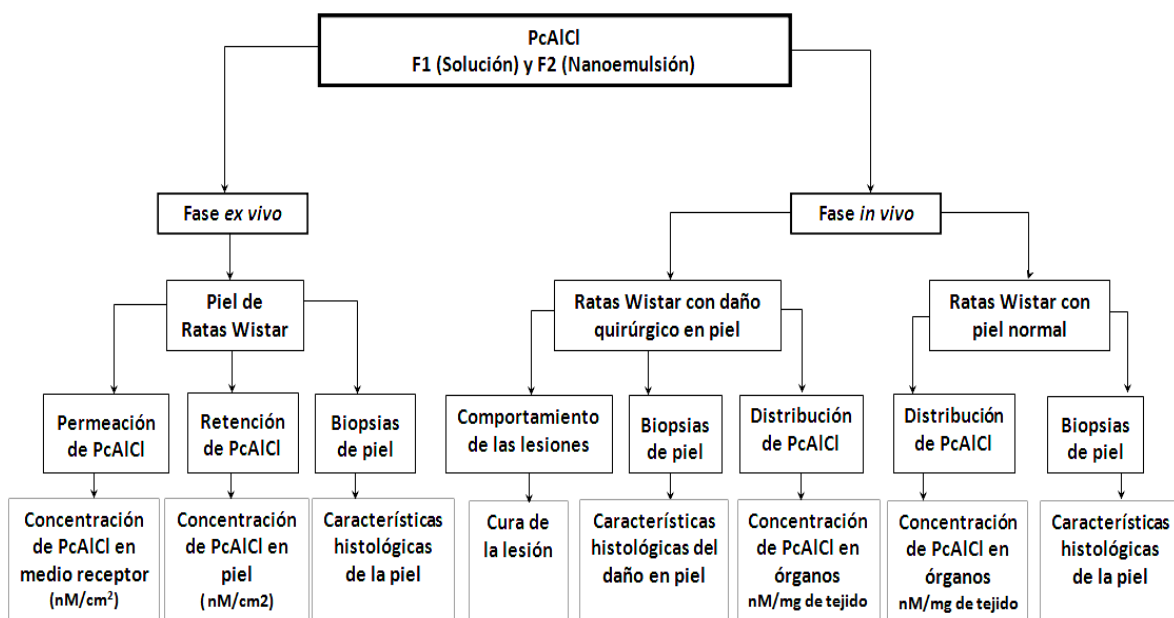
Evaluar la concentración de PcAlCl en órganos de ratas Wistar después de la aplicación tópica en solución y en nanoemulsión.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 DISEÑO METODOLÓGICO

Se evaluaron dos formulaciones de PcAlCl siguiendo el diseño metodológico observado en la figura 8. En la fase *ex vivo* se utilizó piel dorsal de ratas Wistar para evaluar permeación y retención de PcAlCl, esta fase se desarrolló mediante la utilización de celdas de difusión de Franz. En la fase *in vivo* se utilizaron ratas Wistar con el fin de determinar la distribución de PcAlCl en órganos y en piel. Se utilizaron ratas con piel normal y ratas con daño quirúrgico inducido en las capas de la piel. Se realizaron biopsias de piel con el fin de determinar las características histológicas y el daño quirúrgico inducido.

**Figura 8.** Diseño metodológico del estudio.

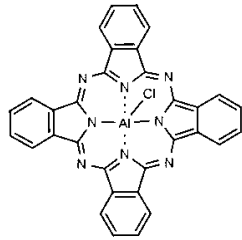


**PcAlCl:** Ftalocianina de Aluminio Clorada; **F1:** Formulación 1; **F2:** Formulación 2.

### 3.2 COMPUESTOS Y FORMULACIONES

Se utilizó ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl), adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) (Tabla 1) y preparada en dos formulaciones: formulación 1 (F1): PcAlCl en solución y formulación 2 (F2): PcAlCl en nanoemulsión.

**Tabla 1.** Estructura y características químicas de PcAlCl

Compuesto	Ftalocianina de Aluminio Clorada (PcAlCl)
Estructura química	
Fórmula molecular	C <sub>32</sub> H <sub>16</sub> AlClN <sub>8</sub>
Peso molecular	574,96 g/mol
Log P (Coeficiente de partición octanol/agua)	7,3

La F1 se preparó disolviendo la PcAlCl en una mezcla de dimetil sulfóxido (DMSO, Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italia), Tween 80 (Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA) y Agua tipo I según lo descrito por Kyriazi *et al.*, 2007 y modificaciones de Hernández, 2010: 2,5 mg de PcAlCl fueron disueltos en una mezcla de DMSO: Tween 80: Agua tipo I (35,7: 21,4: 42,9). La solución se mantuvo en agitación constante durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se conservó en refrigeración y protegida de la luz en frascos ámbar con papel aluminio. Para los experimentos *in vivo* se utilizó la formulación 1(a) con una concentración de

PcAICI de 2,5 mg/mL y para los ensayos *ex vivo* se utilizó la formulación 1(b) con una concentración de 100  $\mu$ M.

La F2, se preparó mediante la mezcla de una fase acuosa y una fase oleosa. Para la preparación de la fase acuosa se utilizó agua tipo I, glicerol y tween 20. En la fase oleosa se utilizó fosfatidilcolina, PcAICI diluida en cloroformo y ácido oleico. La mezcla de las dos fases se realizó mediante la adición de la fase oleosa a la fase acuosa. En la preparación de esta formulación se utilizaron técnicas de ultrasonificación, centrifugación y rotoevaporación. En la caracterización fisicoquímica se realizó medición de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta por espectroscopía de correlación fotónica (Malvern Nano ZS<sup>®</sup> 90, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). La nanoemulsión fue diluida en agua (1:50) antes de cada medición. Para los experimentos *ex vivo* se utilizó la formulación 2(c) con una concentración de PcAICI de 200,13  $\mu$ M y para los ensayos *in vivo* se utilizó la formulación 2(8) con una concentración de 200  $\mu$ M aproximadamente.

Se prepararon los vehículos de cada formulación sin agregar la PcAICI. Estos vehículos fueron utilizados como controles en cada uno de los ensayos *ex vivo* e *in vivo*.

Se determinó la concentración de PcAICI en F1 y F2 por medidas de fluorescencia utilizando el fluorómetro (PerkinElmer LS 55). El espectro de excitación fue de 670 nm y el de emisión de 682 nm. Se elaboraron curvas de calibración utilizando una solución madre de PcAICI diluida en DMSO. A partir de esta solución se hicieron 9 diluciones 1:2. La concentración de PcAICI en las formulaciones se detectó mediante la interpolación de la curva de calibración. Bajo estas condiciones experimentales los rangos de detección estuvieron entre intensidades de fluorescencia de 22,6 y 353. La ecuación de la curva fue  $Y = 6,59x + 20,87$  y el coeficiente de correlación fue 0,9997.

Con el fin de determinar el estado soluble y no agregado de las moléculas del compuesto se realizaron espectros de emisión de fluorescencia de PcAlCl y espectros de absorción de este fotosensibilizador. Las formulaciones fueron diluidas en DMSO, etanol y PBS-SDS (2%) en diluciones 1:3000. Los espectros de emisión de fluorescencia de PcAlCl se realizaron en el fluorómetro PerkinElmer LS 55, UK. Las condiciones del método fueron: emisión: Inicial 374 nm, final 800 nm; excitación 364 nm. Los espectros de absorción de PcAlCl fueron realizados en el espectrofotómetro UV-Visible UV -2401 PC Shimadzu con el software UV Probe Vis. Los espectros se realizaron con longitudes de onda entre 250 y 800 nm.

### **3.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: RATAS WISTAR**

Se utilizaron 36 ratas Wistar hembras de aproximadamente 2 meses de edad y entre 200 y 280 gramos de peso. Todos los animales tuvieron su origen de la población de ratas Wistar establecidas y mantenidas en el Bioterio de la Facultad de Salud, Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Industrial de Santander. Se utilizaron cajas individuales para evitar sesgos o alteración en los procedimientos.

El cuidado animal y los procesos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo a las normas y condiciones establecidas en la ley 84 emitida por el congreso de Colombia el 27 de diciembre de 1989, por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales, se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. El desarrollo de las prácticas en la presente investigación básicamente se enmarcó en el capítulo sexto de esta ley que hace referencia al uso de animales vivos en experimentos e investigación. Igualmente, se tuvieron en cuenta las disposiciones instadas en la resolución 008430 de 1993 emitida por el Ministerio de Salud de la República de Colombia, en la cual se establecen las normas científicas, técnicas y

administrativas para la investigación en salud. Principalmente, lo determinado en el Título V respecto a la investigación biomédica con animales.

De acuerdo a lo estipulado en el manual de protocolos y procedimientos del Bioterio UIS (2012) e indicaciones y colaboración por parte del personal que allí labora, los animales se mantuvieron en un ambiente controlado bajo las siguientes condiciones: 1) Los ciclos de luz y penumbra duraron 12 horas cada uno, controlados mediante un *timer* (temporizador programable); 2) Se manejó un equipo de aire acondicionado con unidad exterior y recargas constantes de aire al interior de las salas. Se manejó una presión positiva; 3) Se mantuvo un extractor de olores y vapores en funcionamiento permanente. 4) Se mantuvo un termo higrómetro indicador de temperatura en grados y humedad relativa en porcentaje. La temperatura se manejó entre 21 y 23 grados centígrados y la humedad relativa osciló entre 60 y 70%. El alimento fue suministrado teniendo en cuenta el requerimiento nutricional de proteína, grasa, humedad y fibra. Las marcas comerciales utilizadas fueron Ringo Croquetas (bulto x 30 Kg) y Finca pollo grueso (bulto x 40 Kg). El suministro se llevó a cabo con horario establecido utilizando el recipiente medidor de acuerdo al peso promedio (entre 6 y 10% del peso total del animal). El suministro de agua se realizó con la adecuada limpieza de bebederos, lavado y desinfección de los frascos y chupos utilizados. El cambio de agua se realizó cada 24 horas. El lavado de cajas y cambio de lechos (cascarilla de arroz), limpieza de estantes y de la sala experimental fue realizado con la colaboración del personal del Bioterio UIS, según indicaciones contempladas en el manual de protocolos y procedimientos del Bioterio UIS (2012). El monitoreo de la sala de experimentación se realizó diariamente (2 veces) constatando el buen funcionamiento de equipos y el bienestar de los animales.

La presente investigación contó con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander con código CB12006 en cuanto a la utilización de modelos animales para su desarrollo.

### **3.4 ENSAYOS DE PERMEACIÓN Y RETENCIÓN EX VIVO**

La permeación y la retención de PcAlCl fueron determinadas utilizando las formulaciones 1 y 2 que contenían el compuesto FS. Igualmente se utilizaron los vehículos de las dos formulaciones como controles. La membrana utilizada en estos ensayos fue piel dorsal de ratas Wistar.

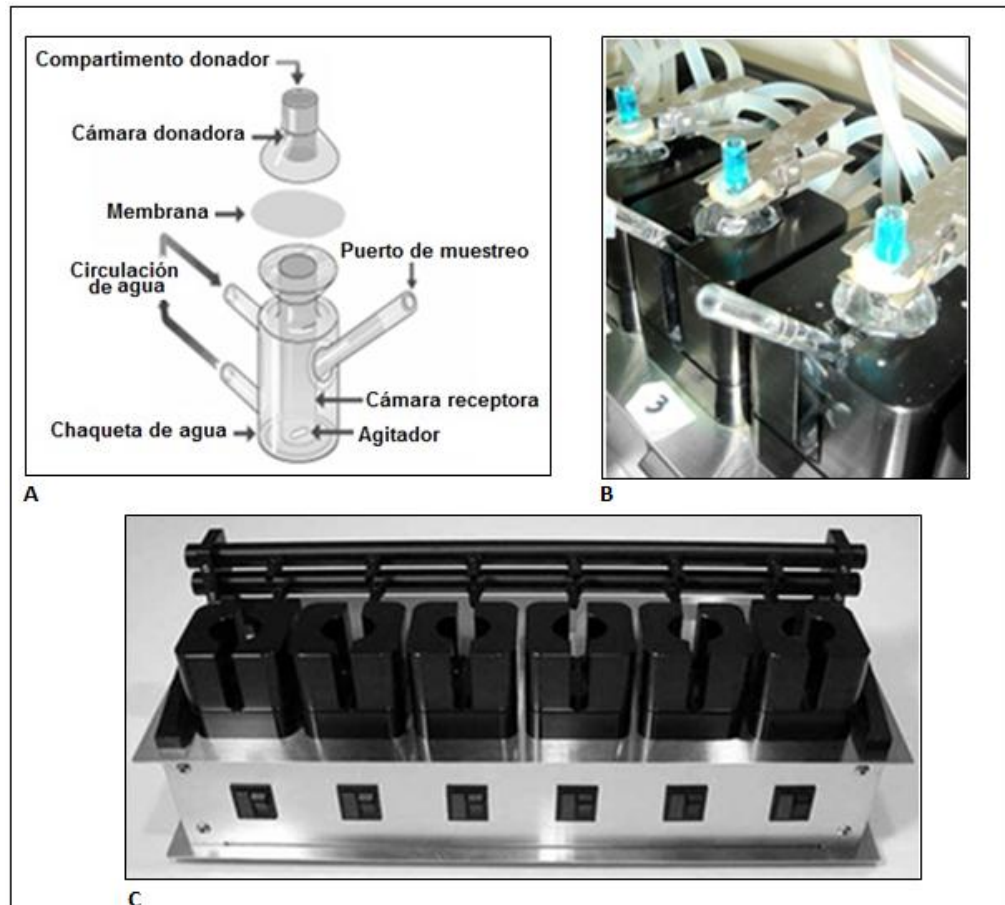
**3.4.1 Obtención de la piel de los animales.** Se realizó la tricotomía a los animales con máquina de afeitar eléctrica (Wahl Peanut) y posteriormente se procedió al sacrificio mediante cámara de CO<sub>2</sub> con exposición del animal durante 2 minutos, (la técnica se describe en el manual de protocolos y procedimientos del Bioterio UIS (2012)). Se realizó la disección y extracción de la piel en un área entre 10 y 12 cm. Después de realizar la extracción de la piel se procedió a la eliminación del tejido graso mediante cortes con tijera y bisturí. La piel se cubrió con una película autosellante de Parafilm<sup>®</sup> M y papel aluminio. En la mayoría de los ensayos *ex vivo* la piel se utilizó inmediatamente después de su obtención. En otros casos, se almacenó por un periodo entre 24 y 48 horas a -20 °C, completamente cubierta con Parafilm<sup>®</sup> M y papel aluminio.

**3.4.2 Ensayo de permeación de PcAlCl en piel (*ex vivo*).** Los ensayos de permeación se llevaron a cabo utilizando celdas de difusión de Franz (PermeGear, Hellertown, PA, USA) (Figura 9), según explicaciones teóricas y prácticas del Dr. Eduardo Ricci de la Facultad de Farmacia, Universidad de Rio de Janeiro, Brasil. (Comunicación personal: marzo, 2011) y según protocolos descritos en Primo *et al.*, (2007).

Las celdas de Franz constan de una cámara donadora y una cámara receptora entre las cuales se colocaron como membranas, discos de la piel objeto de estudio (figura 9A). Las celdas se colocaron en un agitador (Stirrer-PermeGear V6B, Hellertown, PA, USA) (figura 9B y 9C) que a su vez estuvo conectado a un baño recirculante (Lauda Brinkmann) a una temperatura de 32 °C.

En el compartimento donador se colocaron 0,30 mL de las formulaciones (F1(b) y F2(c)) y en el compartimento receptor se colocaron 3 mL de PBS-SDS (2%) pH 7,2 (Búfer fosfato salino- Dodecilsulfato sódico). Entre la cámara donadora y la cámara receptora se colocaron los discos de piel cortados con tijera de disección (1,77 mm).

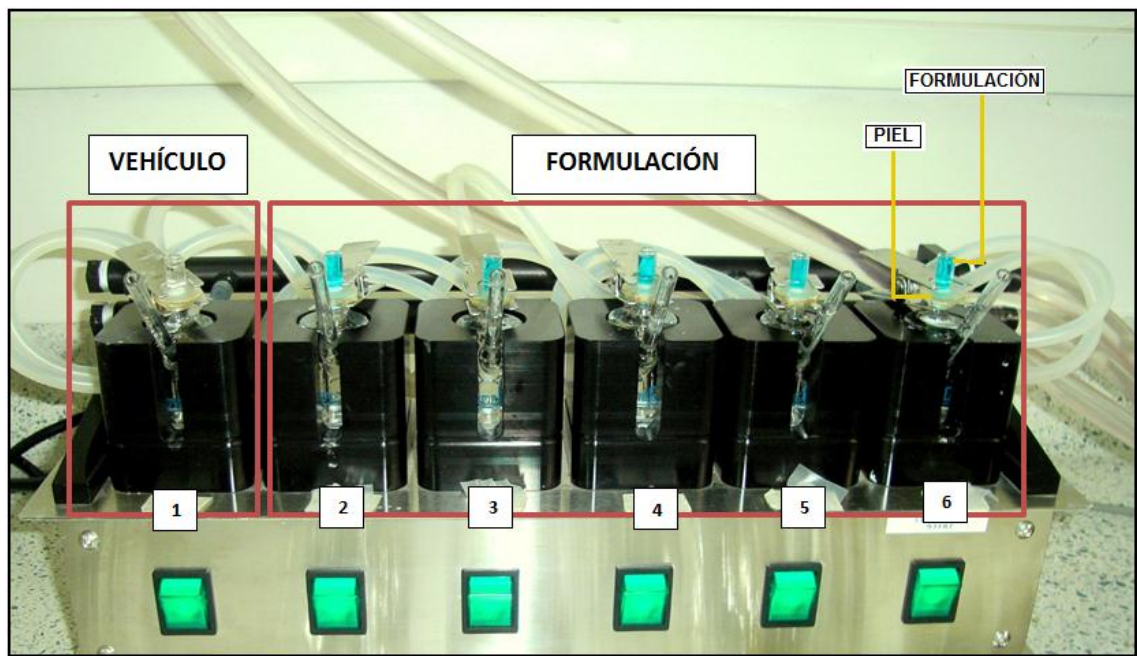
**Figura 9.** Sistema de Celdas de Difusión de Franz. Se muestra: **A.** Esquema representativo de una celda de difusión de Franz y sus partes; **B.** Celda de difusión de Franz dentro del agitador; **C.** Agitador (Stirrer-PermeGear).



Se utilizaron 6 celdas en cada ensayo. Las formulaciones se colocaron en las celdas 2 a 5 y los vehículos (controles) en la celda número 1 (figura 10). Los ensayos se llevaron a cabo por periodos de 12 horas y 24 horas (hora final) para las 2 formulaciones. Se realizaron 4 ensayos por cada formulación y a cada hora final mencionada. Los muestreos en cada celda se realizaron en las horas 0, 2, 4, 8, 10 y 12, para los ensayos a 12 horas y en las horas 0, 12, 14, 18, 22 y 24 para los ensayos a 24 horas. Este muestreo se realizó extrayendo 0.3 mL del medio

receptor mediante catéter Rymco No. 14 adaptado a una jeringa de 5 mL; inmediatamente se repuso el mismo volumen de medio fresco (PBS-SDS, 2%).

**Figura 10.** Ensayo de permeación en celdas de difusión de Franz. Se observa el desarrollo de un experimento. Se muestra la numeración de las celdas dentro del agitador. En la celda 1 se colocó el vehículo de las formulaciones y en las celdas 2 a 5 se colocaron las formulaciones. En las cámaras receptoras se colocaron 3 mL de PBS-SDS 2%. La membrana de piel está ubicada entre la cámara donadora y la cámara receptora de las celdas de Franz.

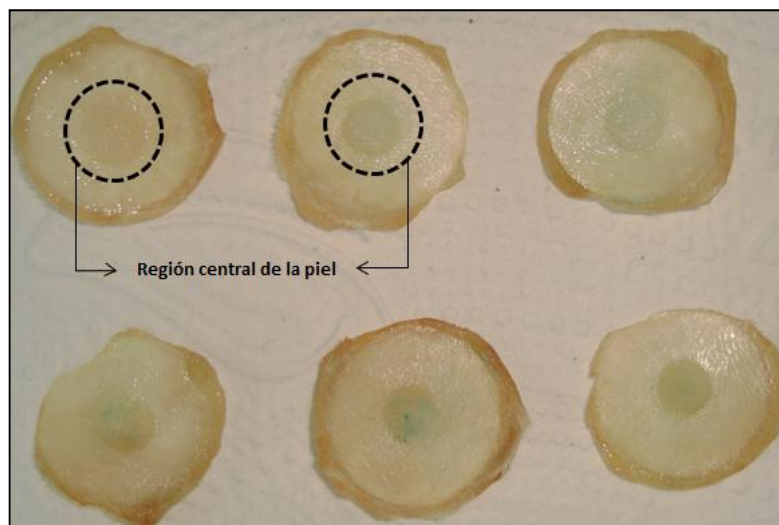


El volumen extraído en cada muestreo se almacenó en tubos ámbar y posteriormente se realizó lectura de concentración de PcAlCl en las muestras mediante fluorometría. El espectro de excitación fue de 670 nm y el de emisión de 682 nm. Se elaboraron curvas de calibración utilizando una solución madre de PcAlCl diluida en PBS-SDS (2%). La concentración de PcAlCl se detectó mediante la interpolación de la curva de calibración. Los rangos de detección estuvieron

entre intensidades de fluorescencia de 0,730 y 139,96. La ecuación de la curva fue  $Y= 2,774x + 2,802$  y el coeficiente de correlación fue 0,9991. Los resultados se expresaron como nM de PcAlCl/cm<sup>2</sup>.

**3.4.3 Ensayo de retención de PcAlCl en piel (ex vivo).** Se cuantificó la concentración de PcAlCl retenida en las capas de la piel. Estos ensayos se realizaron en los discos de piel resultantes del ensayo de permeación (Figura 11) descrito anteriormente según explicaciones teóricas y prácticas del Dr. Eduardo Ricci de la Facultad de Farmacia, Universidad de Rio de Janeiro, Brasil. (Comunicación personal: marzo, 2011) y según protocolos descritos en Primo *et al.*, (2007).

**Figura 11.** Discos de piel resultantes del ensayo de permeación. La figura muestra 6 círculos de piel (uno de cada celda). En la parte central de la piel se observa una marca circular que estuvo en contacto con las dos cámaras de las celdas de Franz. Esta parte fue el sitio empleado para determinar retención de PcAlCl en estrato córneo y en epidermis más dermis.



La retención en el estrato córneo se realizó por el método de *tape stripping* (método de la cinta adhesiva) utilizando cinta Scotch Magic 3M (USA) cortada en pequeños trozos de 5 mm aproximadamente. Se tomó un trozo de cinta con una pinza y se pegó en la región central de cada piel. Se ejerció presión sobre la cinta por 30 segundos, se retiró y se colocó en un tubo ámbar que contenía 3 mL de etanol al 70% (Laboratorios Productos OSA, E. U.), solvente orgánico utilizado como extractor de PcAlCl. Este procedimiento se repitió con 15 cintas con el fin de retirar el estrato córneo. Los tubos se mantuvieron en agitación constante durante 12 horas utilizando un agitador (Heidolph TITRAMAX 1000). El etanol se utilizó como solvente extractor después de evaluar diferentes solventes orgánicos y solución tampón y encontrar mayores concentraciones de PcAlCl con este solvente.

La retención de PcAlCl en epidermis y dermis se determinó mediante extracción con solvente orgánico. Se cortó la parte central de cada disco de piel en pequeños trozos aproximadamente de 2 mm, se realizó un macerado utilizando mortero y pistilo y se colocó en tubos ámbar que contenían etanol al 70%. Los tubos se mantuvieron en agitación constante. Posteriormente se realizó cuantificación de la PcAlCl retenida tanto en estrato córneo como en epidermis y dermis por fluorimetría mediante la interpolación en curvas de calibración realizadas utilizando una solución madre de PcAlCl diluida en etanol al 70%. A partir de esta solución se hicieron 9 diluciones 1:2. Los rangos de detección estuvieron entre intensidades de 4,171 y 254,59. La ecuación de la curva fue  $Y = 5,061x + 5,673$  y el coeficiente de correlación fue 0,9988. Los resultados se expresaron como nM de PcAlCl/cm<sup>2</sup>.

### 3.5 ENSAYOS DE DISTRIBUCIÓN DE PcAICI EN ÓRGANOS DE RATAS WISTAR

Para la realización de estos ensayos se aplicaron tópicamente las formulaciones 1 y 2 de PcAICI en piel dorsal de ratas Wistar y se determinó su concentración tanto en piel como en órganos de animales con piel normal y piel con lesiones inducidas quirúrgicamente.

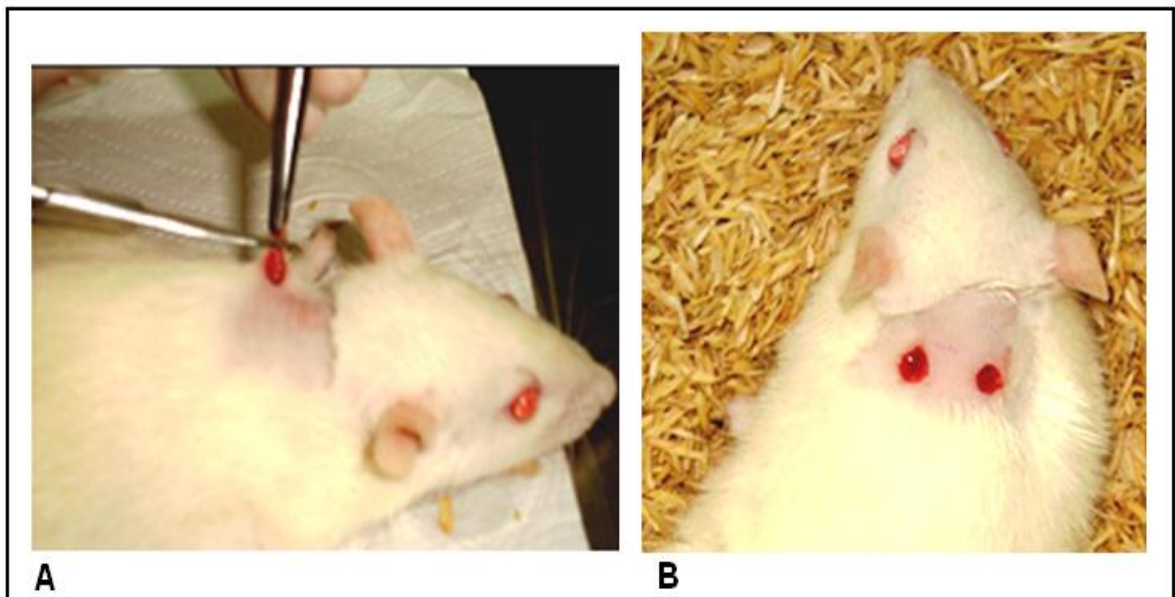
**3.5.1 Preparación de la piel de los animales.** Se realizó la tricotomía en la totalidad de los animales 24 horas previas a la aplicación de las formulaciones mediante máquina de afeitar eléctrica en la región dorsal en un área de 3 cm<sup>2</sup> (Figura 12).

**Figura 12.** Tricotomía de ratas Wistar. La fotografía muestra la tricotomía realizada a los animales con máquina de afeitar eléctrica en la región dorsal en un área de 3 cm<sup>2</sup>, 24 horas previas al inicio del ensayo.



Para la inducción de las lesiones quirúrgicas, los animales se anestesiaron con xilacina (Rompun® MR, Bayer, Kiel, Alemania), la cual contiene actividad analgésica y sedante junto al agente sedante y disociativo ketamina® 50 (Holliday-Scott S.A.) por vía intraperitoneal. La dosis utilizada se calculó según la siguiente fórmula:  $\text{Dosis Calculada} = \text{Dosis Genérica (mg/Kg)} * \text{Peso del animal (Kg)} / \text{concentración del fármaco}$ . Se aplicó la xilacina y 10 minutos después la ketamina. Posteriormente, se hicieron dos cortes con tijeras para disección y pinzas para sostén en la región dorsal depilada con el fin de romper las capas de la piel (Figura 13). Las lesiones midieron aproximadamente 5 mm de diámetro en la totalidad de los animales.

**Figura 13.** Lesiones inducidas quirúrgicamente en ratas Wistar. **A.** Muestra la técnica como se realizaron las lesiones en piel de ratas Wistar. **B.** Muestra la forma como quedaron establecidas dos lesiones en la región dorsal de los animales con daño en las capas de la piel.



Después de 30 minutos se aplicó Vetalgina® (Dipirona, Intervet International, Munchen, Alemania) como analgésico por vía intramuscular. Los animales fueron mantenidos en cajas individuales.

**3.5.2 Grupos experimentales y aplicación del tratamiento.** Los animales con piel sana y con lesiones quirúrgicas inducidas fueron divididos en grupos experimentales según lo descrito en la tabla 2. El tratamiento fue aplicado tópicamente utilizando la formulación 1(a) con una concentración de 2,5 mg/mL de PcAlCl y la formulación 2(8) a una concentración de 200  $\mu$ M aproximadamente.

En los animales con piel sana el tratamiento se aplicó los días 1, 4, 7 y 10 en el área dorsal. Se realizó observación directa cada 24 horas en el sitio de aplicación.

Los animales con lesiones inducidas fueron tratados 24 horas después de la inducción de las lesiones. La aplicación del tratamiento se realizó cada 24 horas durante 8 días, debido a que las lesiones tuvieron una rápida resolución. Se realizó observación directa de las lesiones y se tuvieron en cuenta parámetros como diámetro de la lesión, temperatura, enrojecimiento y mordeduras y arañazos causados por el mismo animal.

**Tabla 2.** Grupos experimentales en el ensayo de distribución de PcAlCl. Se muestran los grupos experimentales de animales con piel sana y animales con lesiones quirúrgicas inducidas, el tratamiento aplicado y la cantidad de animales utilizados en cada grupo experimental.

<b>ANIMALES CON PIEL SANA</b>		
<b>Grupo experimental</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Número de animales</b>
<b>A</b>	Formulación 1	5
<b>B</b>	Vehículo Formulación 1	2
<b>C</b>	Formulación 2	5
<b>D</b>	Vehículo Formulación 2	2
<b>E</b>	Sin tratamiento	2
<b>ANIMALES CON LESIONES QUIRÚRGICAS INDUCIDAS</b>		
<b>Grupo experimental</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Número de animales</b>
<b>A</b>	Formulación 1	4
<b>B</b>	Vehículo Formulación 1	4
<b>C</b>	Formulación 2	4
<b>D</b>	Vehículo Formulación 2	4
<b>E</b>	Sin tratamiento	4

**3.5.3 Sacrificio de los animales, obtención y procesamiento de órganos.** El sacrificio de los animales se realizó según la normatividad vigente para el manejo de animales de laboratorio, teniendo en cuenta la forma de aplicación de una muerte digna, segura y sin traumatismo con la bioseguridad de quien ejecutó la acción, según lo estipulado en el manual de protocolos y procedimientos del Bioterio UIS (2012).

De esta forma, el sacrificio se realizó 24 horas después de la última aplicación del tratamiento. Los animales fueron anestesiados con xilacina y ketamina<sup>®</sup> 50. Diez minutos después de la aplicación de los anestésicos se realizó perfusión a los animales según lo descrito por Balasubramanian *et al.*, (2010). Se realizó disección torácico abdominal utilizando pinzas de ajuste, sujetadores y tijeras de disección y los animales fueron perfundidos a través del ventrículo cardiaco izquierdo con solución salina hasta que el retorno venoso fue claro, realizando un

lavado de sangre en órganos internos. Una vez realizada la perfusión se realizó la extracción de piel en el sitio de aplicación de las formulaciones mediante corte con tijeras de disección. Las muestras se almacenaron en etanol al 70%. Posteriormente, se procedió a la extracción de órganos en el siguiente orden: Corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón y cerebro. Los órganos fueron recolectados en cajas de petri. Se pesaron 300 mg de cada órgano, seguidamente se realizó un macerado utilizando mortero y pistilo y las muestras se trasladaron a tubos ámbar que contenían etanol al 70%. Seguidamente se realizó el centrifugado a 3000 r.p.m. durante 20 minutos, el sobrenadante se colectó en tubos ámbar y se realizó cuantificación por fluorometría.

**3.5.4 Cuantificación de PcAlCl en órganos.** La concentración de PcAlCl distribuida en órganos internos de ratas Wistar se cuantificó mediante fluorometría. El espectro de excitación fue de 670 nm y el de emisión de 682nm. Se elaboraron curvas de calibración utilizando una solución madre de PcAlCl diluida en etanol al 70%. A partir de esta solución se hicieron 9 diluciones. La concentración de PcAlCl en los sobrenadantes se detectó mediante la interpolación en la curva de calibración. Bajo estas condiciones experimentales los rangos de detección estuvieron entre 4,171 y 254,59 nM. La ecuación de la curva fue  $Y = 5,061x + 5,673$  y el coeficiente de correlación fue 0,9988. Los resultados se expresaron como concentración de PcAlCl en nM /mg de tejido.

### **3.6 DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LA PIEL**

Se realizaron biopsias de la piel extraída de los animales antes y después de los ensayos de permeación y retención *ex vivo*. Igualmente, se tomaron biopsias de piel en los ensayos *in vivo* del sitio de aplicación de las formulaciones y vehículos una vez sacrificados los animales, tanto con piel sana como con lesiones

inducidas. En estos últimos se tomaron biopsias para caracterizar el daño en las capas de piel inducido quirúrgicamente.

El procesamiento de las biopsias se realizó según lo descrito en el manual de procesos y procedimientos del laboratorio de patología de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Las biopsias se almacenaron en formol bufferado al 10% (formalina neutra al 10%) (Formaldehído al 35%-40%; agua destilada; fosfato de sodio monobásico y fosfato de sodio dibásico) en frascos plásticos de boca ancha con un volumen del fijador 10 veces mayor que el volumen del tejido que fue fijado. Posteriormente, las muestras de tejido fijadas se tomaron de los frascos y se embebieron en bloques de parafina (Leica Microsystems®), se realizaron los respectivos cortes histológicos con micrótopo RM2135 (Leica Microsystems®) y se colocaron en láminas portaobjetos. Estas láminas pasaron por una serie de lavados con agua y alcoholes a diferentes concentraciones. Finalmente, fueron coloreadas con los compuestos hematoxilina y eosina. Para el procedimiento, lectura e interpretación de las láminas histológicas se contó con la colaboración del personal del laboratorio de Patología de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Los resultados se registraron fotográfica y descriptivamente.

### **3.7 ANÁLISIS DE RESULTADOS**

Las diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones utilizadas, los tiempos de ensayo y las capas de la piel analizadas en el ensayo de retención de PcAlCl fueron determinadas utilizando como herramienta estadística el análisis de varianza (ANOVA) incluido dentro del diseño de experimentos, previa verificación del cumplimiento de los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia.

Para la determinación de diferencias estadísticamente significativas entre las variables analizadas en el ensayo de distribución de PcAICI *in vivo* se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis (de William Kruskal y W. Allen Wallis) y la prueba de Mann-Whitney para comparaciones múltiples.

Para todos los análisis se consideró un valor de significación estadística menor de 5% ( $p < 0,05$ ). Los análisis se llevaron a cabo mediante el software SPSS versión 19.0.

## 4. RESULTADOS

Los resultados de la presente investigación muestran en primer lugar las propiedades fotofísicas del fotosensibilizador utilizado y su concentración a través del tiempo. Posteriormente se muestran los resultados de los ensayos de permeación y retención realizados, se presenta la permeación de PcAlCl a través de la piel hacia el medio receptor y la retención en el estrato córneo y en epidermis más dermis de la piel de ratas Wistar. Seguidamente, se muestran los resultados de los ensayos de distribución de PcAlCl en órganos y en piel de ratas Wistar después de la aplicación tópica en dos formulaciones. Paralelo al registro de los resultados de los ensayos *ex vivo* e *in vivo* se muestran los resultados de las biopsias de piel tomadas en el desarrollo de la investigación.

### 4.1 FORMULACIONES DE PcAlCl

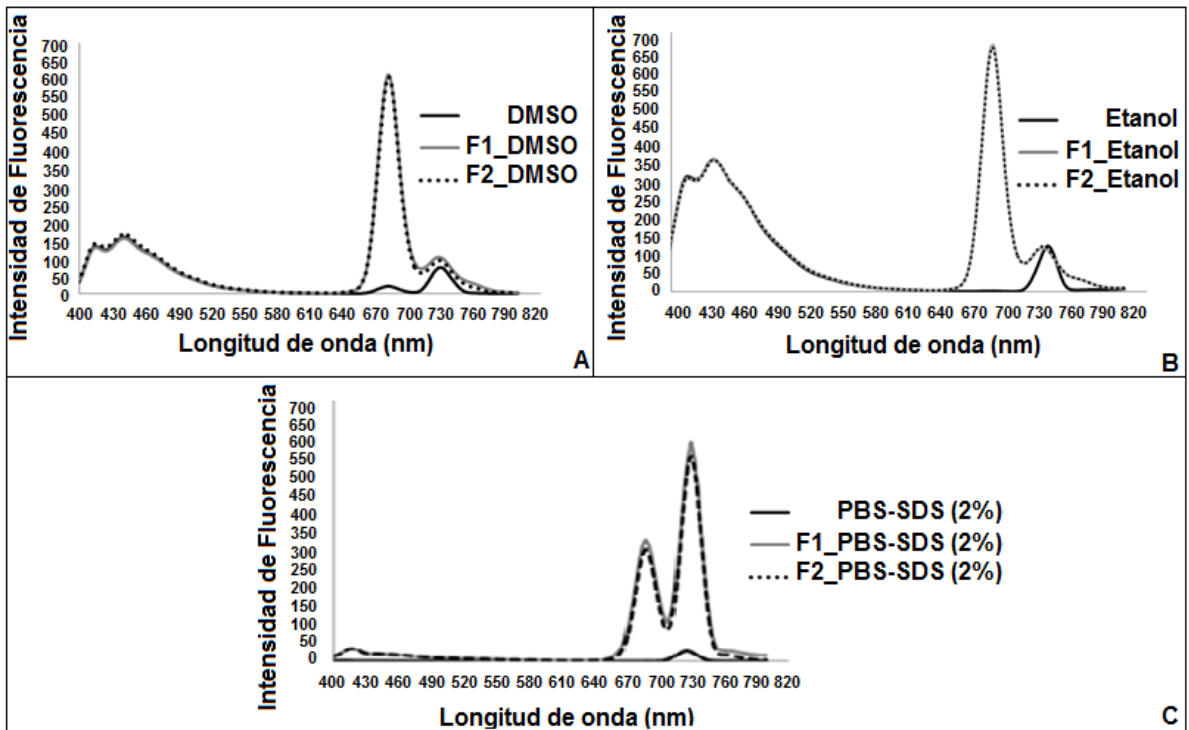
La PcAlCl en F1 y F2 se disolvió en solventes orgánicos como etanol y DMSO y en la solución tampón PBS-SDS (2%). El compuesto fotosensibilizador contenido en las dos formulaciones macroscópicamente fue soluble y no se presentaron agregados permaneciendo en este estado durante los días posteriores a su preparación.

**4.1.1 Propiedades foto-físicas de la PcAlCl en F1 y F2: Espectroscopía de absorción y emisión de fluorescencia.** Los espectros de absorción y emisión de PcAlCl realizados en diferentes solventes proporcionaron información sobre el estado de agregación de las moléculas del compuesto. Se realizaron perfiles de los espectros de absorción y de emisión de las formulaciones F1 y F2 en PBS-SDS (2%), etanol y DMSO en diluciones 1:3000. Los espectros de emisión (Figura 14) se caracterizaron por presentar una banda estrecha con fuertes emisiones de

fluorescencia, excepto para la dilución en PBS-SDS (2%). Los espectros de absorción (figura 15) se caracterizaron por presentar bandas Q más amplias entre 650 y 700 nm y bandas Soret más débiles entre 300 y 400 nm.

En los espectros de emisión de PcAlCl en F1 y F2 disueltas en DMSO y etanol se presentó un pico de emisión de fluorescencia a una longitud de onda de 680 nm (Figura 14A y 14B). En los espectros de emisión de PcAlCl en F1 y F2 disueltas en PBS-SDS (2%) (Figura 14C) se presentaron dos picos de emisión de fluorescencia uno a 670 nm y otro a 730 nm. En los tres espectros de emisión realizados se utilizó como control cada uno de los solventes y se observó su mínima emisión comparada con la emisión de PcAlCl en las formulaciones. F1 y F2 presentaron un comportamiento similar en cuanto a su emisión de fluorescencia en los tres solventes.

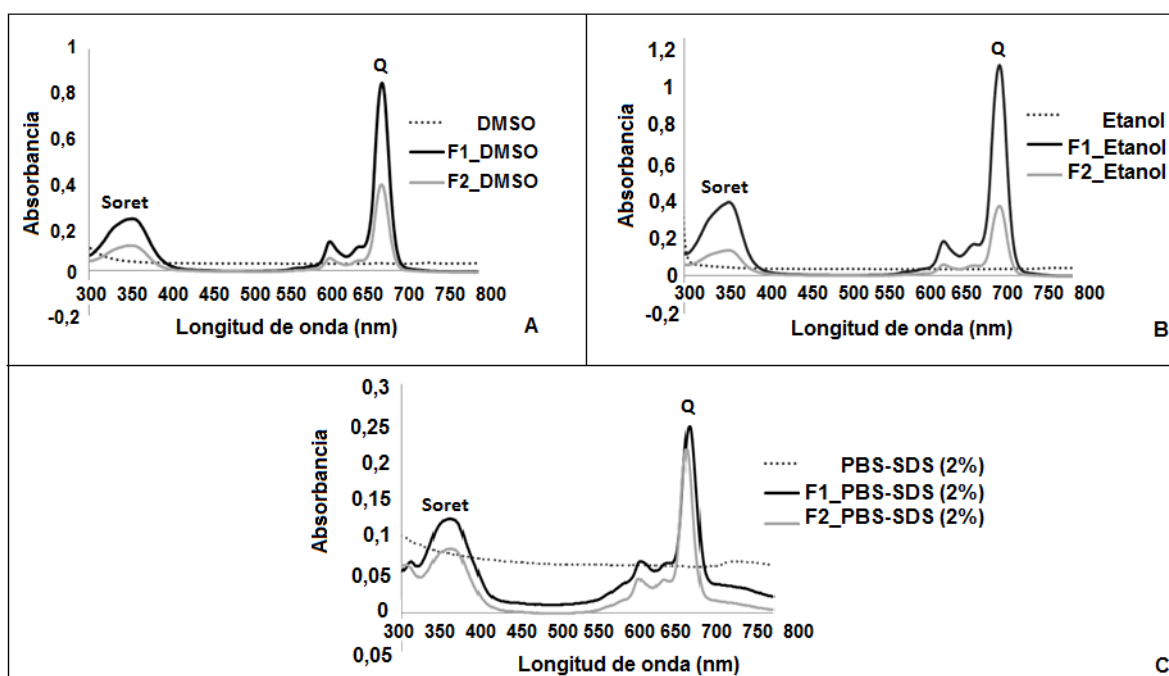
**Figura 14.** Espectros de emisión de PcAlCl. Análisis por solvente. **A.** Espectros de PcAlCl en las formulaciones F1 y F2 diluidas en DMSO y espectro control (DMSO). **B.** Espectros de PcAlCl en las formulaciones F1 y F2 diluidas en etanol y espectro control (etanol). **C.** Espectros de PcAlCl en las formulaciones F1 y F2 diluidas en PBS-SDS (2%) y espectro control (PBS-SDS (2%)).



En los espectros de absorción de PcAlCl se presentaron bandas Q con picos máximos entre 670 y 678 nm y bandas Soret entre 300 y 400 nm. Los espectros de las formulaciones 1 y 2 en DMSO y en etanol fueron similares en cuanto a su comportamiento y sólo presentaron diferencias en la absorbancia registrada, lo cual está relacionado con las diferentes concentraciones de PcAlCl en cada formulación (Figura 15A y B). En PBS-SDS (2%) (Figura 15C) tanto la F1 como la F2 presentaron muy baja absorción, sin embargo el comportamiento del espectro se conserva, bandas Q más elevadas y bandas Soret más reducidas. En los tres espectros de absorción realizados se utilizó como control cada uno de los

solventes y se observó su mínima absorción comparada con la de la PcAlCl en las formulaciones.

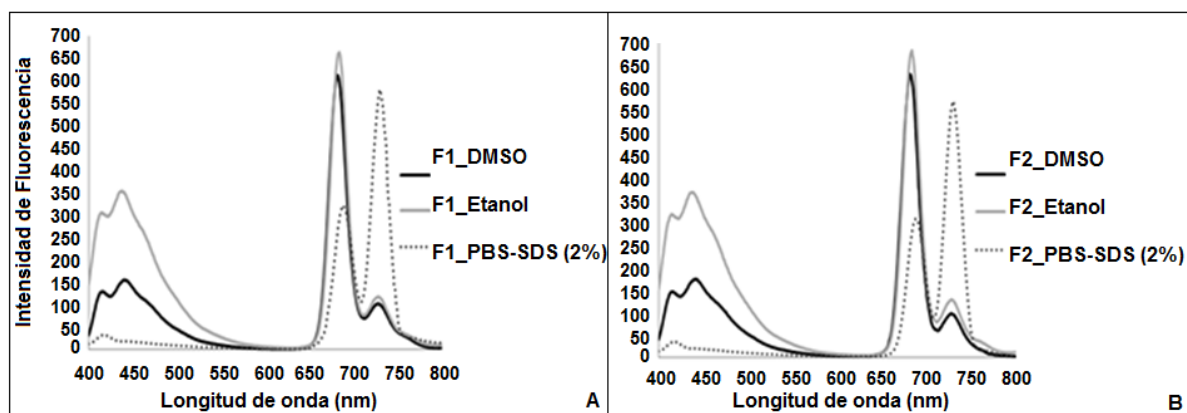
**Figura 15.** Espectros de absorción de PcAlCl. Análisis por solvente. **A.** Espectros de PcAlCl en las formulaciones F1 y F2 diluidas en DMSO y espectro control (DMSO). **B.** Espectros de PcAlCl en las formulaciones F1 y F2 diluidas en etanol y espectro control (etanol). **C.** Espectros de PcAlCl en las formulaciones F1 y F2 diluidas en PBS-SDS (2%) y espectro control (PBS-SDS (2%)).



Se realizaron espectros de emisión y absorción evaluando cada una de las formulaciones utilizadas comparando su perfil en los tres solventes. La figura 16 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de la PcAlCl en F1 y F2. En la figura 16A se presentan los espectros de la F1 y en la figura 16B los espectros de la F2 disueltas en DMSO, etanol y PBS-SDS (2%). El perfil del espectro de la F1 y F2 en DMSO y etanol es similar, presentó un pico de emisión elevado a 670 nm.

Las dos formulaciones en el solvente PBS-SDS (2%) muestran un perfil con dos picos de emisión de fluorescencia.

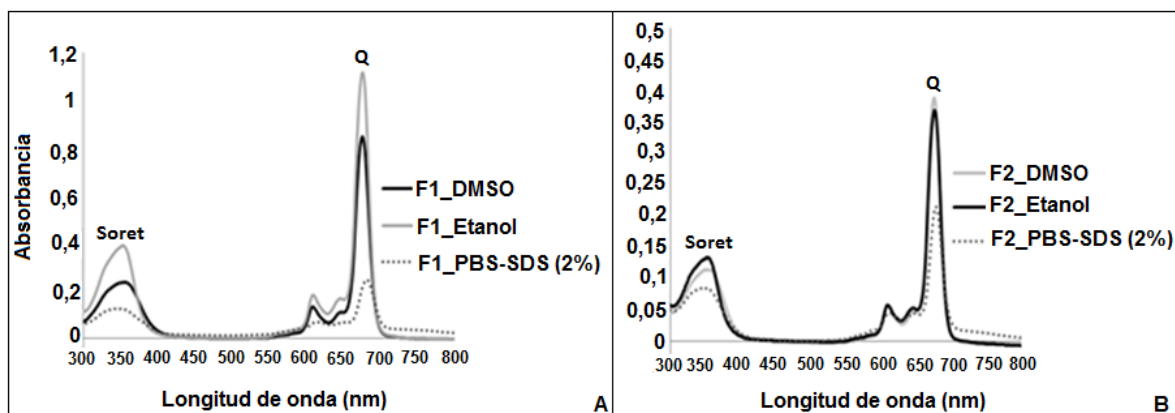
**Figura 16.** Espectros de emisión de PcAlCl. Análisis por formulación. **A.** Espectros de PcAlCl en F1 diluida en DMSO, etanol y PBS-SDS (2%). **B.** Espectros de PcAlCl en F2 diluida en DMSO, etanol y PBS-SDS (2%).



Por otra parte, la figura 17 muestra los espectros de absorción de la PcAlCl en F1 y F2. Se observan bandas Q con picos elevados y bandas Soret más débiles en las dos formulaciones y en los tres solventes utilizados. En la figura 17A se observan los espectros de la F1 en etanol, DMSO y PBS-SDS (2%). El espectro realizado en etanol muestra picos más altos de absorbancia de PcAlCl a una longitud de onda de 673 nm. El espectro realizado en DMSO muestra un perfil similar con un pico más bajo de absorbancia, igual que el espectro descrito para el DMSO a una longitud de onda de 673 nm. Finalmente, el espectro de PcAlCl en F1 disuelta en PBS-SDS (2%) presenta una banda Q con un pico de absorbancia muy bajo con longitud de onda igual a 677 nm. En la figura 17B se registran los espectros de la F2 en los tres solventes. El perfil de los espectros es muy similar a los espectros registrados para la F1, sin embargo es notable la presencia de picos

más bajos de la banda Q en los tres solventes. El espectro de la PcAlCl diluida en PBS-SDS (2%) sigue registrando picos de menor tamaño igual que en la F1.

**Figura 17.** Espectros de absorción de PcAlCl. Análisis por formulación. **A.** Espectros de PcAlCl en F1 diluida en DMSO, etanol y PBS-SDS (2%). **B.** Espectros de PcAlCl en F2 diluida en DMSO, etanol y PBS-SDS (2%).



**4.1.2 Detección de PcAlCl en F1 y F2 a través del tiempo.** Las formulaciones F1 y F2 utilizadas en el estudio fueron diluidas en DMSO (diluciones 1:3000) con el fin de determinar la intensidad de fluorescencia y la concentración de la PcAlCl mediante fluorimetría en diferentes tiempos después de su preparación. La intensidad de fluorescencia expresada en unidades arbitrarias y la concentración del fotosensibilizador incorporado en las formulaciones expresada en  $\mu\text{M}$  y calculada teniendo en cuenta una curva patrón de PcAlCl diluida en DMSO presentaron valores cercanos entre si en cada una de las formulaciones utilizadas a través del tiempo como se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Cuantificación de PcAlCl en las formulaciones a través del tiempo. Se realizaron las lecturas de intensidad de PcAlCl y se calculó la concentración del compuesto en las formulaciones utilizadas en ensayos *ex vivo*, *in vivo* en piel normal e *in vivo* en piel con lesión los días posteriores a la preparación de cada formulación.

Ensayos	Dias	F1 (PcAlCl-Solución)		F2 (PcAlCl-Nanoemulsión)	
		Intensidad (U.A <sup>a</sup> )	Concentración ( $\mu$ M)	Intensidad (U.A)	Concentración ( $\mu$ M)
<i>ex vivo</i> <sup>b</sup>	1	266,94	108,498	292,87	167,075
	5	268,43	111,343	293,42	160,759
	10	264,94	107,497	289,75	159,431
	15	270,56	113,050	289,12	159,987
	20	268,31	110,391	291,65	166,246
	25	269,82	109,035	289,71	155,142
<i>in vivo</i> <sup>c</sup> (Piel normal)	1	259,28	318358	303,45	190,102
	4	261,50	318498	302,98	189,341
	7	260,03	318058	299,99	188,249
	10	260,19	318264	301,28	190,379
<i>in vivo</i> <sup>c</sup> (Piel con lesión)	1	280,93	330985	302,24	197,013
	2	281,06	332432	302,99	199,142
	3	279,76	331043	303,56	199,653
	4	281,23	331184	301,54	196,337
	5	279,02	332915	300,14	193,541
	6	280,39	332813	291,93	189,998
	7	279,26	331393	300,26	190,594
	8	280,45	332476	302,39	196,451

**a.** Unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia; **b.** Se utilizó F1 código b y F2 código c; **c.** Se utilizó F1 código a y F2 código 8.

## **4.2 PERMEACIÓN Y RETENCIÓN *ex vivo* DE LA PcAICI EN PIEL DORSAL DE RATAS WISTAR**

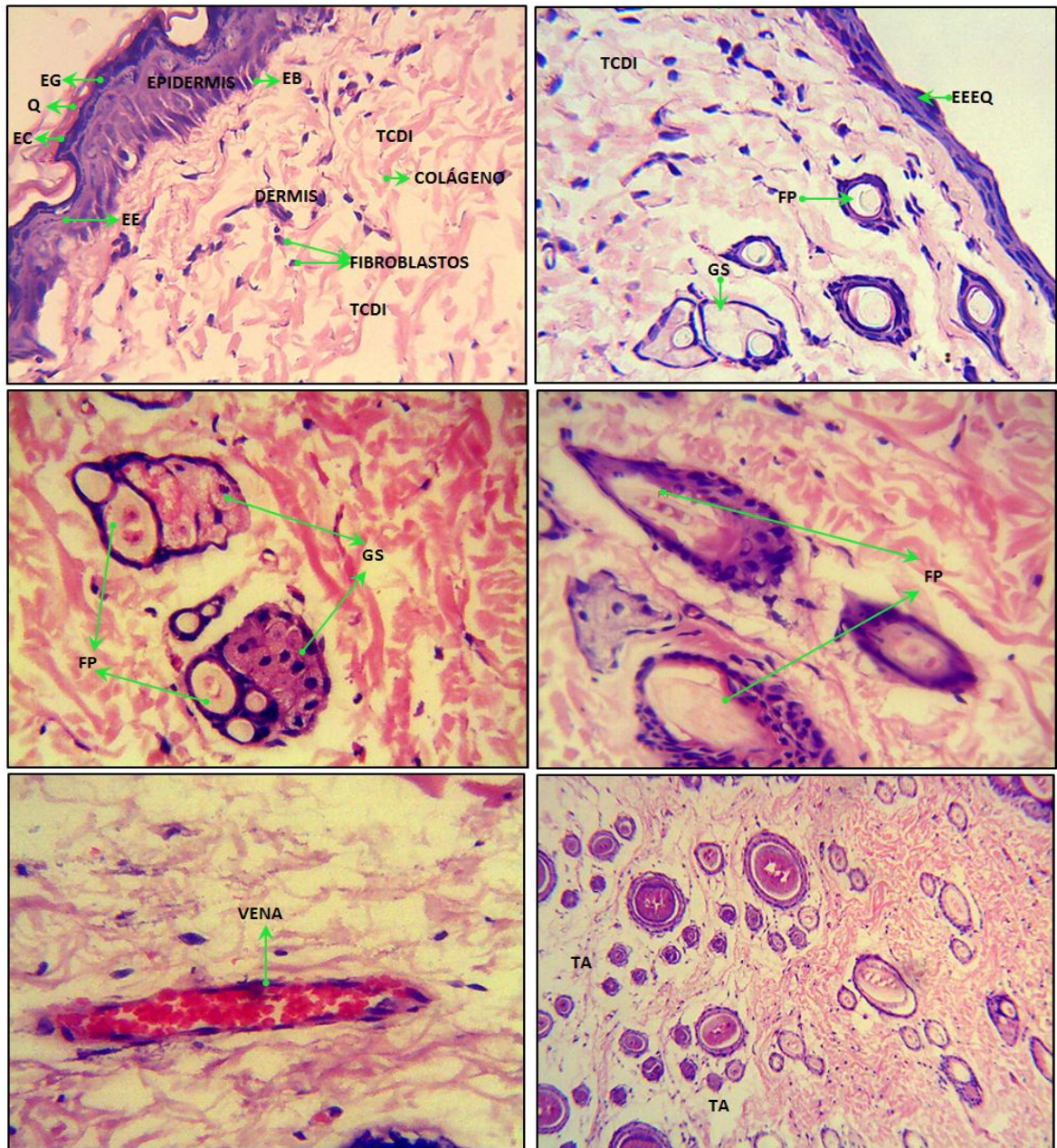
Se muestran las características de la piel utilizada como membrana en los ensayos de permeación y retención. Posteriormente, se observa la capacidad de la PcAICI presente en las formulaciones F1 y F2 para penetrar el estrato córneo, retenerse en las capas de la piel de ratas Wistar y cruzar estas capas hasta el medio receptor al utilizar las celdas de difusión de Franz.

**4.2.1 Características de la piel utilizada en los ensayos.** La piel utilizada en los ensayos de permeación y retención de PcAICI se obtuvo de la región dorsal de ratas Wistar. Las características macroscópicas y microscópicas de la piel se analizaron en tres momentos: una vez extraída la piel del animal, 48 horas después de ser extraída y congelada (previo a su utilización) y después de 12 horas y 24 horas de iniciados los ensayos.

Una vez extraída del animal, la piel presentó forma flexible y elástica, por lo tanto se observó libertad de movimiento. Presentó coloración rosado pálido, poco pigmentada. El grosor fue uniforme; en la piel extraída de la totalidad de animales utilizados en el estudio esta medida fue de 1 mm. En otras partes del cuerpo diferentes al dorso la piel es más delgada, pero en este caso se trabajó sólo con piel dorsal. La superficie de la piel fue lisa, no presentó pliegues ni hendiduras.

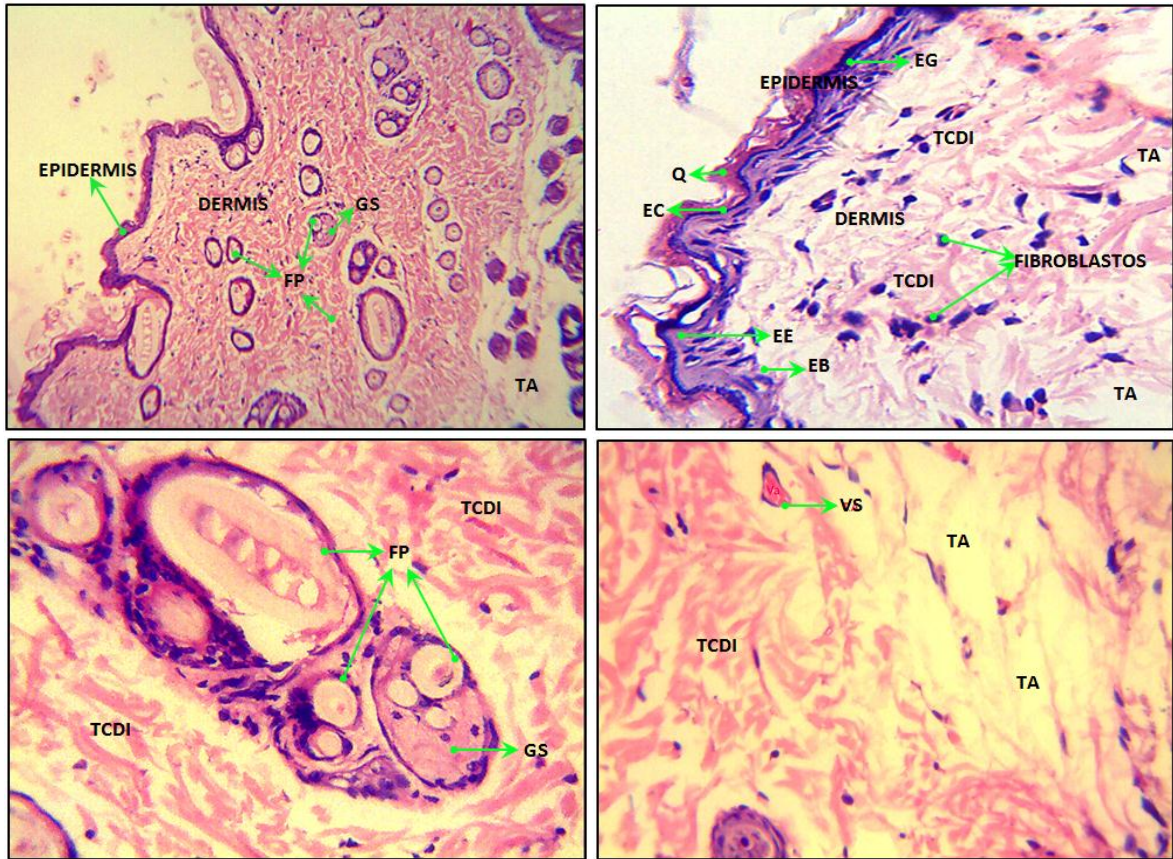
La anatomía microscópica de la piel una vez extraída de los animales se caracterizó por presentar una epidermis fina formada por un epitelio plano estratificado queratinizado. Debajo de este se encontró la dermis formada por tejido conectivo laxo, fibroso, denso irregular. En la dermis se presentaron folículos pilosos, glándulas sebáceas y vasos sanguíneos. Las capas epidermis y dermis se observaron estrechamente unidas. El colágeno presentó una morfología de fibras compactas formando una red (Figura 18).

**Figura 18.** Anatomía microscópica de piel dorsal de ratas Wistar una vez extraída de los animales. Tinción hematoxilina-eosina (10X y 40X). **EC:** Estrato córneo; **EG:** Estrato granuloso; **EE:** Estrato espinoso; **EB:** Estrato basal. **Q:** Queratina. **TCDI:** Tejido conectivo denso irregular. **FP:** Folículos pilosos. **EEEEQ:** Epitelio estratificado escamoso queratinizado. **GS:** Glándulas sebáceas. **TA:** Tejido adiposo.



La piel utilizada en los ensayos, mantenida en congelación durante un periodo máximo de 48 horas presentó características macroscópicas y microscópicas dentro de los límites de una piel normal. Estas características fueron similares a las presentadas en la piel analizada una vez extraída de los animales. Presentó una textura flexible, coloración rosado pálido y el grosor fue de 1 mm. La superficie fue lisa, sin hendiduras. Se observó una epidermis delgada, característica normal de la piel de ratas Wistar y un estrato córneo continuo. En la dermis se observó presencia de vasos sanguíneos, folículos pilosos y glándulas sebáceas. Igualmente se observaron fibras de colágeno compactas en forma de red (Figura 19).

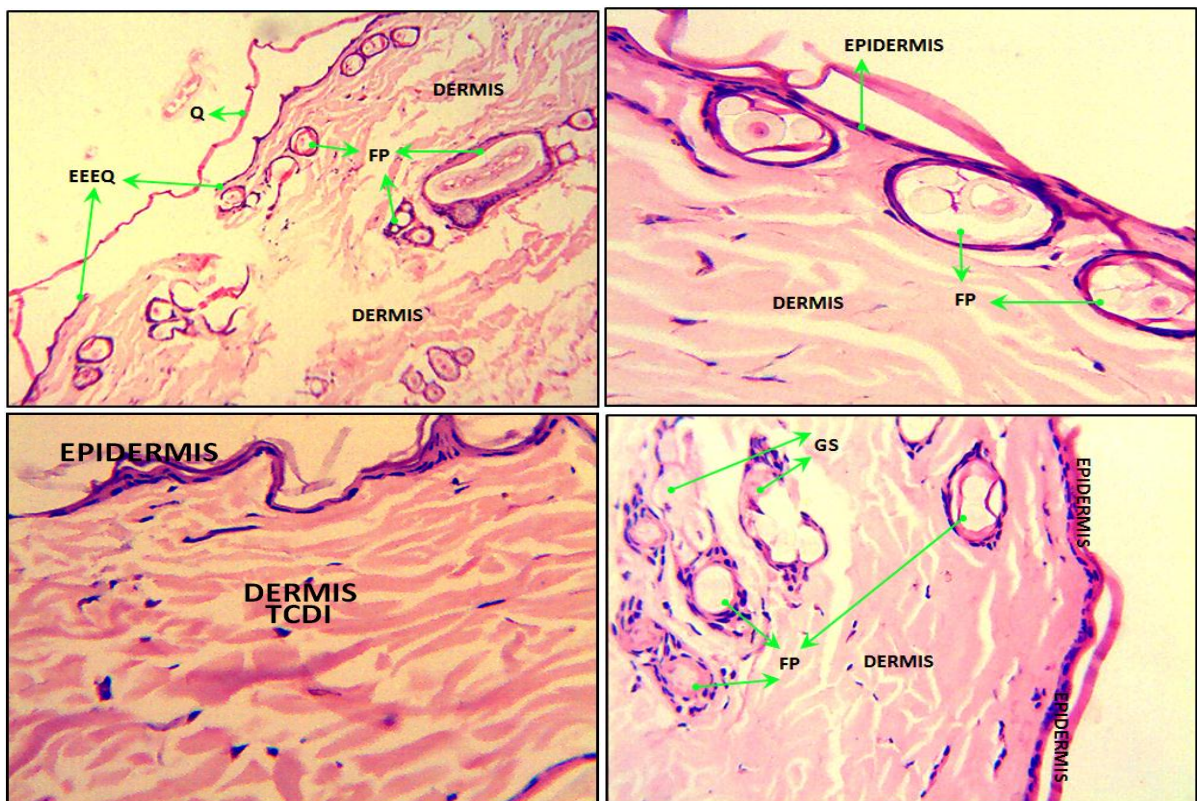
**Figura 19.** Anatomía microscópica de piel dorsal de ratas Wistar mantenida en congelación por 48 horas, después de su extracción. Tinción hematoxilina-eosina (10X y 40X). **EC:** Estrato córneo; **EG:** Estrato granuloso; **EE:** Estrato espinoso; **EB:** Estrato basal. **Q:** Queratina. **TCDI:** Tejido conectivo denso irregular. **FP:** Folículos pilosos. **GS:** Glándulas sebáceas. **TA:** Tejido adiposo. **VS:** Vaso sanguíneo.



La piel analizada después de 12 y 24 horas de iniciados los ensayos macroscópicamente se observó reseca en los bordes, con pérdida de elasticidad, presentó un grosor entre 1 y 1,2 mm, y cambios leves de coloración. Tanto la piel de los ensayos finalizados a 12 horas como la piel de los ensayos finalizados a 24 horas presentaron características macroscópicas similares. Microscópicamente (Figuras 20 y 21), se observó disminución en las capas del epitelio y disminución

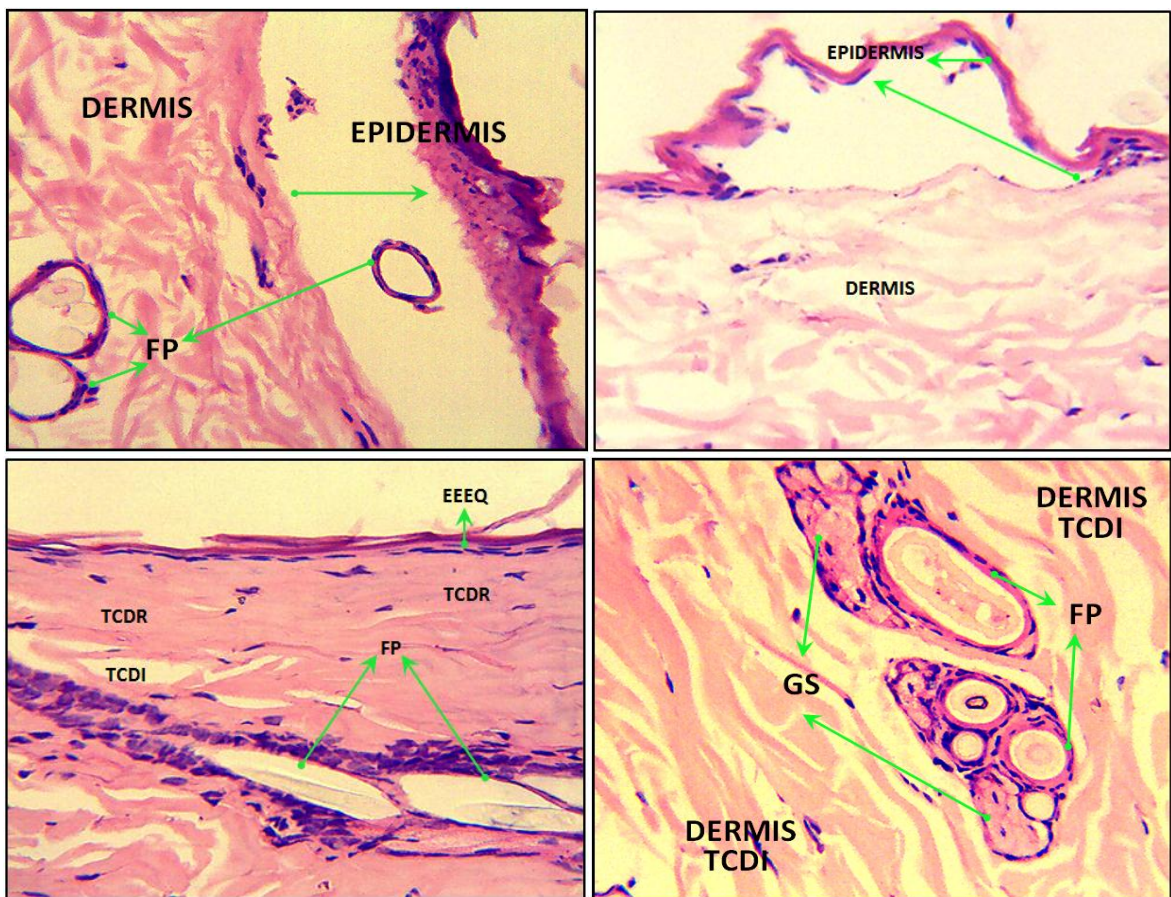
en número y en tamaño de las células de la epidermis. En la piel utilizada en los ensayos a 24 horas se presentó desprendimiento del epitelio. En la mayoría de las membranas no hubo presencia de una capa externa continua en la epidermis. El tejido conectivo denso irregular en la dermis se vuelve más regular. Por la presión ejercida en las celdas sobre las membranas de piel se presentan fibras de colágeno más compactas.

**Figura 20.** Anatomía microscópica de la piel dorsal de ratas Wistar después de 12 horas de iniciados los ensayos de permeación y retención. Tinción hematoxilina-eosina (10X y 40X). **Q:** Queratina. **TCDI:** Tejido conectivo denso irregular. **FP:** Folículos pilosos. **EEEQ:** Epitelio estratificado escamoso queratinizado. **GS:** Glándulas sebáceas. **TA:** Tejido adiposo.



En la piel de los ensayos finalizados a 12 horas (Figura 20) y a 24 horas (Figura 21) se observaron diferencias microscópicas en cuanto a la intensidad del daño mecánico ocurrido en la piel después de utilizar el sistema de celdas de difusión de Franz, los cuales se hacen más notables en la hora 24 del ensayo.

**Figura 21.** Anatomía microscópica de la piel dorsal de ratas Wistar después de 24 horas de iniciados los ensayos de permeación y retención. Tinción hematoxilina-eosina (10X y 40X). **Q:** Queratina. **TCDI:** Tejido conectivo denso irregular. **FP:** Folículos pilosos. **EEQ:** Epitelio estratificado escamoso queratinizado. **GS:** Glándulas sebáceas. **TA:** Tejido adiposo.



**4.2.2 La PcAICI contenida en las formulaciones 1 y 2 no permeo la piel de ratas Wistar hacia el medio receptor.** Se consideró permeación al medio receptor, cuando la PcAICI presente en las formulaciones tuvo la capacidad de permear el estrato córneo y además las capas más profundas de la piel hasta llegar a la cámara receptora de las celdas de Franz (Ver: Figura 9. Sistema de celdas de difusión de Franz en apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos).

Después del tratamiento de la piel con las formulaciones F1 y F2, a 12 horas y 24 horas, no se encontraron concentraciones detectables de PcAICI en el medio receptor. Estos experimentos, para cada tiempo (12 o 24 horas) y para cada una de las formulaciones, fueron repetidos 4 veces utilizando en cada experimento cinco celdas de Franz. Una celda se utilizó como control (Ver: Figura 10. Ensayo de permeación en celdas de difusión de Franz en apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos).

Dado que el proceso de permeación y difusión en piel se relaciona con la ley de Fick (Ver apartado 1.2.2: Aspectos teóricos de difusión en absorción percutánea de Marco teórico), aplicada principalmente en estudios de formulaciones transdérmicas, en este estudio no se aplicaron las ecuaciones de esta ley ya que no hubo una permeación transdérmica del compuesto hacia el medio receptor (Ver capítulo de discusión).

**4.2.3 La PcAICI se retuvo en las capas de la piel de ratas Wistar.** Los resultados de los ensayos de retención de PcAICI determinaron si este fotosensibilizador, a pesar de no pasar al medio receptor, se retenía en las capas de la piel (estrato córneo, epidermis y dermis) de ratas Wistar después de la aplicación de las formulaciones en las cámaras donadoras. Los resultados de estos ensayos se presentan en primer lugar, observando los valores obtenidos de las variables y su comportamiento y en segundo lugar realizando un análisis

estadístico que permitió observar diferencias significativas entre dichas variables. Esto se realizó con el fin de facilitar la interpretación de los resultados obtenidos.

La PcAICI se retuvo tanto en el estrato córneo como en la epidermis más dermis de la piel de ratas Wistar. Las concentraciones del fotosensibilizador encontradas en estas capas de la piel dependieron del tiempo del ensayo (12 o 24 horas) y de la formulación utilizada (F1 y F2).

En la tabla 4 se observan los valores de retención de PcAICI en las capas de la piel (estrato córneo y epidermis más dermis), la formulación aplicada a las cámaras donadoras y el tiempo final del ensayo. Los datos son presentados como promedios  $\pm$  error estándar de concentración de PcAICI en el número de ensayos realizados para cada formulación a 12 y a 24 horas. Se realizaron 4 experimentos para cada formulación a cada una de las horas indicadas. En cada uno de estos experimentos se utilizaron 5 celdas de Franz y una celda control. En total, por cada formulación en cada hora final se tuvo un número de ensayos igual a 20.

**Tabla 4.** Retención de PcAlCl en piel de ratas Wistar. Se registraron las concentraciones de PcAlCl retenidas primero en estrato córneo y posteriormente en epidermis más dermis. Para cada capa de piel se observan el número de ensayos realizados, la formulación aplicada, el tiempo del ensayo, el promedio de los valores de concentración de PcAlCl en 5 celdas (1 ensayo), el promedio de PcAlCl por formulación y tiempo (4 ensayos), la desviación estándar de dicho promedio y su respectivo error estándar.

<b>ESTRATO CÓRNEO</b>						
<b>Ensayo</b>	<b>Formulación</b>	<b>Tiempo (Horas)</b>	<b>PcAlCl (nM/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>PcAlCl (nM/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Error estándar</b>
1	F1	12	48,256	66,733	19,747	9,873
2	F1	12	62,262			
3	F1	12	94,716			
4	F1	12	61,698			
5	F1	24	49,430	57,008	17,882	8,941
6	F1	24	50,074			
7	F1	24	83,609			
8	F1	24	44,918			
9	F2	12	94,950	99,727	4,820	2,410
10	F2	12	96,316			
11	F2	12	104,750			
12	F2	12	102,893			
13	F2	24	75,276	79,396	5,925	3,421
14	F2	24	86,186			
15	F2	24	76,725			
<b>EPIDERMIS MÁS DERMIS</b>						
<b>Ensayo</b>	<b>Formulación</b>	<b>Tiempo (Horas)</b>	<b>PcAlCl (nM/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>PcAlCl (nM/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Error estándar</b>
1	F1	12	72,206	81,917	13,182	6,591
2	F1	12	76,693			
3	F1	12	101,389			
4	F1	12	77,380			
5	F1	24	46,123	50,279	10,018	5,009
6	F1	24	50,115			
7	F1	24	64,153			
8	F1	24	40,723			
9	F2	12	38,467	40,936	2,612	1,306
10	F2	12	42,723			
11	F2	12	38,937			
12	F2	12	43,618			
13	F2	24	59,468	62,490	4,142	2,392
14	F2	24	67,213			
15	F2	24	60,790			

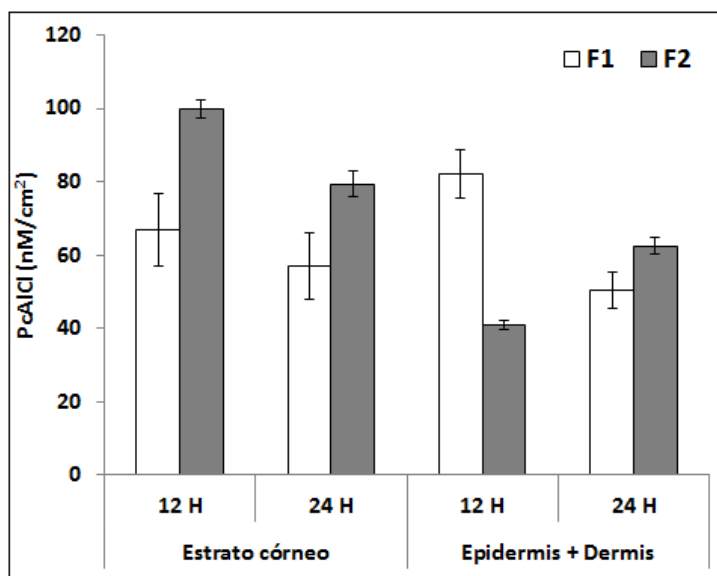
Al observar gráficamente (figura 22) la concentración de PcAlCl retenida en las capas de la piel, se identificó que en el curso del tiempo de 12 a 24 horas de

finalizados los ensayos, se presentó disminución de la concentración del FS en el estrato córneo al aplicar las formulaciones F1 y F2. En epidermis más dermis al utilizar la F1 igualmente se presentó disminución de la concentración del fotosensibilizador en el transcurso del tiempo, mientras que con la F2 se presentó un aumento de concentración de PcAlCl después de las 12 horas.

A partir de estos resultados se puede determinar que los valores máximos de retención del compuesto en estrato córneo se presentaron a 12 horas para las dos formulaciones. Para la F1 se registraron concentraciones de  $66,733 \pm 9,873$  nM/cm<sup>2</sup> y para la F2 concentraciones de  $99,727 \pm 2,410$  nM/cm<sup>2</sup>. Es importante mencionar que en esta capa de la piel en un tiempo de 12 horas hubo mayor retención de PcAlCl utilizando la F2. En los ensayos realizados a 24 horas se presentaron valores más bajos de concentración del compuesto en estrato córneo. Para la F1 se registraron valores de concentración de  $57,008 \pm 8,941$  nM/cm<sup>2</sup> y para la F2 se presentaron concentraciones de  $79,396 \pm 3,421$  nM/cm<sup>2</sup>. En este tiempo la mayor concentración registrada en estrato córneo también se registró después de la aplicación de F2.

En epidermis más dermis los valores máximos de retención se presentaron a 12 horas para la F1 con concentraciones de  $81,917 \pm 6,591$  nM/cm<sup>2</sup> y para la F2 la retención fue diferente con relación a los anteriores. Se presentaron las concentraciones de PcAlCl más elevadas a 24 horas con valores de  $62,490 \pm 2,392$  nM/cm<sup>2</sup>. Los valores más bajos de retención en epidermis más dermis se presentaron a 12 horas después de utilizar la F2 con valores de concentración de  $40,936 \pm 1,306$  nM/cm<sup>2</sup>, seguidos por la concentración de PcAlCl registrada a 24 horas después de utilizar la F1 con valor de  $50,279 \pm 5,009$  nM/cm<sup>2</sup>.

**Figura 22.** Retención de PcAlCl en piel de ratas Wistar. La figura muestra la retención de la PcAlCl en el estrato córneo y en epidermis más dermis después de 12 y 24 horas del inicio de los ensayos y de la aplicación de las formulaciones F1 y F2 en las celdas de Franz. En la gráfica se utilizaron los promedios de los experimentos y se indican los respectivos errores estándar.



Según los resultados obtenidos se evidencia el comportamiento de las formulaciones según su localización en las capas de la piel. La F1 presenta mayor retención en dermis más epidermis y menor retención en estrato córneo a 12 horas. La F2 por su parte, a 12 horas presentó concentraciones del compuesto muy elevadas en estrato córneo y aunque en bajas concentraciones, si se retuvo en epidermis más dermis. En los ensayos a 24 horas tanto la F1 como la F2 disminuyeron la concentración de PcAlCl en el estrato córneo con respecto a los ensayos finalizados a 12 horas. Sin embargo, estos valores siguieron siendo más elevados a los registrados en epidermis más dermis.

**4.2.3.1 El tiempo y la formulación influyeron en la concentración de PcAlCl obtenida en estrato córneo y en epidermis más dermis.** Para comparar y hallar diferencias entre las concentraciones de PcAlCl en las capas de piel, diferencias entre las formulaciones de PcAlCl utilizadas en cuanto a la concentración de PcAlCl y diferencias entre los tiempos manejados durante el desarrollo del experimento, se aplicó como herramienta estadística el análisis de varianza (ANOVA) incluido dentro del diseño de experimentos. Este análisis se realizó teniendo como variable dependiente la concentración de PcAlCl retenida en la piel de ratas Wistar expresada como el promedio de los ensayos según la formulación y el tiempo. Las pruebas de los efectos inter-sujetos se presentan en la tabla 5 donde se observan las diferencias significativas entre las variables tenidas en cuenta en el estudio: capas de la piel, tiempo y formulaciones. Igualmente, se presentan las diferencias significativas entre la comparación e interacción de estas variables lo cual indica que tienen influencia sobre la concentración registrada al final de cada ensayo. Para todas las variables y sus interacciones el valor de significación es menor de 5% ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 5.** Pruebas de los efectos inter-sujetos en el análisis de varianza (ANOVA). La variable dependiente en el análisis fue la concentración de PcAlCl (nM/cm<sup>2</sup>) en las capas de la piel. Se presentan las variables tiempo, formulación y capas de la piel y sus interacciones (ver Origen). La suma de cuadrados tipo III, los grados de libertad (gl), la media cuadrática, el test F (F de Fisher) y la significancia de cada valor (R<sup>2</sup>: 70%; p<0,05).

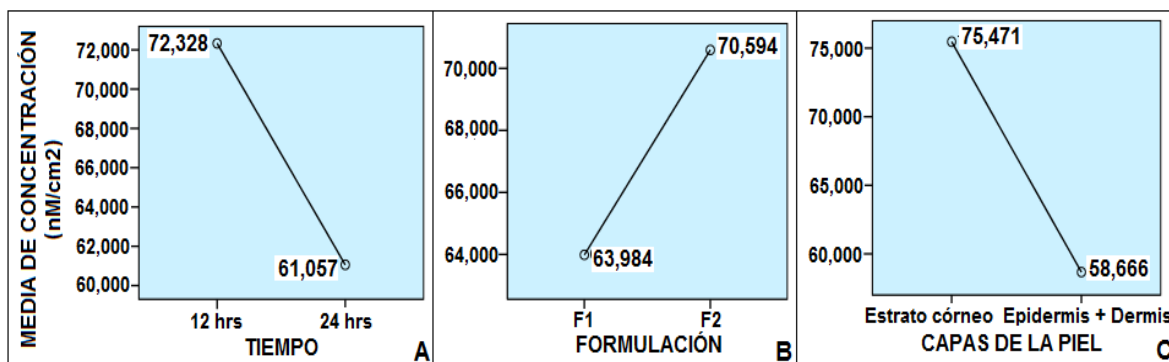
Pruebas de los efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: Concentración de PcAlCl (nM/cm <sup>2</sup> )					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significancia
<b>Modelo corregido</b>	49657,839 <sup>a</sup>	7	7093,977	47,520	,000
<b>Intersección</b>	669154,391	1	669154,391	4482,440	,000
<b>Capas de piel</b>	10434,215	1	10434,215	69,895	,000
<b>Formulación</b>	1634,433	1	1634,433	10,949	,001
<b>Tiempo</b>	3718,375	1	3718,375	24,908	,000
<b>Capas de piel *</b>	16341,807	1	16341,807	109,468	,000
<b>Formulación</b>					
<b>Capas de piel *</b>	920,536	1	920,536	6,166	,014
<b>Tiempo</b>					
<b>Formulación *</b>	4185,185	1	4185,185	28,035	,000
<b>Tiempo</b>					
<b>Capas de piel *</b>	9392,896	1	9392,896	62,920	,000
<b>Formulación *</b>					
<b>Tiempo</b>					
<b>Error</b>	21198,258	142	149,284		
<b>Total</b>	745584,992	150			
<b>Total corregida</b>	70856,097	149			

<sup>a</sup>R cuadrado: 70%

Para cada una de las variables sólo existieron dos niveles (dos tiempos: 12 y 24 horas; dos formulaciones: F1 y F2; dos capas de piel: Estrato córneo y epidermis más dermis), por lo cual no se aplicaron métodos de comparación múltiple. Para observar las diferencias en las variables respecto al tiempo, formulaciones y las capas de la piel respecto a mayor o menor concentración de PcAlCl (nM/cm<sup>2</sup>), se realizaron gráficos de contraste con el fin de observar valores máximos y mínimos de las variables utilizadas en el modelo del ensayo. En la figura 23A se graficaron las medias de los resultados de concentración de PcAlCl respecto al tiempo. A partir de este análisis son evidentes las mayores concentraciones del compuesto

registradas a las 12 horas de finalizados los ensayos de retención en las capas de la piel ( $72,328 \text{ nM/cm}^2$ ). Por el contrario los valores mínimos de retención se presentaron después de finalizar los ensayos a 24 horas ( $61,057 \text{ nM/cm}^2$ ).

**Figura 23.** Gráficos de contraste de las variables utilizadas en el modelo del experimento. **(A)** Contraste entre el tiempo (12 horas y 24 horas) y la media de concentración de PcAICI ( $\text{nM/cm}^2$ ). **(B)** Contraste entre formulaciones (F1 y F2) y la media de concentración de PcAICI ( $\text{nM/cm}^2$ ). **(C)** Contraste entre las capas de la piel (Estrato córneo y epidermis más dermis) y la media de concentración de PcAICI ( $\text{nM/cm}^2$ ).



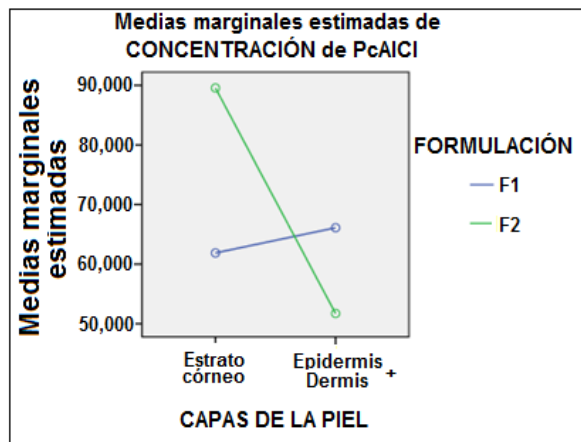
Al analizar la interacción de la variable formulaciones con las concentraciones de PcAICI halladas (Figura 23B), se encontró mayor concentración del compuesto después de aplicar la F2 en las cámaras donadoras de las celdas de Franz ( $70,594 \text{ nM/cm}^2$ ) y las menores concentraciones, después de la aplicación de la F1 en estos ensayos ( $63,984 \text{ nM/cm}^2$ ). La capa de la piel que registró mayores concentraciones de PcAICI fue el estrato córneo con  $75,471 \text{ nM/cm}^2$ , de manera opuesta los valores de concentración del fotosensibilizador más bajos se presentaron en epidermis más dermis con valor de  $58,666 \text{ nM/cm}^2$  (Figura 23C).

**4.2.3.2 La interacción entre las variables influyó sobre las concentraciones de PcAICI en piel de ratas Wistar.** Para analizar los efectos producidos por las diferentes interacciones entre variables sobre las concentraciones de PcAICI registradas en las capas de la piel, se realizaron diferentes gráficos de perfil o gráficos de interacción. Estos gráficos compararon las medias marginales estimadas por el modelo para la interacción de las variables. Los gráficos de perfil son gráficos de líneas en las que cada punto indica la media marginal estimada de una variable dependiente en un nivel de un factor.

En el gráfico de perfil que relaciona las variables: capas de la piel y formulaciones (Figura 24) se observó que las mayores concentraciones de PcAICI se presentaron en el estrato córneo con la formulación 2. De manera contraria en el estudio de retención de PcAICI las concentraciones más bajas del fotosensibilizador se registraron en epidermis más dermis con esta misma formulación. La recta que representó este comportamiento de la F2 en las capas de la piel presentó una notable inclinación debido a que los dos puntos de unión de la línea que representan las capas de la piel tuvieron una distancia elevada, las medias marginales que el modelo estimó para la concentración de PcAICI fueron de 90,000 para la F2 en estrato córneo y 50,000 para esta misma formulación en epidermis más dermis.

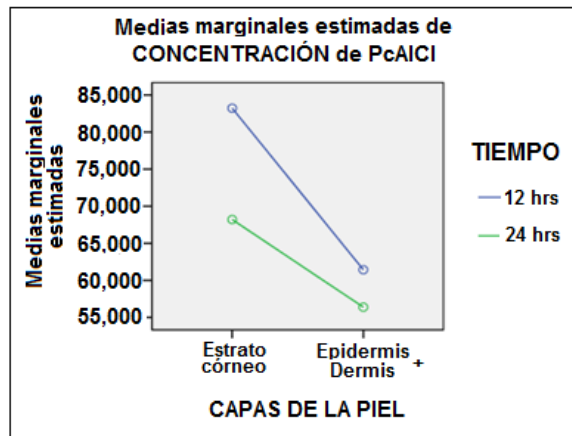
En cuanto a la F1 su comportamiento en la gráfica de perfil, presentó menos variabilidad en los valores de concentración del compuesto con relación a las capas de piel analizadas. La línea del gráfico de perfil que representa la diferencia de concentración del compuesto en la F1 en las capas de la piel tuvo una inclinación muy baja, los puntos que indican las capas de la piel tienen valores muy cercanos. Las medias marginales estimadas por el modelo para esta formulación de PcAICI estuvieron entre 60,000 y 70,000 para las dos capas de la piel (estrato córneo y epidermis más dermis).

**Figura 24.** Gráfico de perfil para la relación entre concentración de PcAlCl en las capas de la piel según la formulación de PcAlCl utilizada. Se presentan las medias marginales estimadas por el modelo, las capas de la piel y las formulaciones.



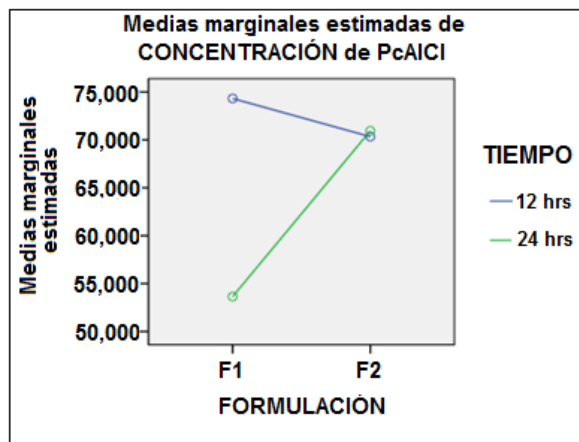
En el gráfico de perfil que relacionó la concentración de PcAlCl en las capas de la piel con relación al tiempo del ensayo (Figura 25), se observó que a 12 horas de finalizados los ensayos se presentó una concentración del fotosensibilizador más elevada en estrato córneo en comparación con epidermis más dermis. Las medias marginales estimadas por el modelo indican valores de 83,000 en estrato córneo y 63,000 para epidermis más dermis. En el tiempo de 24 horas se presentó el mismo comportamiento pero con medias marginales más bajas: 68,000 en estrato córneo y 57,000 en epidermis más dermis. Según el gráfico de perfil en los dos tiempos utilizados se registró mayor concentración de PcAlCl en estrato córneo que en epidermis más dermis y por otra parte se presentaron mayores concentraciones del compuesto a 12 horas y menores concentraciones de este a 24 horas.

**Figura 25.** Gráfico de perfil para la relación entre concentración de PcAICI en las capas de la piel en los tiempos del ensayo. Se presentan las medias marginales estimadas por el modelo, las capas de la piel y los tiempos en horas.



La relación entre las variables formulación y tiempo respecto a la concentración de PcAICI en el gráfico de perfil observado en la figura 26 indicó que las concentraciones más altas de PcAICI se registraron en la hora 12 del experimento. En este tiempo al utilizar la F1 y la F2 el modelo estimó medias marginales de concentración entre 70,000 y 75,000 es decir, los valores de concentración del compuesto en las dos formulaciones hallados a 12 horas son muy cercanos. En un tiempo de 24 horas el comportamiento presentó variación. Las medias marginales estimadas por el modelo fueron 53,000 para la F1 y 70,000 para la F2; los puntos que unen la recta que representa la hora 24 del ensayo estuvieron muy alejados por lo cual dicha recta presentó mayor inclinación. Es de gran importancia señalar que para la F2 el modelo estima las mismas medias marginales de concentración de PcAICI tanto a 12 horas como a 24 horas (70,000).

**Figura 26.** Gráfico de perfil para la relación entre concentración de PcAICI según las formulaciones aplicadas y el tiempo. Se presentan las medias marginales estimadas por el modelo, las formulaciones y los tiempos en horas.



### 4.3 DISTRIBUCIÓN *in vivo* DE PcAICI EN PIEL Y ÓRGANOS DE RATAS WISTAR

Los resultados presentados a continuación muestran la distribución de PcAICI en piel y órganos de ratas Wistar. Los experimentos de distribución se realizaron tanto en animales con piel sana como en animales con lesiones quirúrgicas inducidas en piel después del tratamiento tópico con cada una de las formulaciones de PcAICI. Se presentan las características de la piel, la distribución de PcAICI en piel y órganos de animales con piel sana y animales con lesiones inducidas y la significancia estadística de las diferencias presentadas en el ensayo.

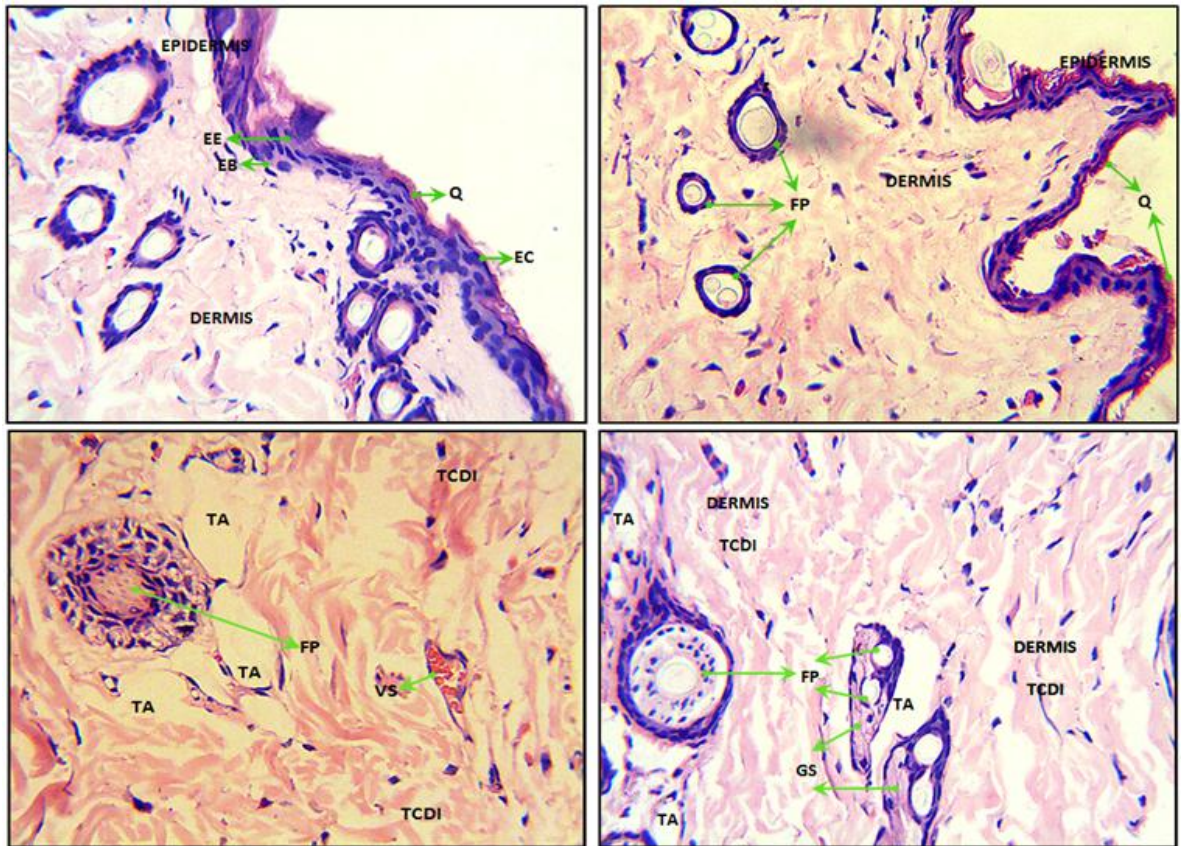
#### 4.3.1 Características de la piel de los animales en el sitio de las aplicaciones.

En los ensayos *in vivo* se tomaron biopsias de piel en el sitio de aplicación de las formulaciones y de los vehículos una vez sacrificados los animales tanto con piel sana como con lesiones inducidas quirúrgicamente. En animales con piel normal, dicha piel en el sitio de aplicación de las formulaciones fue macroscópicamente

normal, no presentó alteraciones, su color, grosor y apariencia fueron normales. La anatomía microscópica de la piel también fue normal (Figura 27), presentó en la totalidad de los casos una epidermis fina con epitelio plano queratinizado. En la parte inferior de la epidermis se encuentra la dermis, caracterizada por presentar tejido conectivo laxo irregular, fibroso y adiposo, folículos pilosos, glándulas sebáceas y vasos sanguíneos. El colágeno se presentó como una red de fibras compactas.

La anatomía macroscópica y microscópica de la piel en estos animales no presentó diferencias en cuanto a la formulación aplicada (F1 y F2) ni diferencias con la aplicación del vehículo de cada una de estas formulaciones, es decir, no se registraron cambios a nivel macroscópico ni microscópico relacionados con el tipo de formulación de PcAICI aplicada.

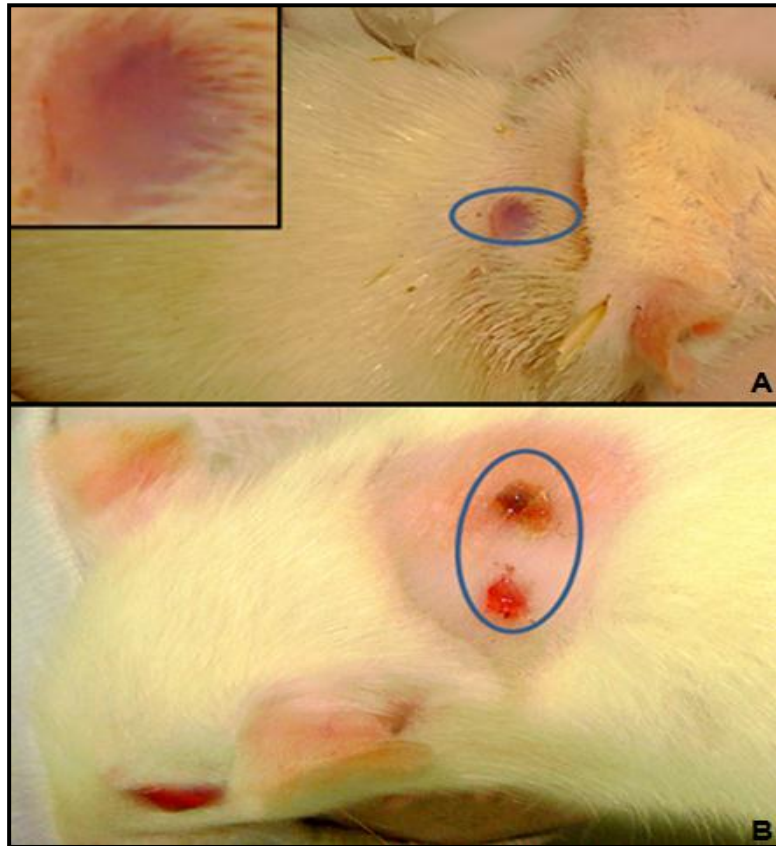
**Figura 27.** Anatomía microscópica de la piel extraída de animales sin lesión inducida (sitio de aplicación de las formulaciones). Tinción hematoxilina-eosina (10X y 40X). **EC:** Estrato córneo; **EE:** Estrato espinoso; **EB:** Estrato basal. **Q:** Queratina. **TCDI:** Tejido conectivo denso irregular. **FP:** Folículos pilosos. **GS:** Glándulas sebáceas. **TA:** Tejido adiposo. **VS:** Vasos sanguíneos.



En los animales con lesiones quirúrgicas inducidas en piel se realizó un seguimiento cada 24 horas durante los 8 días de duración del tratamiento. Este seguimiento fue realizado por dos observadores. Se realizó medida del grosor de la piel en el área de la lesión el cual fue de 1 mm en la totalidad de los casos. Las medidas de diámetro transversal de las lesiones estuvieron en un rango de 3 mm a 5 mm los primeros días de tratamiento y entre 0,5 mm y 1,5 mm al finalizarlo. El diámetro longitudinal estuvo en un rango de 2 mm a 3 mm los primeros días del

tratamiento y los días finales se presentaron medidas entre 0,5mm y 1mm. La temperatura en el sitio de aplicación de los tratamientos, en los cuales previamente se indujeron las lesiones se mantuvo entre 30°C y 33°C en la totalidad de los casos. No hubo presencia de enrojecimiento, tumefacción o mordeduras en ningún animal sujeto de ensayo. Sólo en tres casos se presentaron mínimas rasgaduras o arañazos por parte del mismo animal, las cuales sanaron en pocos días. En el momento del sacrificio y extracción de la piel en el sitio de aplicación de las formulaciones, macroscópicamente esta piel se caracterizó por presentar cura de las lesiones lo cual se observó en algunos casos por el cierre total de la herida inducida y en otros casos por la presencia de una costra o superficie endurecida formada en el proceso de resolución de la lesión (Figura 28).

**Figura 28.** Aspecto macroscópico de las lesiones después de 8 días de la aplicación de los tratamientos. **A.** Animal con lesión inducida en piel completamente cerrada (Macroscópicamente: reparación total de la lesión). **B.** Animal con presencia de costra o superficie endurecida formada en el proceso de resolución de la lesión.

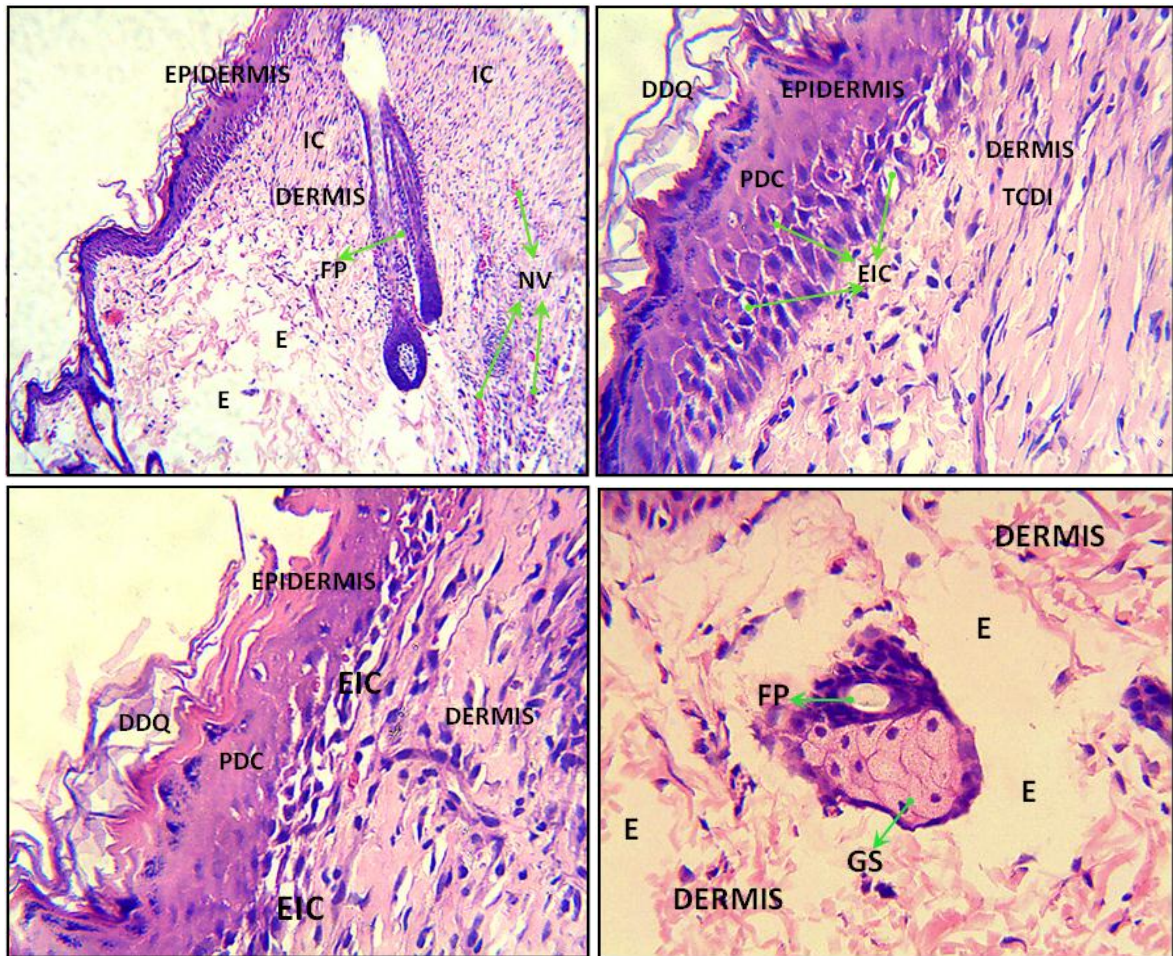


Microscópicamente, la piel de animales con lesiones inducidas quirúrgicamente se caracterizó por presentar en algunos casos regeneración del epitelio. En la epidermis se presentó desprendimiento desorganizado de la queratina, pérdida de diferenciación celular y en ocasiones, presencia de edema intercelular en las capas basal y granulosa. La dermis se caracterizó por presentar un infiltrado celular o inflamatorio acompañado de neovascularización en gran proporción. También se observó regeneración de tejido conectivo acompañada de un elevado

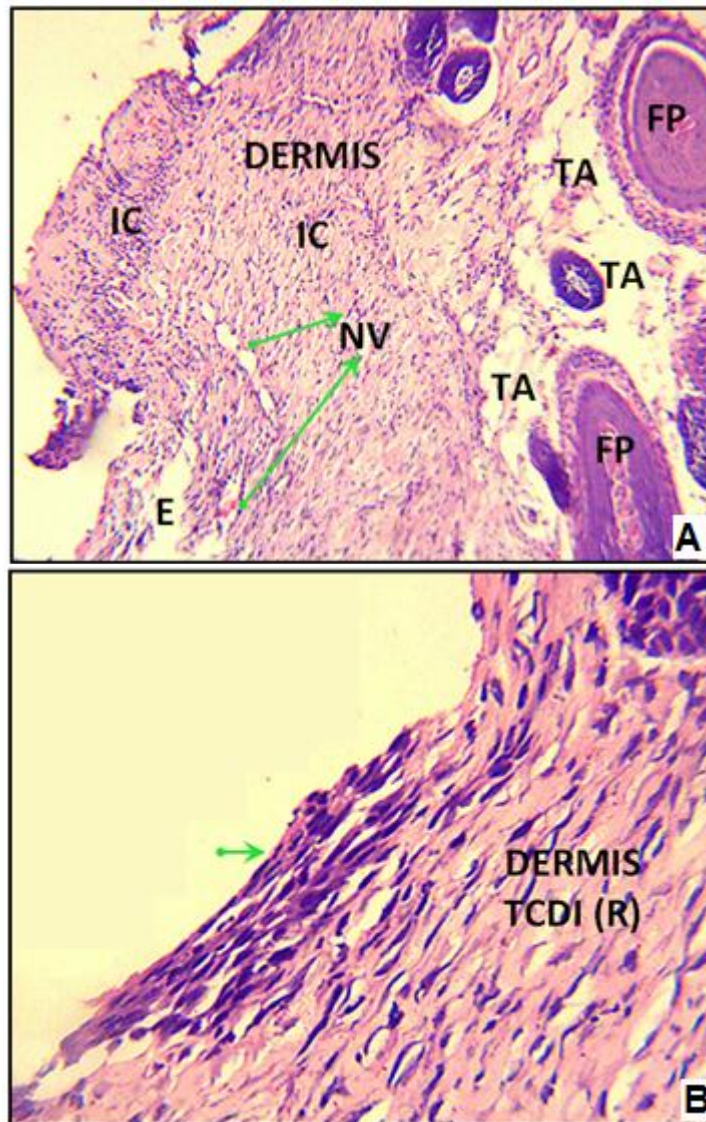
número de fibroblastos y una mayor matriz extracelular (Figura 29). En algunos casos se observó ausencia total de la epidermis y cambio de esta capa epitelial por tejido conectivo o regeneración del epitelio, acompañado de regeneración de tejido conectivo denso irregular (Figura 30). En el infiltrado celular o inflamatorio característico de las lesiones inducidas se observaron células plasmáticas o plasmocitos, neutrófilos (células polimorfonucleares) y linfocitos en mayor cantidad (Figura 31). En todos los casos, se observó neovascularización acompañada de regeneración de tejido conectivo denso irregular. La disposición de los vasos sanguíneos en formación de manera perpendicular a las fibras de colágeno es una de las principales características de la reparación y regeneración de un tejido (Figura 32).

No se observaron diferencias entre las características macroscópicas y microscópicas presentadas en animales con lesiones quirúrgicas inducidas al final del tratamiento. Es decir las formulaciones de PcAlCl (F1 y F2) no cambiaron ni afectaron las características macroscópicas y microscópicas de la piel. De igual forma, en los grupos control, tanto en el grupo de animales a los cuales se les aplicaron los vehículos de las formulaciones como en el grupo de animales que no recibió tratamiento las características macro y microscópicas fueron similares entre si y similares a los demás grupos experimentales.

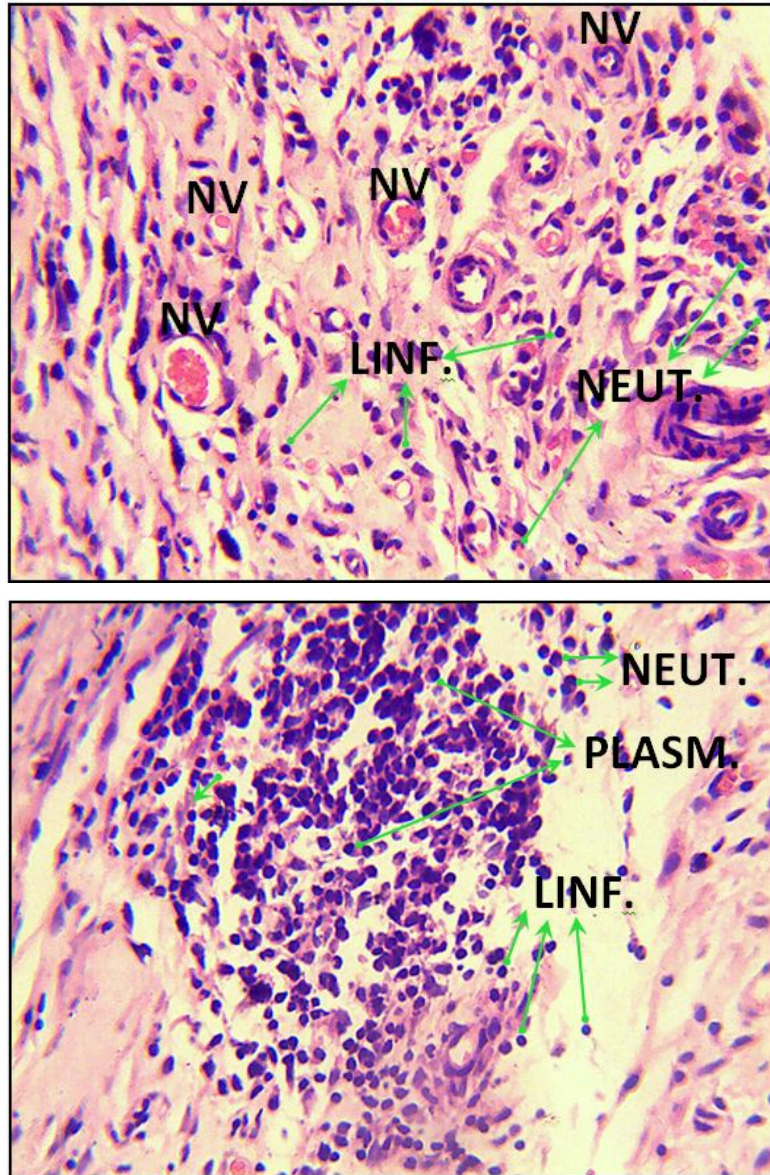
**Figura 29.** Caracterización microscópica de las lesiones inducidas quirúrgicamente en piel de ratas Wistar. Tinción hematoxilina-eosina (10X y 40X). Se muestran las capas de la piel: Epidermis y dermis y sus respectivas alteraciones debido a la lesión inducida. **IC:** Infiltrado celular. **E:** Edema. **EIC:** Edema intercelular. **FP:** Folículos pilosos. **NV:** Neovascularización: **PDC:** Pérdida de diferenciación celular. **DDQ:** Desprendimiento desorganizado de queratina. **TCDI:** Tejido conectivo denso irregular. **GS:** Glándulas sebáceas.



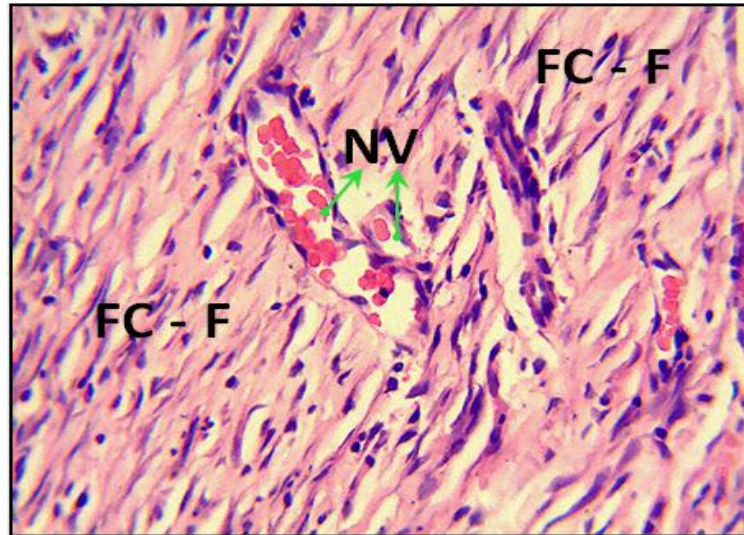
**Figura 30.** Caracterización microscópica de las lesiones inducidas: Ausencia de epidermis y regeneración de tejido. Tinción hematoxilina-eosina (10X y 40X). Se observa ausencia de la epidermis y cambio de esta capa epitelial por tejido conectivo (Indicación de la flecha en B) **(A)**. **NV**: Neovascularización. **IC**: Infiltrado celular. **TA**: Tejido adiposo. **FP**: Folículo piloso. **E**: Edema. **(B)**. La flecha de color verde indica inicio de regeneración del tejido de la epidermis (Memoria epitelial). **TCDI (R)**: Regeneración de tejido conectivo denso irregular.



**Figura 31.** Caracterización microscópica de las lesiones inducidas: Infiltrado celular o inflamatorio. Tinción hematoxilina-eosina (10X y 40X). Se observa el infiltrado inflamatorio o celular característico de la lesión inducida. **NV:** Neovascularización. **LINF.:** Linfocitos. **NEUT.:** Neutrófilos. **PLASM.:** Plasmocitos.



**Figura 32.** Caracterización microscópica de las lesiones inducidas: Neovascularización y regeneración de tejido conectivo denso irregular. Tinción hematoxilina-eosina (10X y 40X). Se observa la disposición de vasos sanguíneos en formación perpendiculares a las fibras de colágeno, característica de la reparación y regeneración de tejidos. **NV:** Neovascularización. **FC-F:** Fibras de colágeno – Fibroblastos.



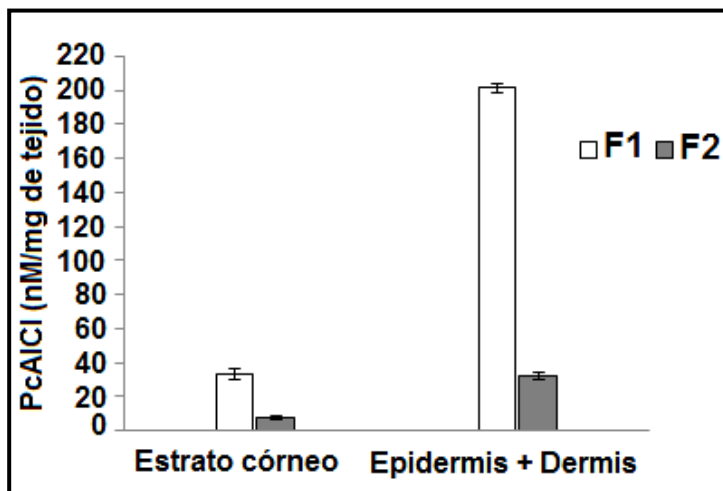
#### **4.3.2 Distribución de PcAlCl en piel y en órganos de ratas Wistar con piel normal y con lesiones quirúrgicas inducidas en piel.**

La PcAlCl aplicada en ratas Wistar se retuvo en las capas de la piel en el sitio de aplicación de los tratamientos y en órganos dependiendo del estado de este sitio (piel sana o piel con lesión quirúrgica inducida) y de la formulación aplicada.

**4.3.2.1 La aplicación tópica de las formulaciones en animales con piel sana retuvo la PcAlCl en las capas de la piel.** La PcAlCl se retuvo en las capas de la piel de ratas Wistar con piel sana, en el sitio de aplicación después del tratamiento tópico con cuatro aplicaciones de cada una de las formulaciones (F1: 2,5 mg/mL de PcAlCl y F2: 196  $\mu$ M de PcAlCl) cada dos días (1, 4, 7 y 10 días). Después de

finalizar el tratamiento con la F1 se encontraron concentraciones de PcAlCl de  $31,867 \pm 2,869$  nM por mg de tejido en estrato córneo (EC) y  $202,406 \pm 2,912$  nM por mg de tejido en epidermis más dermis (E+D). Después del tratamiento con la F2 se encontraron concentraciones de PcAlCl de  $6,438 \pm 0,601$  nM por mg de tejido en estrato córneo y  $33,186 \pm 2,473$  nM por mg de tejido en epidermis más dermis (Figura 33). Se utilizaron 5 animales por cada grupo experimental y 2 animales en cada grupo control. Se realizaron estandarizaciones de las técnicas de aplicación de formulaciones y distribución en órganos en tres grupos con 4 animales en cada grupo.

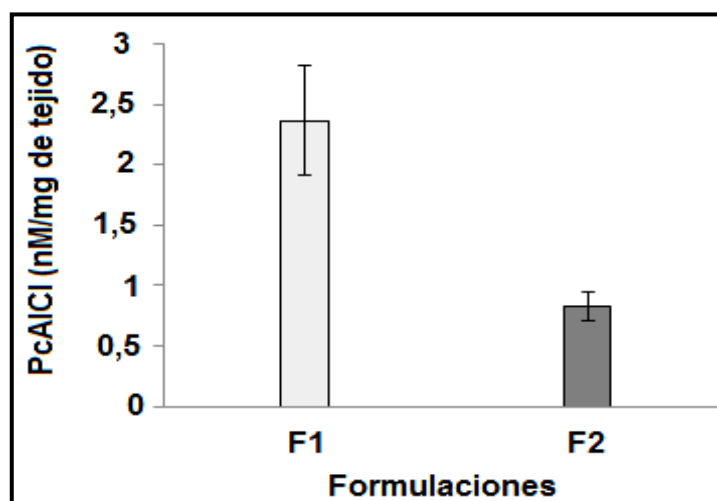
**Figura 33.** Distribución de PcAlCl en las capas de piel de ratas Wistar sin lesión inducida quirúrgicamente. Perfil de distribución obtenido después de la aplicación tópica de F1 y F2. Concentración en nM de PcAlCl / mg de tejido.



**4.3.2.2 Después de la aplicación tópica de las formulaciones en animales con piel sana, se observó concentración de PcAlCl en pulmón.** Después de aplicados los tratamientos se encontraron concentraciones de PcAlCl en el pulmón más no en cerebro, corazón, bazo, hígado y riñón. Las concentraciones de PcAlCl registradas en pulmón fueron:  $2,362 \pm 0,452$  nM de PcAlCl por mg de tejido para la

F1 y  $0,824 \pm 0,117$  nM de PcAlCl por mg de tejido para la F2 (Figura 34). En la totalidad de animales con piel sana a los cuales se les aplicó la PcAlCl contenida en F1 y en F2 se registró concentración de PcAlCl en pulmón.

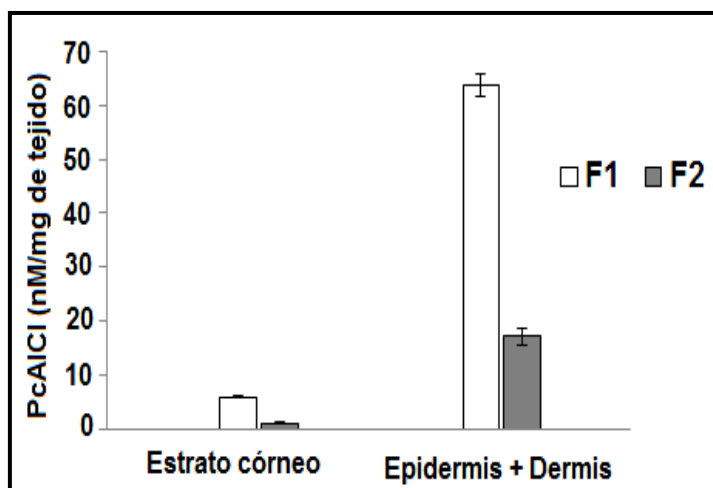
**Figura 34.** Distribución de PcAlCl en pulmón de ratas Wistar sin lesión inducida quirúrgicamente. Perfil de distribución obtenido después de la aplicación tópica de F1 y F2. Concentración en nM de PcAlCl / mg de tejido.



**4.3.2.3 La aplicación tópica de las formulaciones en animales con piel lesionada quirúrgicamente retuvo la PcAlCl en las capas de la piel.** Después del tratamiento tópico cada 24 horas durante 8 días con las formulaciones F1 y F2 (F1: 2,5 mg/mL de PcAlCl y F2: 196  $\mu$ M de PcAlCl), la PcAlCl se retuvo en el sitio de aplicación. Con la F1 se encontraron concentraciones de PcAlCl de  $5,938 \pm 0,250$  nM por mg de tejido en estrato córneo y  $63,836 \pm 2,077$  nM por mg de tejido en epidermis más dermis. Con la F2 se registraron concentraciones de PcAlCl de  $0,999 \pm 0,137$  nM por mg de tejido en estrato córneo y  $17,080 \pm 1,478$  nM por mg de tejido en epidermis más dermis (Figura 35). En el experimento se utilizaron 4 animales por cada grupo, en los grupos A y C se aplicaron las formulaciones de PcAlCl (F1 y F2, respectivamente), en los grupos B y D se aplicaron los vehículos

de las formulaciones (V1 y V2, respectivamente) y en el grupo E no se aplicó ningún tratamiento (control). Previamente se realizaron estandarizaciones de la inducción de las úlceras quirúrgicamente, aplicación de formulaciones y distribución en órganos en cuatro grupos con 4 animales en cada uno.

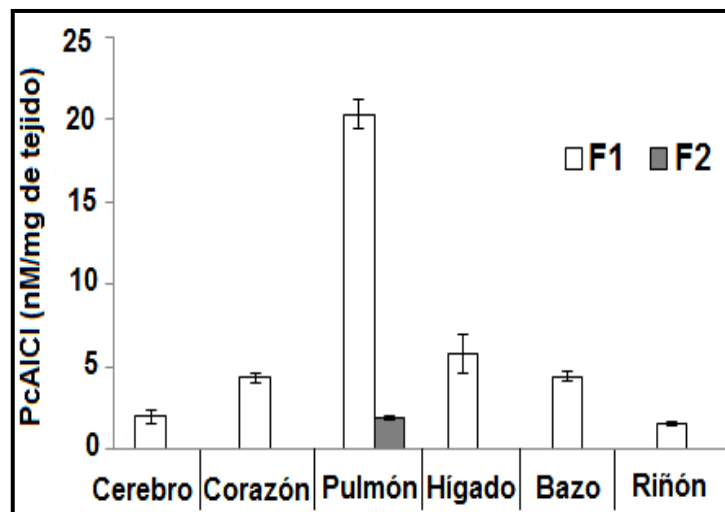
**Figura 35.** Distribución de PcAlCl en las capas de piel de ratas Wistar con lesión quirúrgica inducida. Perfil de distribución obtenido después de la aplicación tópica de F1 y F2. Concentración en nM de PcAlCl / mg de tejido.



**4.3.2.4 En animales con piel lesionada la distribución se presentó en función de la formulación aplicada.** Los animales con lesiones quirúrgicas tratados con la F1 mostraron concentraciones de PcAlCl en los órganos: cerebro, pulmón, corazón, hígado, bazo y riñón, mientras que los animales con lesiones tratados con la F2 mostraron concentraciones de PcAlCl sólo en pulmón. Como se observa en la figura 36, después de aplicar la F1 el órgano que registró mayores concentraciones de PcAlCl fue el pulmón con concentraciones de  $20,333 \pm 0,923$  nM del compuesto por mg de tejido. En los demás órganos las concentraciones de PcAlCl registradas fueron: hígado:  $5,803 \pm 1,205$  nM por mg de tejido, bazo:  $4,433 \pm 0,297$  nM por mg de tejido, corazón:  $4,340 \pm 0,327$  nM por mg de tejido, cerebro:

1,983 ± 0,387 nM por mg de tejido y riñón: 1,579 ± 0,145 nM por mg de tejido. Después de aplicar la F2 se registraron concentraciones solo en pulmón iguales a 1,921 ± 0,120 nM por mg de tejido.

**Figura 36.** Distribución de PcAlCl en órganos de ratas Wistar con lesión quirúrgica inducida después de la aplicación tópica de F1 y F2. Concentración en nM de PcAlCl / mg de tejido.



**4.3.2.5 No se detectaron concentraciones de PcAlCl después de aplicar los vehículos de las formulaciones, en animales control ni en las muestras de piel distantes del sitio de aplicación de formulaciones.** En los controles utilizados (animales tratados con las formulaciones sin PcAlCl y animales no tratados) no se detectaron concentraciones del compuesto en las capas de piel: ni en los órganos analizados: Cerebro, corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón. Los experimentos con los vehículos de las formulaciones se realizaron en dos grupos experimentales tanto en animales con piel sana como en animales con piel lesionada. Igualmente en los dos casos se tuvo en cuenta un grupo control al cual no se le aplicó tratamiento. En las muestras de piel tomadas en un lugar distante

del sitio de aplicación de las formulaciones en la totalidad de animales tampoco se observó concentración de PcAICI.

**4.3.2.6 Existieron diferencias significativas en la distribución de PcAICI en ratas Wistar con piel sana y con lesiones quirúrgicas inducidas según la formulación aplicada.** Con el fin de hallar diferencias significativas entre animales con piel sana y animales con piel con lesión inducida quirúrgicamente y las formulaciones aplicadas respecto a las concentraciones calculadas en las capas de piel y órganos de estos animales, se aplicó como herramienta estadística la prueba de Kruskal Wallis. Al aplicar esta prueba el valor  $p$  fue inferior al valor de significancia ( $p < 0,05$ ) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Prueba de Kruskal Wallis, estadísticos de contraste. Se observan las diferencias significativas en la variable de agrupación: formulación, respecto a la variable dependiente: Concentración de PcAICI (nM), en animales con piel sana **A**, y en animales con piel lesionada **B**. Se muestran los valores de: Chi-cuadrado, grados de libertad (gl) y significancia. Las pruebas de Kruskal Wallis indicaron que existen diferencias significativas en el valor de concentración de PcAICI (nM). El valor  $p$  es inferior al valor de significancia de la prueba ( $p < 0,05$ ).

Estadísticos de contraste <sup>a,b,c</sup>		Estadísticos de contraste <sup>a,b,c</sup>	
	Concentración de PcAICI (nM)		Concentración de PcAICI (nM)
Chi-cuadrado	7,384	Chi-cuadrado	48,371
gl	1	gl	1
Significancia	,007	Significancia	,000

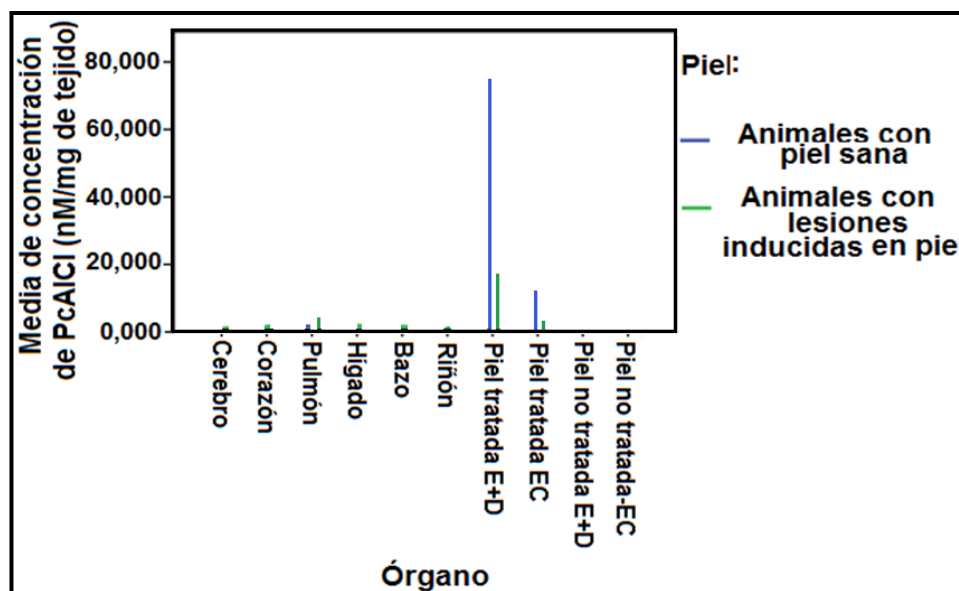
a. Piel: Sana  
b. Prueba de Kruskal-Wallis  
c. Variable de agrupación: Formulación **A**

a. Piel: Con lesión  
b. Prueba de Kruskal-Wallis  
c. Variable de agrupación: Formulación **B**

Después de hallar diferencias significativas entre las variables del estudio se realizaron comparaciones más específicas mediante la prueba de Mann-Whitney y se encontró que existieron diferencias entre la concentración de PcAICI registrada

en los diferentes órganos analizados y entre las capas de la piel de animales con piel sana y con piel con lesión inducida quirúrgicamente después de la aplicación de los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Se graficaron las medias de concentración de PcAICI en las capas de piel y órganos independientemente de la formulación aplicada, observándose el comportamiento general de distribución del FS en la totalidad de los animales (Figura 37). Al observar este perfil general de distribución se observó que en animales con piel sana la mayor concentración de PcAICI se presentó en E+D de la piel tratada con las formulaciones (media de concentración de PcAICI entre 70,000 y 80,000 nM por mg de tejido), seguida por la concentración del FS en EC de esta misma piel (media de concentración de PcAICI entre 10 y 20 nM por mg de tejido). En los órganos de animales con piel sana no se presentó distribución de PcAICI excepto en pulmón en donde se registraron valores de concentración muy bajos (media de concentración de PcAICI entre 0,000 y 1,000 nM por mg de tejido). Por su parte, en animales con piel con lesión inducida la mayor concentración de PcAICI también se presentó en E+D de la piel tratada pero con valores más bajos que los registrados en piel sana (media de concentración de PcAICI: 10,000 y 20,000 nM por mg de tejido), seguida por la concentración en EC de esta misma piel (media de concentración de PcAICI: entre 0,000 y 1,000 nM por mg de tejido). En los órganos de animales con lesión inducida si se registraron concentraciones de PcAICI con medias de concentración de PcAICI entre 0,000 y 2,000 nM por mg de tejido, los mayores registros se presentaron en pulmón. En la piel no tratada de animales con piel sana y de animales con lesiones inducidas en piel no se registraron valores de concentración de PcAICI.

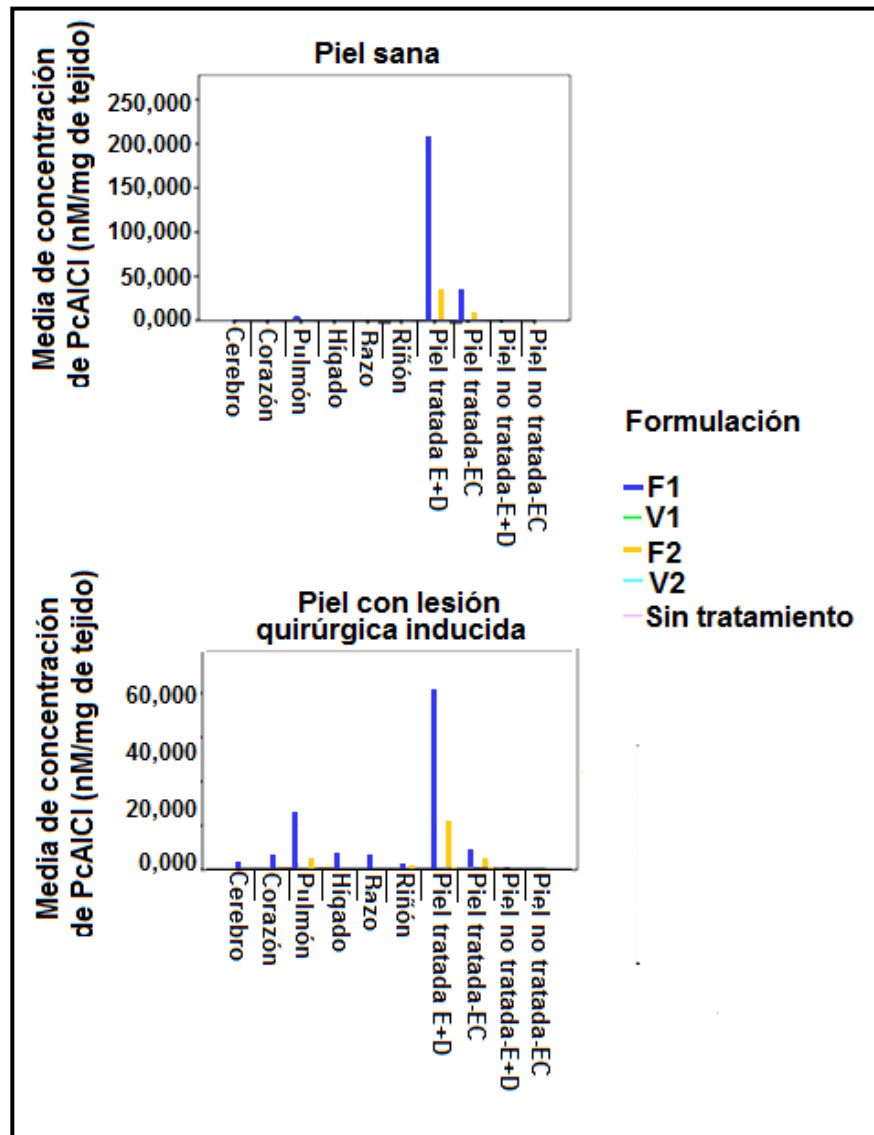
**Figura 37.** Distribución de PcAICI en las capas de piel y en órganos de ratas Wistar en animales con piel sana y en animales con lesiones inducidas, independiente de la formulación aplicada. En las capas de la piel EC y E+D se realizaron lecturas de concentración tanto en piel del sitio de aplicación de los tratamientos (piel tratada) como en piel distante de este sitio (piel no tratada).



En la figura 38 se presenta la distribución de PcAICI en piel y órganos de ratas Wistar con piel sana y con lesión quirúrgica inducida a partir de la aplicación de las formulaciones y sus respectivos vehículos (controles). Los valores más altos de concentración de PcAICI registrados después de aplicar la F1 en animales con piel normal (Figura 38A) se presentaron en E+D de piel tratada (media de concentración de PcAICI: 202,406 nM por mg de tejido) seguidos por EC de esta misma piel (media de concentración de PcAICI: 31,867 nM por mg de tejido). En pulmón se registraron valores muy bajos de concentración de PcAICI (media de concentración de PcAICI: 2,362 nM por mg de tejido) y los demás órganos no presentaron valores de concentración del FS. Después de la aplicación de F2 los valores más elevados de concentración de PcAICI también se registraron en E+D seguidos por EC de piel tratada (media de concentración de PcAICI: 29,187 y

6,439 nM por mg de tejido, respectivamente). En pulmón los valores de concentración fueron muy bajos (media de concentración de PcAlCl: 0,825 nM por mg de tejido) y en los demás órganos no se presentó concentración de PcAlCl. De igual forma, no se registró concentración de PcAlCl en ningún grupo experimental después de la aplicación de V1 y V2 ni en los animales que no recibieron tratamiento. La piel distante del sitio de aplicación (piel no tratada) tampoco presentó concentración del compuesto. En animales con lesiones inducidas quirúrgicamente (Figura 38 B) los valores más altos de concentración de PcAlCl registrados después de aplicar la F1 se presentaron en E+D de piel tratada (media de concentración de PcAlCl: 63,836 nM por mg de tejido) seguidos por los valores de concentración de PcAlCl registrados en pulmón (media de concentración de PcAlCl: 20, 333 nM por mg de tejido). En EC de la piel tratada se registraron valores bajos de concentración de PcAlCl (media de concentración de PcAlCl: 5,938 nM por mg de tejido). En los demás órganos se presentaron valores más bajos de concentración del FS, en orden descendente: hígado (media de concentración de PcAlCl: 5,803 nM por mg de tejido), bazo (media de concentración de PcAlCl: 4,433 nM por mg de tejido), corazón (media de concentración de PcAlCl: 4,340 nM por mg de tejido), cerebro (media de concentración de PcAlCl: 1,984 nM por mg de tejido) y riñón (media de concentración de PcAlCl: 1,580 nM por mg de tejido). Después de la aplicación de F2 los valores más elevados de concentración de PcAlCl también se registraron en E+D seguidos por pulmón (media de concentración de PcAlCl: 19,080 y 1,921 nM por mg de tejido, respectivamente). En EC los valores de concentración fueron bajos (media de concentración de PcAlCl: 4,067 nM por mg de tejido). En los demás órganos no se presentó concentración de PcAlCl después de aplicar la F2. No se registró concentración de PcAlCl en ningún grupo experimental después de la aplicación de V1 y V2 ni en los animales que no recibieron tratamiento. De igual forma en la piel distante del sitio de aplicación (piel no tratada) tampoco se presentó concentración del compuesto.

**Figura 38.** Distribución de PcAlCl en las capas de piel y en órganos de ratas Wistar con piel sana **(A)** y con piel con lesión quirúrgica inducida **(B)**, después de la aplicación de las formulaciones (F1 y F2) y de los vehículos de dichas formulaciones (V1 y V2). También se registran los animales del grupo control que no recibieron tratamiento. En EC y E+D se realizaron lecturas de concentración tanto en piel del sitio de aplicación de los tratamientos (piel tratada) como en piel distante de este sitio (piel no tratada).



De igual forma, se realizó el análisis estadístico de los datos de distribución segmentando dichos datos según las formulaciones aplicadas o el grupo experimental sin tratamiento. Al segmentar los datos y hacer más evidente el comportamiento de cada formulación aplicada, se confirma la no presencia de PcAlCl en capas de la piel ni en órganos después de aplicar los vehículos (V1 y V2) de cada formulación ni en el grupo experimental control que no recibió tratamiento.

## 5. DISCUSIÓN

En el contexto de la terapia fotodinámica es ideal que fotosensibilizadores como las ftalocianinas no presenten agregados en sus moléculas y tengan alta solubilidad en medios acuosos (Gerhardt *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2010). La agregación molecular, característica de estos compuestos afecta las propiedades de permeación celular y conlleva a la pérdida de su actividad fotoquímica (Allen *et al.*, 2001; Rossetti *et al.*, 2011). De esta forma, la acción fotodinámica de un compuesto FS está relacionada con su estado monomérico y en este estado juegan un papel muy importante los sistemas de liberación ya que deben mantener y entregar el FS al sitio terapéutico en esta forma (Rossetti *et al.*, 2011).

En el presente estudio se investigó el comportamiento de agregación de las moléculas de PcAlCl contenida en dos formulaciones diluidas en DMSO, etanol y PBS-SDS (2%) con el fin de determinar los efectos de estos solventes en el perfil de los espectros de emisión y absorción. Los perfiles de los espectros de un FS en diferentes solventes proporcionan información sobre el estado agregado o monómero de las moléculas de este compuesto (Rossetti *et al.*, 2011). Los espectros de absorción y emisión de un compuesto en estado agregado se caracterizan por presentar amplias bandas Q y Soret y débiles emisiones de fluorescencia respectivamente (Howe & Zhang, 1998; Rossetti *et al.*, 2011).

Los espectros de absorción de PcAlCl contenida en las formulaciones F1 y F2 disueltas en DMSO y etanol presentaron una sola banda Q estrecha, con un valor mayor de absorbancia en relación con la banda Soret de menor tamaño con un valor de absorbancia más bajo. Igualmente, las formulaciones diluidas en estos solventes orgánicos registraron fuertes emisiones de fluorescencia. Este es el perfil típico de las ftalocianinas en estado monomérico o no agregado. El espectro de absorción del compuesto en F1 y F2 diluidas en PBS-SDS (2%) presentó un

perfil diferente respecto al observado con solventes orgánicos. Se presume que al utilizar la solución tampón para diluir las formulaciones de PcAlCl se presentó baja solubilidad o estado agregado de las moléculas del compuesto lo cual se reflejó en el espectro de absorción por la presencia de picos con bajos niveles de absorbancia en la banda Q. Igualmente, se registraron bandas Soret en estos espectros. En el espectro de emisión de fluorescencia de las formulaciones de PcAlCl diluidas en PBS-SDS (2%) se observaron dos picos de diferente tamaño y a diferentes longitudes de onda. En el comportamiento de este espectro se pueden resaltar dos aspectos: en primer lugar, la presencia de dos bandas, una de mayor intensidad de fluorescencia que corresponde al estado monomérico de las moléculas del compuesto y una banda de menor intensidad de fluorescencia correspondiente a las moléculas dentro de agregados. Así, la intensidad de la banda monómero es más alta comparada con la intensidad de fluorescencia de la banda derivada de moléculas en estado agregado (Rauf *et al.*, 2012). El segundo aspecto observado en este espectro es el cambio en la posición de la banda que presentó mayor intensidad de fluorescencia. Esta banda en los solventes orgánicos se presentó a 680 nm mientras que en PBS-SDS (2%) se desplazó hasta 730 nm. El cambio en la posición de la banda de emisión de fluorescencia en diferentes solventes indica que la longitud de onda de emisión es sensible a factores ambientales de los solventes. Por ejemplo al utilizar solventes con mayor polaridad, las bandas de emisión se desplazan en el espectro aumentando el valor de longitud de onda (Rossetti *et al.*, 2011; Rauf *et al.*, 2012).

Las formulaciones F1 y F2 tenían concentraciones diferentes, lo cual se hizo con el fin de analizar la influencia de la concentración del FS en el perfil de los espectros. La F1 con mayor concentración de PcAlCl presentó picos más elevados de absorbancia en los solventes orgánicos con respecto a la F2 con menor concentración, sin embargo el perfil del espectro de absorción se conservó: presencia de bandas Soret y bandas Q. Tanto la F1 como la F2 con diferencias de concentración del FS registraron iguales niveles de absorbancia al ser diluidas en

la solución tampón, sin embargo estos niveles fueron muy bajos respecto a los espectros de absorción antes mencionados. En cuanto a la intensidad de fluorescencia se registraron niveles de emisión muy cercanos en las dos formulaciones diluidas en los solventes orgánicos a pesar de tener diferente concentración. Al diluir las formulaciones en PBS-SDS (2%) las dos formulaciones presentaron el mismo espectro de emisión.

La observación de bandas Q estrechas y agudas y bandas Soret de menor tamaño en los espectros de absorción y fuertes emisiones de fluorescencia en los espectros de emisión realizados en la presente investigación sugiere que la PcAlCl se encontró principalmente en forma de monómero cuando estuvo incorporada en las formulaciones 1 y 2 diluida en solventes orgánicos, esta es una condición importante de un fotosensibilizador respecto a su utilidad en terapia fotodinámica (Rossetti *et al.*, 2011). En estudios espectroscópicos realizados, analizando el comportamiento de ftalocianinas incorporadas en sistemas de liberación comparado con su comportamiento en solventes se ha demostrado la capacidad de los sistemas de nano-partículas para mantener el estado monomérico de las ftalocianinas (Sibata *et al.*, 2004; Rossetti *et al.*, 2011). De esta forma, las formulaciones 1 y 2 presentaron eficacia en el mantenimiento de la solubilidad y en la protección contra la auto-agregación de moléculas de PcAlCl.

Aparte de mantener un FS en estado monomérico y realizar su entrega al sitio terapéutico en esta misma forma, los potenciadores de la permeación contenidos en formulaciones tópicas o los sistemas de liberación eficaces en TFD, deben efectuar dicha entrega en el sitio específico, sobrepasando algunas barreras como el EC, cuando este sitio específico se encuentra en las capas viables de la piel. La eficacia de la TFD en el tratamiento de lesiones de la piel mediante aplicación tópica está relacionada principalmente con la capacidad del vehículo en el cual se aplica el compuesto para optimizar la permeación a través del EC hasta el sitio

terapéutico, favoreciendo la localización y la distribución homogénea del FS en el tejido (Rossetti *et al.*, 2011).

El EC actúa como una estructura de barrera altamente organizada la cual limita la entrada de sustancias hacia las capas viables de la piel (Williams & Barry, 2004). Varios estudios se han centrado en diferentes estrategias, métodos y formulaciones que permitan superar la función de barrera y mejorar la permeación de compuestos (El Maghraby, 2008a; Kogan & Garti, 2006). Generalmente, los FS como las ftalocianinas no penetran el EC y como consecuencia deben ser entregados en una formulación tópica que permita el acceso a las capas de la piel (Rossetti *et al.*, 2011). Con el fin de superar estas limitantes se hizo necesario el desarrollo de dos formulaciones que incluyeran en su composición potenciadores de permeación como sulfóxidos y surfactantes, y vehículos o sistemas de liberación como nanoemulsiones que mejoraran la penetración de PcAlCl a través del EC y su acceso a las capas viables de la piel de ratas Wistar.

Estas formulaciones aplicadas en ensayos de permeación *ex vivo* no registraron presencia de PcAlCl en el medio receptor de las celdas, lo cual puede ser considerado como un resultado positivo con influencia de los componentes de las dos formulaciones. Este resultado también se relaciona con el objetivo de la TFD tópica que procura aumentar la permeación del FS a través del EC hacia las capas viables de la piel causando allí su retención y evitando la absorción sistémica que puede causar una fotosensibilización generalizada (Rossetti *et al.*, 2011). Además, para las enfermedades cutáneas es indispensable una mayor permeación del EC y una adecuada bioacumulación del compuesto en las capas de la piel que sean blanco o sitio terapéutico para lograr terapias efectivas (Primo *et al.*, 2008).

La absorción dérmica y transdérmica de compuestos es un proceso multifactorial que involucra varios pasos, los cuales se ven afectados por un gran número de factores como: la fuente animal y el tipo de piel, propiedades fisicoquímicas del

compuesto utilizado en el estudio y de sus respectivos sistemas de liberación así como también el pre-tratamiento de la piel, factores ambientales (Godin & Touitou, 2007) y la relación membrana/medio receptor en el sistema *ex vivo* utilizado (Wagner *et al.*, 2000). La piel utilizada como membrana en el presente estudio presentó características macroscópicas y microscópicas de una piel normal. Todos los animales a partir de los cuales se obtuvo la piel presentaron características de peso, edad y condiciones de mantenimiento similares. Igualmente en la totalidad de los ensayos se utilizó piel extraída del dorso de los animales para evitar variaciones. Debido a que las variables relacionadas con el manejo de la piel fueron controladas en el desarrollo del estudio, la razón por la cual la PcAlCl no alcanzó el medio receptor se puede explicar en primer lugar mediante la ocurrencia de algunos fenómenos relacionados con la composición de las formulaciones. La concentración de los surfactantes y co-surfactantes y sus posibles mezclas en las formulaciones juega un papel importante en la administración transdérmica de compuestos. Los surfactantes con mayor concentración mejoran la penetración de compuestos hidrófilos pero no de compuestos lipófilos. (Hosmer *et al.*, 2009). El contenido de la fase acuosa en los sistemas de liberación influye en la permeación y difusión de compuestos a través de las capas más profundas de la piel, dependiendo del carácter lipófilo o hidrófilo de dichos compuestos (Rossetti *et al.*, 2011). En segundo lugar, la no presencia de PcAlCl en el medio receptor se puede explicar mediante algunas características de la piel (no de su manejo) y del ensayo *ex vivo* como tal que nos son controlables. La falta de microcirculación dérmica en el experimento de permeación *ex vivo* podría haber impedido la difusión del compuesto a través de las capas más profundas de la piel y dentro de la fase receptora (Godin & Touitou, 2007). Por otra parte, al utilizar el grosor completo de la piel (EC, E y D) la polaridad de cada capa influye en el flujo de un compuesto dependiendo a su vez, de la polaridad de este y de su sistema de liberación. El EC es un medio lipofílico y la dermis un medio hidrofílico (Wagner *et al.*, 2001), por esta razón un compuesto

lipofílico como la PcAlCl tiene variación en el flujo de difusión a través de las diferentes capas de la piel alterando su perfil de permeación.

Al observar las características macroscópicas y microscópicas de la piel al finalizar los ensayos de permeación (12 y 24 horas) se observó daño mecánico ejercido por la pinza que mantiene unidas las dos cámaras de las celdas de Franz y daño fisiológico posiblemente ocasionado por la sobre-hidratación de la piel debido al contacto con el medio receptor de las celdas durante el periodo de tiempo de los ensayos. Estos efectos pudieron tener influencia en los resultados obtenidos de permeación. El daño mecánico se traduce principalmente en disminución del epitelio tanto en número como en tamaño celular, en daño o pérdida de EC y compactación del tejido conectivo irregular en dermis. Posiblemente, se presentó un aumento de la hidratación de la piel utilizada en los ensayos de permeación por entrada de agua en la membrana desde el medio receptor hacia las capas más profundas de la piel, lo cual se presenta en dirección opuesta a la entrada del compuesto desde las cámaras donadoras hacia este mismo sitio. Tanto la solución acuosa del compartimento receptor (PBS-SDS (2%)) como las formulaciones del compuesto del medio donador se obstaculizan mutuamente y actúan como una barrera, proceso que puede explicar la no presencia de PcAlCl en el medio receptor de estos ensayos. Esta situación refleja la interacción entre el medio receptor y su afectación a la piel utilizada como membrana (Wagner *et al.*, 2000).

Los procesos que ocurren en el transporte de compuestos a través de la piel y los factores de los cuales depende dicho transporte se han descrito bajo las ecuaciones planteadas en la ley de difusión de Fick. Al tener como base estas leyes, se han derivado modelos matemáticos que describen la absorción percutánea como un proceso de difusión pasiva en las capas de las membranas. Las leyes de difusión de Fick relacionan la cantidad de soluto que traspasa el área de la membrana durante un periodo de tiempo con una concentración constante del gradiente, de igual forma, tienen en cuenta el coeficiente de difusión de la piel

y su longitud (Mitragotri *et al.*, 2011). En estudios realizados por Primo *et al.*, (2007), utilizaron una nanoemulsión magnética como sistema de administración de Foscan® y observaron el comportamiento de este sistema de liberación en cuanto a permeación y retención en ensayos *in vitro*. El perfil de permeación se obtuvo con base en el tiempo de permeación y la cuantificación fue realizada por espectroscopía de fluorescencia. El proceso difusional de la piel, en este estudio fue relacionado con la ley de Fick. Wagner *et al.*, (2001), realizaron un estudio para determinar permeación *in vitro* de ácido flufenámico en diferentes concentraciones en membranas de piel. En estos estudios también aplicaron las leyes de Fick con el fin de hallar el coeficiente de difusión de los compuestos analizados en las respectivas membranas de piel utilizadas. Según el objetivo del estudio de permeación es conveniente la aplicación de estas leyes, especialmente cuando el fin es la entrada de los compuestos en las capas más profundas de la piel y por consiguiente en el medio receptor de las celdas de difusión utilizadas en estudios de liberación transdérmica.

Aunque en el ensayo *ex vivo* realizado no se dio permeación de PcAlCl a través de las capas de la piel hacia el medio receptor de las celdas de Franz y por consiguiente, no fue posible hallar su coeficiente de difusión en piel de ratas Wistar, si se observaron concentraciones de este FS retenido en las capas de la piel: estrato córneo y epidermis más dermis. La retención de PcAlCl en piel, demuestra la eficacia de los sistemas de liberación y potenciadores de la permeación utilizados en las dos formulaciones para permear la barrera de la piel y mantener acumulado el compuesto.

El perfil de retención de PcAlCl presentó diferencias en cuanto a las capas de piel, la formulación aplicada en las cámaras donadoras y el tiempo final de los ensayos. El comportamiento observado en EC y E+D después de utilizar la F1 posiblemente es debido a una rápida permeación a través del EC facilitado por los potenciadores presentes en esta formulación (DMSO y Tween 80) en las primeras

horas del ensayo. Este comportamiento hace que se de una inversión del perfil en la hora 24 en la que se presentó mayor concentración del compuesto en EC y menor concentración en E+D. Es probable que se haya dado una sobresaturación en E+D debido a la rápida permeación de la F1 desde el EC proceso que hace más activo el estado termodinámico de la PcAICI en estas capas de la piel (Williams & Barry, 2004). En esta preparación, la PcAICI se diluyó en una solución que contenía dos potenciadores de la permeación en membranas: DMSO y Tween 80. El DMSO es un compuesto químico, polar que combinado con otras sustancias facilita la difusión a través del EC y favorece la formación de depósitos en las capas más profundas de la piel (Kyriazi *et al.*, 2008). En una variedad de estudios se ha demostrado la eficacia del DMSO como ayudante en la permeación de compuestos hidrofílicos y lipofílicos como agentes antivirales, esteroides y antibióticos. Este solvente causa desnaturalización de proteínas y cambia la conformación de queratina intercelular, también se ha demostrado que interactúa con dominios de lípidos intercelulares del EC. Además, el DMSO dentro de las membranas de piel puede facilitar la partición de compuestos de una formulación dentro del tejido (Williams & Barry, 2004). Por otra parte, el Tween 80 es un surfactante, agente tensoactivo no iónico utilizado como excipiente farmacéutico, considerado no tóxico y no irritante (Kyriazi *et al.*, 2008). Los surfactantes son moléculas que se añaden a las formulaciones con el fin de solubilizar ingredientes activos lipofílicos. Los tensoactivos no iónicos mejoran el flujo de fármacos a través de membranas biológicas y pueden alterar la actividad termodinámica de un fármaco en el vehículo, también pueden modificar las fuerzas de difusión y partición en el tejido, lo cual facilita la absorción de un compuesto en la piel. Después de utilizar la F2 en la hora 12 hubo mayor concentración del compuesto retenido en EC en comparación con la concentración registrada en E+D, este perfil es contrario al registrado después de utilizar la F1. Con la F2 se presentó una liberación más lenta del compuesto hacia las capas más profundas de la piel por medio del sistema de liberación utilizado (nanoemulsión). En la hora 24 fue

disminuyendo lentamente la concentración del compuesto en EC con relación a la hora 12 y de igual forma aumentó lentamente la concentración del FS en E+D.

El comportamiento observado en la retención de PcAlCl en las capas de la piel con la F2 que refleja un leve aumento en la concentración del FS en E+D a medida que avanza el tiempo se puede explicar mediante la estructura intrínseca de la formulación. La F2 es una nanoemulsión en cuya estructura se presentaron pequeñas gotas o esferas formadas por la unión de una fase oleosa compuesta de fosfatidilcolina, cloroformo, PcAlCl y ácido oleico y una fase acuosa que contenía agua tipo I, glicerol y Tween 20. A partir de estas gotas o esferas que después de varios procesos de preparación mantienen contenido en su interior el FS, se permite una liberación lenta de este en las capas de la piel al lograr vencer la barrera del EC (Podlogar *et al.*, 2005). El mecanismo por el cual una nanoemulsión penetra la barrera de la piel y se mantiene retenida en las capas más profundas de esta se basa en su capacidad de alterar las vías lipídicas y polares de esta membrana (Sanjula *et al.*, 2007). El compuesto disuelto en la fase oleosa de la nanoemulsión puede permear directamente los lípidos del EC mediante la desestabilización de la estructura de bicapa. Por otra parte, el dominio hidrofílico de la nanoemulsión puede hidratar el EC en mayor medida favoreciendo la permeación. El fluido acuoso de las nanoemulsiones incrementa el volumen interlaminar de la bicapa lipídica del EC lo cual conlleva a la interrupción de su estructura interfacial. El tamaño de las esferas de la nanoemulsión también puede afectar la permeación, siendo las esferas de menor tamaño excelentes vehículos para mejorar la penetración de compuestos en las capas de la piel. En este caso de estudio la razón por la cual la PcAlCl permeó la piel y se retuvo liberándose lentamente en ella parece ser el incremento de la permeación a través de vías no polares causado por el ácido oleico, aumentando también la difusión y la partición. En un estudio realizado por Larrucea *et al.*, (2001), se determinó la eficacia del ácido oleico como potenciador de permeación en formulaciones tópicas y excelente liberador de compuestos hacia la superficie de la piel mejorando la

permeación hacia las capas más profundas de esta membrana. La fase acuosa también jugó un papel importante hidratando el EC como se mencionó antes. De igual forma, el glicerol pudo alterar la estructura de la piel y permearla llevando también moléculas del compuesto hacia las capas viables (Abu-Elyazid *et al*, 2011).

Como se indicó en el ensayo de permeación, el medio receptor de las celdas de Franz ejerció un efecto en la piel utilizada como membrana, de igual forma este efecto también pudo influenciar la retención de PcAlCl en las capas de la piel. Durante el periodo de tiempo de duración de los ensayos (12 y 24 horas) el medio acuoso (medio receptor: PBS-SDS (2%)) y las moléculas del FS permean hacia las capas más profundas de la piel en direcciones opuestas, este flujo en dos direcciones puede obstaculizar mutuamente la permeación y actuar como barrera (Wagner *et al.*, 2000), lo que explica la lenta tasa de retención en las capas más profundas de la piel al utilizar la F2. En horas posteriores la hidratación de la piel conduce a un aumento de fluidez en la bicapa de la membrana del EC (Alonso *et al.*, 2000). Una vez que las sustancias contenidas en el medio receptor alcanzan el EC se presenta un cambio en el grado de disociación de los ácidos grasos, lo cual influye en la solubilidad de las formulaciones de PcAlCl penetrantes. También se pueden dar cambios en la capacidad tampón de la piel y su pH. Dependiendo de las propiedades del compuesto en estudio, puede aumentar su solubilidad y pueden tener lugar cambios en el equilibrio de distribución como resultado de la disociación de las moléculas de dicho compuesto. Estos cambios conducen a un aumento de velocidad de difusión del compuesto desde el EC y a concentraciones más altas de este en el tejido como se observa a la hora 12 después de utilizar la F1 y en el aumento de concentración en E+D en la hora 24 después de utilizar la F2 de PcAlCl. Así, se sugiere que la piel en las primeras horas del ensayo está completamente hidratada lo cual impide la permeación de compuestos a través de ella (impedimento por agua), pero la tasa de permeación y retención aumenta con periodos de tiempo de ensayo más largos (24 horas) (Wagner *et al.*, 2000).

En los ensayos de permeación y retención al utilizar el vehículo de las formulaciones 1 y 2, los resultados mostraron la no presencia de PcAlCl tanto en el medio receptor de las celdas de Franz como en las capas de la piel EC y E+D. Con estos resultados se demuestra que ninguna molécula biológica de la piel y ningún compuesto presente en las formulaciones F1 y F2, afectó la medida de fluorescencia y concentración de PcAlCl en el desarrollo de los ensayos.

La investigación del destino *in vivo* (ratas Wistar) de PcAlCl en F1 y F2 se llevó a cabo en este estudio para evaluar la capacidad de retención y/o distribución del FS dependiendo del estado de la piel en el sitio de aplicación. Así, los ensayos *in vivo* de distribución mostraron algunas variaciones en animales con piel sana y en animales con lesiones quirúrgicas inducidas en piel, después de aplicar tópicamente las formulaciones y sus respectivos vehículos.

La distribución del FS en animales con piel sana o normal se limitó a las capas de la piel en el sitio de administración de las formulaciones (piel tratada) y en menor concentración al pulmón. Con la F1 se observaron diferencias en cuanto a la concentración de PcAlCl en EC con respecto a E+D, en esta última capa se presentó un valor de concentración seis veces mayor que la concentración registrada en EC. Los valores de concentración de PcAlCl distribuida hacia las capas más profundas de la piel es un importante resultado en esta investigación en términos de utilidad clínica de TFD utilizando este compuesto. La distribución del FS dentro de la piel y su localización en las capas viables es un evento importante para una TFD tópica efectiva (Rossetti *et al.*, 2011). En trabajos *in vivo* realizados por Kyriazi *et al.*, (2008) con PcAlCl en solución y Rossetti *et al.*, (2011) con PcZnSO<sub>4</sub> en nanoemulsión, se encontraron concentraciones considerables de los respectivos compuestos en las capas más profundas de la piel de animales con piel normal. En el presente caso de estudio, el perfil de distribución de PcAlCl contenida en la F1 en las capas de la piel, puede atribuirse a la capacidad de los potenciadores de la permeación contenidos en la

formulación para traspasar el EC y mejorar la retención cutánea en las capas más profundas de la piel, lo cual se analizó en el ensayo *ex vivo*.

Después de aplicar la F2 el comportamiento de distribución en las capas de la piel fue similar, sin embargo los valores de concentración fueron 5 y 6 veces más bajos que los registrados en EC y E+D respectivamente después de aplicar la F1. Este perfil de distribución en las capas de piel es debido a la naturaleza de la nanoemulsión, la cual realiza una liberación más lenta del compuesto y a la concentración de PcAICI contenida en esta formulación, la cual es más baja respecto a la concentración de la F1.

En este ensayo, utilizando animales con piel sana y después de la aplicación del tratamiento por vía tópica sólo se registró distribución de PcAICI en el pulmón de la totalidad de animales a los cuales se aplicó tanto la F1 como la F2, estos valores fueron muy bajos comparados con los valores registrados en piel. Debido a que no se registró presencia de PcAICI en los demás órganos analizados, se presume que el compuesto haya sido inhalado por los animales en el sitio de aplicación de las formulaciones, lo cual fue observado en el momento del manejo y aplicación de tratamientos y durante el seguimiento realizado.

Contrario a las características microscópicas y macroscópicas de la piel de animales sanos y al comportamiento de dicha piel después de aplicar tópicamente las formulaciones de PcAICI, en una piel con daño en sus capas como el observado en leishmaniasis cutánea se presenta un infiltrado celular compuesto principalmente por macrófagos vacuolados en la dermis con amastigotes en su interior y otras células inflamatorias que invaden esta capa de la piel originando pérdida de estructuras anexiales (Moskowitz & Kurban, 1999); en animales con este tipo de piel, es indispensable que la PcAICI se localice en las capas viables y que además no presente distribución hacia órganos internos. Cuando se desarrolla la infección, además del daño en dermis, también se presenta daño o

atrofia en los estratos de la epidermis, originando la formación de una úlcera desprovista de la capa barrera de la piel, el EC. Al inducir una lesión quirúrgica con daño en las capas de la piel y después de aplicar las formulaciones de PcAlCl se encontró que la distribución fue dependiente de la concentración de dicho compuesto en estas formulaciones. También se determinó que las formulaciones 1 y 2 aplicadas no tuvieron relación con la cura de la lesión, esta remisión se dio de manera similar en la totalidad de los animales de los grupos experimentales utilizados en el desarrollo del experimento (animales a los cuales se les aplicó: formulaciones, vehículos de las formulaciones y animales sin tratamiento).

La distribución de PcAlCl en las capas de piel de animales con lesión inducida presentó un perfil similar al observado en piel de animales con piel sana. Fue mayor la concentración del FS retenida en EC y en E+D después de la aplicación de la F1 respecto a la F2, también fue mayor la concentración de PcAlCl retenida en E+D en comparación con la concentración retenida en EC después de la aplicación de las dos formulaciones. Sin embargo, en comparación con los animales con piel sana, en animales con lesión inducida estos valores de retención en las capas de la piel después de aplicar la F1 fueron mas bajos, posiblemente debido a la distribución del compuesto hacia órganos internos. Mientras que, después de aplicar la F2 en animales con lesión las concentraciones observadas en EC y en E+D fueron un poco más bajas pero similares a las concentraciones observadas en animales con piel sana en las dos capas de la piel.

En cuanto a distribución de PcAlCl en órganos de ratas Wistar con lesiones inducidas, después de aplicar la F1, el FS fue capturado por el pulmón, hígado, bazo, corazón, cerebro y riñón (con valores de concentración mínimamente detectables). En cuanto al pulmón, la concentración registrada posiblemente se debe a la inhalación del sitio de aplicación observada en el seguimiento a los animales y a la alta concentración de PcAlCl en la F1. Tras la inhalación, las

partículas del compuesto son liberadas desde los potenciadores de la permeación contenidos en la formulación y penetran el pulmón. La cantidad de deposición de un compuesto inhalado en los pulmones es variable y depende de la velocidad del flujo inspiratorio (Young *et al.*, 2002). Esta razón de inhalación por vía respiratoria de igual forma pudo ser la causa de distribución de PcAlCl en el pulmón de animales con lesiones inducidas después del tratamiento con F2, ya que no se registró concentración del compuesto en los demás órganos analizados en estos animales con el tratamiento.

En los ensayos de distribución de PcAlCl en órganos de ratas Wistar, es evidente en primer lugar, que la concentración del compuesto en las formulaciones aplicadas está directamente relacionada con el proceso de distribución, a mayor concentración de PcAlCl en las formulaciones, mayor concentración en capas de la piel y en órganos de los animales analizados. Con el desarrollo de los ensayos *in vivo*, se determinó la importancia del estado de la piel en la distribución de PcAlCl. En animales con piel sana, se evidenció claramente, la retención en las capas de piel y la no distribución hacia órganos después de la aplicación de las dos formulaciones con diferente concentración de PcAlCl. En animales con lesiones inducidas que simulan un daño a nivel de capas de la piel respecto a lo que sucede en la LC, se observó que al aplicar una formulación con baja concentración del compuesto igual que en animales con piel sana, este se mantiene retenido la piel, que en el momento del análisis está en un proceso de regeneración y reparación celular y estructural. En estos mismos animales con piel lesionada, al aplicar una formulación de concentración más elevada se observa retención del compuesto en capas de la piel y además distribución hacia los órganos: pulmón, hígado, bazo, corazón, cerebro y riñón. Este resultado indica que las capas de la piel ejercen protección mediante la retención del compuesto evitando su distribución hacia el interior del organismo, y a su vez los componentes de las formulaciones juegan un papel muy importante en esta retención. Los resultados de este trabajo sugieren que la F2 con su respectiva

concentración de PcAlCl, posee un sistema de liberación eficaz para ser aplicada tópicamente debido a su capacidad para retener el FS en las capas viables de la piel, aun cuando estas capas presenten un daño. Además de la elevada concentración del compuesto retenido en la piel, la ausencia de distribución en órganos también es deseable y se logra con esta formulación.

La PcAlCl no fue detectada en piel ni órganos de animales a los cuales se les aplicó tópicamente los vehículos de las formulaciones ni en animales que no recibieron ningún tratamiento. Este resultado confirma que no hubo moléculas biológicas tanto en piel como en órganos de ratas Wistar ni en los respectivos extractos de las muestras en los solventes utilizados en el estudio que afectaran la medida de fluorescencia de PcAlCl. También es de gran importancia señalar la no presencia de PcAlCl en las muestras de piel tomadas de un lugar distante del sitio de aplicación de los tratamientos, (denominación en el estudio: piel no tratada) analizadas mediante fluorimetría, lo cual indica que la aplicación tópica de PcAlCl en F1 y en F2 no presenta riesgo de una subsecuente fotosensibilidad generalizada (Kyriazi *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta que el presente estudio es la base para el desarrollo y la aplicación de TFD tópica con PcAlCl, se puede determinar como efecto positivo para estudios posteriores la acumulación del FS en las capas viables de la piel, ya que la localización y la concentración en el sitio terapéutico son principios fundamentales de esta terapia. De igual forma, la eficacia radica en la seguridad del tratamiento al disminuir los riesgos de distribución generalizada de un FS (Peng & Moan, 1995).

## 6. CONCLUSIONES

El presente trabajo hace un aporte significativo a la investigación de la PcAlCl para ser utilizada como alternativa terapéutica en LC. Este aporte de conocimiento del FS radica en la determinación de su comportamiento en cuanto a permeación y retención en las capas de la piel y en cuanto a distribución desde las capas de la piel hacia otros órganos a partir de la aplicación de formulaciones tópicas optimizadas.

Las formulaciones utilizadas en el presente estudio (solución y nanoemulsión) fueron eficaces en el mantenimiento de la solubilidad y en la protección contra la auto-agregación de moléculas de PcAlCl.

Al no presentarse permeación de PcAlCl hacia el medio receptor, se concluye que el comportamiento de este FS brinda seguridad si se compara este medio con la circulación en un organismo, lo cual indica que no se presentaría absorción sistémica que pueda causar una fotosensibilidad generalizada. En el tratamiento de LC este comportamiento es ideal, ya que en esta enfermedad se requieren efectos locales.

La localización del FS se evidenció en los ensayos de retención. La PcAlCl en F1 y en F2 logró vencer la barrera del EC y mantenerse acumulada en las capas de la piel, esta acumulación fue dependiente de las características de las formulaciones de PcAlCl y del tiempo. El comportamiento de retención de la F1, generó una entrega más rápida del compuesto, mientras que el comportamiento de la F2 se caracterizó por una entrega de forma lenta y continua.

En el estudio de distribución de PcAlCl, la retención en las capas de la piel en el sitio de aplicación de las formulaciones y/o la posible distribución hacia los

órganos analizados fue dependiente del estado de la piel y de la formulación de PcAICI aplicada. Así, se concluye que la F2 fue una formulación eficaz que presentó mejor rendimiento *in vivo* por la ausencia de distribución de PcAICI en órganos y por su capacidad de retención en las capas viables de la piel aun cuando se presentó daño inducido.

Después de la evaluación de los parámetros de permeación, retención y distribución de PcAICI se mostró un comportamiento eficaz en cuanto a su localización en las capas de la piel. Se sugiere realizar ensayos en membranas de piel preparadas por diferentes métodos: eliminación de la dermis profunda, remoción de EC o pruebas sólo en EC con el fin de observar variaciones que permitan llegar a resultados más específicos respecto a la permeación y retención de PcAICI. De igual forma, estos ensayos pueden simular el comportamiento de una piel con lesiones como en el caso de LC.

También se sugiere realizar estudios de farmacocinética en modelos animales infectados con el parásito, con el fin de tener conocimiento base sobre la seguridad de la PcAICI al ser aplicada en un organismo vivo con estas condiciones.

Se recomienda realizar experimentos adicionales para determinar si otras concentraciones de PcAICI en las formulaciones pueden cambiar el comportamiento observado en este estudio.

El desarrollo de la presente investigación aporta la estandarización de metodologías en permeación, retención y distribución de PcAICI en piel, que son la base para el desarrollo de nuevos estudios en los que se vaya perfeccionando y optimizando el conocimiento referente a la aplicación tópica de PcAICI como posible FS utilizado en TFD para el tratamiento de LC.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

ABU-ELYAZID, S. K., A. A. Kassem, A. M. Samy & M. E. Gomaa, 2011: Evaluation of skin permeation and pharmacological effects of Tenoxicam nanoemulsion in topical formulations. *Asian J Pharm Hea Sci*, **1**, 99-105.

AHMED, M., W. Ramadan, D. Rambhu & F. Shakeel, 2008: Potential of nanoemulsions for intravenous delivery of rifampicin, *Pharmazie*, **63**, 806-811.

AKILOV O. E, S. Kosaka, K. O'Riordan & T. Hasan, 2007a: Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochem Photobiol Sci*, **6**, 1067-1075.

AKILOV O. E, S. Kosaka, K. O'Riordan & T. Hasan, 2007b: Parasiticidal effect of delta aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. *Exp Dermatol*, **16**, 651-660.

ALAVIJEH, M. S., M. Chishty, M. Zeeshan & A. M. Palmer, 2005: Drug Metabolism and Pharmacokinetics, the Blood-Brain Barrier, and Central Nervous System Drug Discovery. *Neuro Rx*, **2**, 554-571.

ALLEN, C. M., W. M. Sharman & J. E. Van Lier, 2001: Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *J Porphyr Phthalocyanines*, **5**, 161-169.

ALLISON, R. R., H. C. Mota & C. H. Sibata, 2006a: Clinical PD/PDT in North America: An Historical Review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, **4**, 263-277.

ALLISON, R. R., C. H. Sibata, G. H. Downie & R. E. Cuenca, 2006b: A clinical review of PDT for cutaneous malignancies. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, **3**, 214-226.

ALLISON, R. R. & C. H. Sibata, 2010: Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, **7**, 61-75.

ALONSO, A., N. C. Meirelles & M. Tabak, 2000: Lipid chain dynamics in stratum corneum studied by spin label electron paramagnetic resonance. *Chem Phys Lipids*, **104**, 101-111.

ASILIAN, A., A. Sadeghinia, G. Faghihi & A. Momeni, 2004: Comparative study of the efficacy of combined cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime<sup>®</sup>) vs. cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime<sup>®</sup>) alone for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, **43**, 281-283.

BALASUBRAMANIAN, S. K., J. Jittiwat, J. Manikandan, C. N. Ong, L. E. Yu & W. Y. Ong, 2010: Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials*, **31**, 2034-2042.

BEN-HUR, E., & I. Rosenthal, 1985: The phthalocyanines: a new class of mammalian cells photosensitizers with a potential for cancer phototherapy. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, **47**, 145-147.

BENET, L. Z. & and P. Zia-Amirhosseini, 1995: Basic Principles of Pharmacokinetics. *Toxicol Pathol*, **23**, 115-123.

BHATT, V. D., R. S. Soman, M. A. Miller & G. B. Kasting, 2008: Permeation of tecnazene through human skin in vitro as assessed by HS-SPME and GC-MS, *Environ Sci Technol*, **42**, 6587-6592.

BIOTERIO CENTRAL, (UIS), 2012: Manual de protocolos y procedimientos del Bioterio UIS. (29 p.). Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander: Bucaramanga.

BOUWSTRA, J. A., A. de Graaff, G. S. Gooris, J. Nijse, J. W. Wiechers & A. C. van Aelst, 2003: Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels, *J Invest Dermatol*, **120**, 750-758.

BRAIN, K. R., K. A. Walters & A. C. Watkinson, 1998: Investigation of skin permeation in vitro. In: Roberts, M. S. & K. A. Walters (Eds.), *Dermal absorption and toxicity assessment*. (Vol. 91, p.p.: 161-187). Marcel Dekker: New York.

BRASSEUR N., H. Ali, R. Langlois & J. E. Van Lier, 1988: Biological activities of phthalocyanines-IX. Photosensitization of V-79 chinese hamster cells and EMT-6 mouse mammary tumor by selectively sulfonated zinc phthalocyanines. *J Photochem Photobiol B*, **47**, 705-711.

BRAZIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. (2ª edição). Brasília. DF. Brasil.

BRISTOW, C. A., R. Hudson, T. A. Paget & R. W. Boyle, 2006: Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous leishmaniasis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, **3**, 162-167.

BRONAUGH, R. L., 2004: Methods for in vitro skin metabolism studies. In: Zhai, H. & H. I. Maibach (Eds.) *Dermatotoxicology*, 6th ed. (p.p.: 622-630). CRC Press: New York.

CALVOPINA, M., E. A. Gómez, H. Uezato, H. Kato, S. Nonaka & Y. Hashiguchi, 2005: Atypical clinical variants in New World cutaneous leishmaniasis: disseminated, erysipeloid, and recidiva cutis due to *Leishmania (V.) panamensis*. *Am J Trop Med Hyg*, **73**, 281-284.

CASTANO, A. P., T. N. Demidova & M. R. Hamblin, 2004: Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, **1**, 279-293.

CASTANO, A. P., T. N. Demidova & M. R. Hamblin, 2005: Mechanisms in photodynamic therapy: part three- photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of destruction. *Photodiag Photodynam Ther*, **2**, 91-106.

CHAN, W.-S., N. Brasseur, C. La Madeleine, R. Ouellet & J.E. van Lier, 1997: Efficacy and mechanism of aluminium phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours. *Eur J Cancer*, **33**, 1855-1859.

CLOUGH, G. F., P. Boutsouki, M. K. Church & C. C. Michel, 2002: Effects of blood flow on the in vivo recovery of a small diffusible molecule by microdialysis in human skin, *J Pharmacol Exp Ther*, **302**, 681-686.

COLOMBIA. CONGRESO DE LA REPÚBLICA, 1989: Ley 84. Por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales, se crean unas

contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. (p.p.: 1-15). Diario Oficial No. 39120: Bogotá, D. E.

COLOMBIA. MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL, 2008: Programa de apoyo a la reforma de salud (PARS). Guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública: Guía 21: Guía de atención de la Leishmaniasis, (pp.:176-213).

COLOMBIA. MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL. Dirección General de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Sub-dirección de vigilancia y control en salud pública. SIVIGILA. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica No. 50, 2010: Enfermedades transmitidas por Vectores.

COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD, 1993: Resolución 008430. Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. (21 p.). El ministerio: Santafé de Bogotá, D.C.

COMISIÓN EUROPEA, 2005: European technology platform on nanomedicine. Nanotechnology for Health. Vision Paper and Basis for a Strategic Research Agenda for Nanomedicine.

CRANK, J., 1975: The mathematics of diffusion. Oxford, Clarendon Press.

CROFT, S. L. & G. H. Coombs, 2003: Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*, **19**, 502-508.

CROFT, S. L., K. Seifert & V. Yardley, 2006: Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res*, **123**, 399-410.

DAGAN, Ron, 2007: The use of pharmacokinetic/pharmacodynamic principles to predict clinical outcome in paediatric acute otitis media. *J Antimicrob Agents*, **30**, 127-130.

DAVIS, A. F., 2008: Getting the dose right in dermatological therapy. In: Walter, K. A. & M. S. Roberts (Eds.), *Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development: Therapeutic and Novel Approaches*. (p.p.: 197-213). Informa Healthcare: New York, 2008.

DENET, A. R., R. Vanbever & V. Preat, 2004: Skin electroporation for transdermal and topical delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **56**, 659-674.

DESCOTEAUX, A. & S. J. Turco, 1999: Glycoconjugates in Leishmania infectivity. *Biochim Biophys Acta*, **1455**, 341-352.

DOUGHERTY, T. J., C. J. Gomer, B. W. Henderson, *et al*, 1998: Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 889-905.

DUMMER, R., M. Krasovec, J. Roger, H. Sindermann, G. Burg, 1993: Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study. *J Am Acad Dermatol*, **29**, 963-970.

DUTTA, S., D. Ray, B. K. Kolli & K. P. Chang, 2005: Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminum phthalocyanine chloride for photolysis in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 4474-4484.

EL MAGHRABY, G. M., 2008a: Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants. *Int J Pharm*, **355**, 285-292.

EL MAGHRABY, G. M., B. W. Barry & A. C. Williams, 2008b: Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci*, **34**, 203-222.

EL-ON, J., G. P. Jacobs, E. Witztum & C. L. Greenblatt, 1984: Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals. *Antimicrob Agents Chemother*, **26**, 745-751.

ENK, C. D., C. Fritsch, F. Jonas, A. Nasereddin, A. Ingber, C. L. Jaffe, *et al.*, 2003: Treatment of cutaneous leishmaniasis with photodynamic therapy. *Arch Dermatol*, **139**, 432-434.

ESCOBAR, P., I. P. Hernández, C. M. Rueda, F. Martínez & E. Páez, 2006: Photodynamic activity of aluminum (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania promastigotes*. *Biomédica*, **26**, 49-56.

FASOLO, D., L. Schwingel, M. Holzschuh, V. Bassani & H. Teixeira, 2007: Validation of an isocratic LC method for determination of quercetin and methylquercetin in topical nanoemulsions. *J Pharm Biomed Anal*, **44**, 1174-1177.

FRANKENBURG, S., D. Glick, S. Klaus & Y. Barenholz, 1998: Efficacious topical treatment for murine cutaneous leishmaniasis with ethanolic formulations of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**, 3092-3096.

Franklin, 2005: *The Laboratory Rat*. Second edition. (918 p.). Elsevier Science.

GARDLO, K., Z. Horska, C. D. Enk, L. Rauch, M. Megahed, T. Ruzicka, *et al.*, 2003: Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *J Am Acad Dermatol*, **48** (6), 893-896.

GARNIER, T. & S. L. Croft, 2002: Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Investig Drugs*, **3**, 538-544.

GARTNER, L. P. & J. L. Hiatt, 2007: Color Atlas of Histology. Ed. Medica Panamericana. Fourth edition. (pp.: 217-234).

GERHARDT, S. A., J. W. Lewis, D. S. Kliger, J. Z. Zhang & U. Simonis, 2003: Effect of micelles on oxygen-quenching processes of triplet-state para-substituted tetraphenylporphyrin photosensitizers. *J Phys Chem A*, **107**, 2763-2767.

GODIN, B. & E. Touitou, 2007: Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv Drug Deliv Rev*, **59**, 1152-1161.

GONZALES, J. M., M. López & G. Ruiz, 2006: Informe de vigilancia tecnológica: Nanomedicina. (pp.: 23-26). España.

GRIMALDI, G. & R. B. Tesh, 1993: Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*, **6**, 230-250.

GROEBER, F., M. Holeiter, M. Hampel, S. Hinderer & K. Schenke-Layland, 2011: Skin tissue engineering-In vivo and in vitro applications. *Adv Drug Deliv Rev*, **128**, 352-366.

GUREI, M. S., N. Tatli, H. Ozbilge, O. Erel, A. Seyrek, A. Kocyigit, *et al.*, 2000: Efficacy of cryotherapy and intralesional pentostam in treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Egypt Soc Parasitol*, **30**, 169-176.

GUY, R. H., V. H. W. Mak, T. Kai, D. Bommannan & R. O. Potts, 1990: Percutaneous penetration enhancers: mode of action. In: *Prediction of Percutaneous Penetration*. SCOTT, R. C., R. H. Guy & J. Hadgraft, Eds. (Vol. 1, p.p.: 213-223). IBC Technical Services: London.

HADGRAFT, J., 2001: Skin, the final frontier. *Int J Pharm*, **224**, 1-18.

HARHAY, M. O., P. L. Oliaro, D. L. Costa & C. H. Nery Costa, 2011: Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*, **27**, 403-409.

HEPBURN, N. C., 2000: Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol*, **25**, 363-370.

HERNANDEZ, G., A. Moreno, F. Zaragoza & A. Porras, 2010: Tratado de medicina farmacéutica. Hernandez, G. (Ed.). (864 p.), Ed. Medica Panamericana.

HERNÁNDEZ, I. P, 2010: Actividad fototóxica *in vitro* e *in vivo* de ftalocianina de aluminio clorada contra *Leishmania amazonensis*. Tesis de maestría no publicada. (110 p.) Universidad Industrial de Santander, Colombia.

HERWALDT, B. L., 1999: Leishmaniasis. *Lancet*, **354**, 1191-1199.

HOSMER, J., R. Reed, M. V. L. B. Bentley, A. Nornoo & L. B. Lopes, 2009: Microemulsions containing medium-chain glycerides as transdermal delivery systems for hydrophilic and hydrophobic drugs. *AAPS Pharm Sci Tec*, **10**, 589-596.

HOWE, L. & J. Z. Zhang, 1998: The effect of biological substrates on the ultrafast excited-state dynamics of zinc phthalocyanine tetrasulfonate in solution. *J Photochem Photobiol*, **67**, 90-96.

HOWES, D., R. Guy, J. Hadgraft, J. Heylings, U. Hoeck, F. Kemper, *et al.*, 1996: Methods for assessing percutaneous absorption. The report and recommendations of ECVAM workshop 13. *ATLA*, **24**, 81-106.

HUGES, G. A., 2005: Nanostructure-Mediated Drug Delivery. *Nanomedicine*, **1**, 23-30.

JAMOULLE, J. C. & H. Schaefer, 1993: Topical modalities. In: Fitzpatrick, T. B., A. Z. Eisen, K. Wolff, I. M. Freedberg & K. F. Austen, *Dermatology in general medicine*. Fourth edition. (Vol. II, p. p.: 2830-2845). McGraw Hill: New York.

KALLURI, H. & K. Banga, 2011: Formation and closure of microchannels in skin following microporation, *Pharm Res*, **28**, 82-94.

KIM, M. K., S. J. Chung, M. H. Lee, A. R. Cho & C. K. Shim, 1997: Targeted and sustained delivery of hydrocortisone to normal and stratum corneum-removed skin without enhanced skin absorption using a liposome gel. *J Control Release*, **46**, 243-251.

KOGAN A. & N. Garti, 2006: Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv Colloid Interface Sci*, **123-126**, 369-385.

KUBLER, A. C., J. de Carpentier, C. Hopper, A. G. Leonard & G. Putnam, 2001: Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan mediated photodynamic therapy. *Int J Oral Maxillofac Surg*, **6**, 504-509.

KYRIAZI, M., E. Alexandratou, D. Yova, M. Rallis & T. Trebst, 2008: Topical photodynamic therapy of murine non-melanome skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, **24**, 87-94.

LABORATORIO DE PATOLOGÍA, 2010: Manual de procesos y procedimientos. Hospital Universitario de Santander. Bucaramanga.

LARRUCEA, E., A. Arellano, S. Santoyo & P. Ygartua, 2001: Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. *Eur J Pharm Biopharm*, **52**, 113-119.

LEFEVRE, G., G. Sedek, H. L. Huang, M. Saltzman, M. Rosenberg, B. Kiese, *et al.*, 2007: Pharmacokinetics of a rivastigmine transdermal patch formulation in healthy volunteers: relative effects of body site application. *J Clin Pharmacol*, **47**, 471-478.

LOPEZ, T., E. Ortiz, M. Alvarez, J. Navarrete, J. A. Odriozola, F. Martinez, *et al.*, 2010: Study of the stabilization of zinc phthalocyanine in sol-gel TiO<sub>2</sub> for photodynamic therapy applications. *Nanomedicine*, **6**, 777-785.

LOPEZ, R. F., J. E. Seto, D. Blankschtein & R. Langer, 2011: Enhancing the transdermal delivery of rigid nanoparticles using the simultaneous application of ultrasound and sodium lauryl sulfate. *Biomaterials*, **32**, 933-941.

MAGENHEIM B., M. Y. Levy & S. Benita, 1993: A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers-ultrafiltration technique at low pressure. *Int. J. Pharm*, **94**, 115-123.

MARJUKKA, S. T., J. A. Bouwstra & A. Urtti, 1999: Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J Control Release*, **59**, 149-161.

MENDOZA, N., 2008: Farmacología Médica. (1000 p.), Ed. Medica Panamericana.

MENON, G. K., G. W. Cleary & M. E. Lane, 2012: The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm*, **435**, 3-9.

MITRAGOTRI, S., Y. G. Anissimov, A. L. Bunge, H. F. Frasch, R. H. Guy, J. Hadgraft, *et al.*, 2011: Mathematical models of skin permeability: An overview. *Int J Pharm*, **418**, 115-129.

MORGENTHALER, J. B., S. J. Peters, D. L. Cedeño, M. H. Constantino, K. A. Edwards, E. M. Kamowski, *et al.*, 2008: Carbaporphyrin ketals as potential agents for a new photodynamic therapy treatment of leishmaniasis. *Bioorg Med Chem*, **16**, 7033-7038.

MOSKOWITZ, P. F. & A. K. Kurban, 1999: Treatment of cutaneous leishmaniasis: retrospectives and advances for the 21st century. *Clin Dermatol*, **17**, 305-315.

OECD, 2004: Guidance document for the conduct of skin absorption studies. Organization for Economic Cooperation and Development, Environment Directorate, (p.p.: 1-31). Paris.

OENBRINK, G., P. Jurgenlimke & D. Gabel, 1988: Accumulation of porphyrins in cells: influence of hydrophobicity aggregation and protein binding. *J Photochem Photobiol B*, **48**, 451-456.

OLIVEIRA, L., Y. M. Brustoloni, T. D. Fernández, M. E. Dorval, R. V. Cunha & M. N. Boia, 2009: Severe adverse reactions to meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis: a report of 13 cases in the southwestern region of Brazil. *Trop Doct*, **39**, 180-182.

OTBERG, N., H. Richter, H. Schaefer, U. Blume-Peytavi, W. Sterry & J. Lademann, 2004: Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J Invest Dermatol*, **122**, 14-19.

PALUMBO, E., 2009: Current Treatment for Cutaneous Leishmaniasis: A Review. *American Journal of Therapeutics*, **16**, 178-182.

PASZKO, E, C. Ehrhardt, M. O. Senge, D. P. Kelleherd & J. V. Reynolds, 2010: Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagn Photodyn*, **8**, 14-29.

PATSALOS, P. N., 2005: Pharmacokinetic principles and mechanisms of drug interactions. In: Majkowski, J, B. Blaise, P. N. Patsalos & R. H. Mattson (Eds.), *Antiepileptic Drugs: Combination Therapy and Interactions*. (p.p.: 47-56) Cambridge University Press.

PELOI, I. S., C. E. Biondo, E, Kimura, M. J. Politi, M. V. Lonardoni, S. M. Aristides, *et al.*, 2011: Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Exp Parasitol*, **128**, 353-356.

PENG, Q. & J. Moan, 1995: Correlation of distribution of sulphonated aluminium phthalocyanines with their photodynamic effect in tumour and skin of mice bearing CaD2 mammary carcinoma. *Br J Cancer*, **72**, 565-574.

PENG, Y., H. Zhang, H. Wu, B. Huang, L. Gan & Z. Chen, 2010: The synthesis and photophysical properties of zinc (II) phthalocyanine bearing poly(aryl benzyl ether) dendritic substituents. *Dyes Pigm*, **87**, 10-16.

PÉREZ-VICTORIA, F. J., M. P. Sánchez-Cañete, K. Seifert, S. L. Croft, S. Sundar, S. Castanys & F. Gamarro, 2006: Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat*, **9**, 26-39.

PODLOGAR, F., M. Bester Roga & M. Gasperlin, 2005: The effect of internal structure of selected water-Polysorbate 80 40<sup>®</sup>-Imwitor 308<sup>®</sup>-IPM microemulsions on ketoprofene release. *Int J Pharm*, **302**, 68-77.

PRAUSNITZ, M. R., S. Mitragotri & R. Langer, 2004: Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 115-124.

PRAUSNITZ, M. R. & R. Langer, 2008: Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol*, **26**, 1261-1268.

PRIMO, F. L., L. Michieletto, M. Rodrigues, P. P. Macaroff, P. C. Morais, Z. Lacava, *et al.*, 2007: Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan<sup>®</sup>: Skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. *J Magn Magn Mater*, **311**, 354-357.

PRIMO, F. L., M. Rodrigues, A. R. Simioni, M. V. L. B. Bentley, P. C. Morais & A. C. Tedesco, 2008: In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. *J Magn Magn Mater*, **320**, 211-214.

QUILLER, H. G., 1960: The rat as a small mammal. Murray, J. (Ed.). Second edition. (145 p.). London.

RABASCO, A. M., 2002: Biofarmacia y Farmacocinética Básica. Avances en Farmacología y Farmacoterapia: Conceptos Básicos en Farmacología. (p.p.: 32-56). Acción Médica: Madrid, España.

RAUF, M.A., S. Hisaindee, J. P. Graham & M. Nawaz, 2012: Solvent effects on the absorption and fluorescence spectra of Cu(II)-phthalocyanine and DFT calculations. *J Mol Liq*, **168**, 102-109.

REIN, H., 1924: Experimentelle studien über elektroendosmose an überlebender menschlicher Haut. *Ztschr. f. Biol.* **81**, 125-140.

REITHINGER, R., J. C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander & S. Brooker, 2007: Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, **7**, 581-596.

ROBERTS, M. S., S. E. Cross & M. A. Pellett, 2002: Skin transport. In: Walters, K. A. (Ed.), *Dermatological and transdermal formulations*. (Vol. 119, p.p.: 89-195). Marcel Dekker: New York.

ROSENTHAL I., 1991: Phthalocyanine as photodynamic sensitizers. *J Photochem Photobiol B*, **53**, 859-870.

ROSSETTI, F. C., L. B. Lopes, A. R. Carollo, J. A. Thomazini, A. C. Tedesco & M. V. Bentley, 2011: A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. *J Control Release*, **155**, 400-408.

ROUGIER, A., D. Dupuis, C. Lotte, R. Roguet, R. C. Wester, & H. I. Maibach, 1986: Regional variation in percutaneous absorption in man: Measurement by the stripping method. *Arch Dermatol*, **278**, 465-469.

SANJULA, B., F. Shakeel, A. Ahuja, J. Ali & S. Shafiq, 2007: Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. *Acta Pharm*, **57**, 315-332.

SANTOS-MAGALHAES, N. S., A. Pontes, V. M. W. Pereira & M. N. P. Caetano, 2000: Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *J Pharm*, **208**, 71-80.

SATO, K., K. Sugibayashi & Y. Morimoto, 1991: Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. *J Pharm Sci*, **80**, 104-107.

SCOTT, R. C., P. L. Batten, H. M. Clowes, B. K. Jones & J. D. Ramsey, 1992: Further validation of an in vitro method to reduce the need for in vivo studies for

measuring the absorption of chemicals through the skin. *Fundam Appl Toxicol*, **19**, 484-492.

SHAKEEL, F., S. Shafiq, N. Haq, F. K. Alanazi & I. A. Alsarra, 2012: Nanoemulsions as potential vehicles for transdermal and dermal delivery of hydrophobic compounds: an overview. *J Med Econ*, **9**, 953-974.

SIBATA, M. N., A.C. Tedesco & J.M. Marchetti, 2004: Photophysicals and photochemicals studies of zinc (II) phthalocyanine in long time circulation micelles for Photodynamic Therapy use. *Eur J Pharm Sci*, **23**, 131-138.

SIVAMANI, R. K., D. Liepmann & H. I. Maibach. Microneedles and transdermal applications. *Expert Opin Drug Deliv*, **4**, 19-25.

SLOAN, K. B., S. C. Wasdo & J. Rautio, 2006: Design for optimized topical delivery: Prodrugs and a paradigm change. *Pharm Res*, **23**, 2729-2747.

SOSNIK, A., A. M. Carcaboso, R. J. Glisoni, M. A. Moreton & D. A. Chiappetta, 2010: New old challenges in tuberculosis: Potentially effective nanotechnologies in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **62**, 547-559.

SOTO, J., P. Fuya, R. Herrera & J. Berman, 1998: Topical paromomycin/MBCL plus parenteral meglumine in the treatment of American cutaneous leishmaniasis: a controlled study. *Clin Infect Dis*, **26**, 56-58.

SOTO, J., J. Toledo, P. Gutierrez, R. S. Nicholls, J. Padilla, J. Engel, *et al.*, 2001: Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clin Infect Dis*, **33**, e57-61.

SOTO, J., J. T. Toledo, P. Gutierrez, M. Arboleda, R. S. Nicholls, J. R. Padilla, *et al.*, 2002: Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (wr279396): Phase 2 pilot study. *Am J Trop Med Hyg*, **66**, 147-151.

SOTO, J., L. Valda-Rodríguez, J. Toledo, L. Vera-Navarro, M Luz, H. Monasterios-Torrico, *et al.*, 2004: Comparison of generic to branded pentavalent antimony for treatment of new world cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, **71**, 577-581.

STOJILJKOVIC I, B. D. Evavold & V. Kumar, 2001: Antimicrobial properties of porphyrins. *Exp Opin Investig Drugs*, **10**, 309-320.

TEICHMANN, A., S. Heuschkel, U. Jacobi, G. Presse, R. H. Neubert, W. Sterry *et al.*, 2007: Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *Eur J Pharm Biopharm*, **67**, 699-706.

THAKUR, R., P. Batheja, D. Kaushik & B. Michniak, 2008: Structural and biochemical changes in aging skin and their impact on skin permeability barrier. In: Dayan, N. (Ed.), *Skin aging handbook: an integrated approach to biochemistry and product development*. (494 p.). William Andrew: Norwich N. Y.

van der SNOEK, E. M., D. J. Robinson, J. J. van Hellemond, & H. A. M. Neumann, 2008: A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **22**, 918-922.

van Ravenzwaay, B. & E. Leibold, 2004: A comparison between in vitro rat and human and in vivo rat skin absorption studies. *Hum Exp Toxicol*, **23**, 421-430.

VOLLET-FILHO, J. D., M. A. Caracanhas, C. Grecco, J. Ferreira, C. Kurachi & V. S. Bagnato, 2010: Non-homogeneous liver distribution of photosensitizer and its consequence for photodynamic therapy outcome. *Photodiagn Photodyn*, **7**, 189-200.

VYAS, T.K., A. Shahiwala & M. M. Amiji, 2008: Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations, *Int. J. Pharm*, **347**, 93-101.

WAGNER, H., K. H. Kostka, C. M. Lehr & U. F. Schaefer, 2000: Drug distribution in human skin using two different *in vitro* test systems: comparison with *in vivo* data. *Pharm Res*, **12**, 1475-1481.

WAGNER, H., K. H. Kostka, C. M. Lehr & U. F. Schaefer, 2001: Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from *in vitro* experiments with human skin and skin equivalents. *J Control Release*, **75**, 283-295.

WAINWRIGHT, M., 1998: Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemoter*, **42**, 13-28.

WALTERS, K. A. & M. S. Roberts, 2002: The structure and function of skin. In: Walters, K. A. (Ed.), *Dermatological and transdermal formulations*. (Vol. 119, p.p.: 1-39). Marcel Dekker: New York.

WILLIAMS, A. C. & B. W. Barry, 2004: Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev*, **56**, 603-618.

WINGERD, B. D., 1988: Rat dissection manual. Johns Hopkins University Press, (JHU, Press).

WINTER, M. E., 2003: Basic Clinical Pharmacokinetics. Fourth edition. Lippincott Philadelphia: Williams and Wilkins

WONG, H. L., X. Y. Wu & R. Bendayan, 2012: Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, **64**, 686-700.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2006: Environmental Health Criteria (EHC) 235, Dermal absorption. Switzerland.

YOUNG, D. G., A. Morales, R. D. Kreutzer, J. B. Alexander, A. Corredor, R. B. Tesh, *et al.*, 1987: Isolations of *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from cryopreserved Colombian sandflies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*, **5**, 587-589.

YOUNG, P. M., D. Cocconi, P. Colombo, R. Bettini, R. Price, D. F. Steele & M. J. Tobyn, 2002: Characterization of a surface modified dry powder inhalation carrier prepared by "particle smoothing". *J Pharm Pharmacol*, **54**, 1339-1344.

YSLAS, E. I., C. Prucca, S. Romanini, E. N. Durantini, M. Bertuzzi & V. Rivarola, 2009: Biodistribution and phototherapeutic properties of Zinc (II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine *in vivo*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, **6**, 62-70.