

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**SISTEMAS TRANSDÉRMICOS: INFLUENCIA DEL TIPO DE
MEMBRANA EN LA TRANSFERENCIA DEL ÁCIDO
SALICÍLICO A TRAVÉS DE LA PIEL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Aida María Ariza Osorio

Bajo la dirección de la doctora
Amalia María Rodríguez Bayón

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2867-7



UNIVERSIAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACÉUTICA

SISTEMAS TRANSDÉRMICOS: INFLUENCIA DEL TIPO DE
MEMBRANA EN LA TRANSFERENCIA DEL ÁCIDO SALICÍLICO A
TRAVÉS DE LA PIEL.

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por:

AIDA MARÍA ARIZA OSORIO

Directora:

Dr. AMALIA MARÍA RODRÍGUEZ BAYÓN

Quiero expresar mi agradecimiento:

A la Dra. Amalia María Rodríguez Bayón por su apoyo, dedicación, por compartir sus sabios conocimientos conmigo y haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis.

A la Dra. Irene Molina, como Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, que me ha permitido realizar esta tesis en el departamento a su cargo.

A todos mis compañeros del departamento, que han sabido hacerme más fácil el trabajo durante estos años.

A mi familia por apoyarme en cada momento y en especial a mi esposo Pedro, mi hija Daira y a mis padres: Osita y Chinito; por soportarme en los momentos de desánimo y alentarme a terminar este trabajo.

A mis amigos por su fiel y desinteresada amistad.

A todos decirs MUCHAS, MUCHAS, GRACIAS por compartir estos años conmigo y espero que sigamos siempre juntos.

SISTEMAS TRANSDÉRMICOS: INFLUENCIA DEL TIPO DE MEMBRANA EN LA TRANSFERENCIA DEL ÁCIDO SALICÍLICO A TRAVÉS DE LA PIEL.

El objetivo de la Tesis doctoral es el desarrollo de sistemas transdérmicos en los que la cesión del principio activo va a estar controlada por una membrana sintética elaborada con colodión y distintas proporciones de una sustancia plastificante.

Al modificar la proporción del plastificante se puede conseguir que las velocidades de cesión del principio activo que se transfiera a su través, varíen de igual forma. Es decir, dependiendo de la cantidad de plastificante podrán obtenerse velocidades de cesión diferentes.

Para los sistemas transdérmicos elaborados, en los cuales la cesión del principio activo va a estar controlada por una membrana, es necesario primero obtener una serie de membranas sintéticas compuestas todas ellas por colodión, como soporte inerte, y distintas proporciones de una sustancia plastificante (aceite de ricino) que es el que nos va a servir para controlar la velocidad de cesión del principio activo formulado en el sistema transdérmico.

Con esos componentes se elaborarán dos tipos de membranas sintéticas: unas sin principio activo y otras que contienen en su estructura el principio activo.

La técnica de elaboración será la misma para ambas, la única diferencia sería la incorporación o no del principio activo.

Se elige como sustancia trazadora el Ácido Salicílico porque es un principio activo ampliamente utilizado en dermatología y es fácil y rápido de valorar por espectrofotometría.

Los estudios de cesión se realizarán con todas y cada una de las membranas elaboradas, al objeto de elegir la más idónea para los sistemas transdérmicos que se elaborarán a continuación.

Los sistemas transdérmicos constarán de un reservorio que contendrá el principio activo formulado como emulsión O/A y de la membrana sintética, seleccionada de entre las preparadas anteriormente, que servirá para controlar la cantidad y velocidad de cesión del fármaco.

Con objeto de optimizar los sistemas transdérmicos así elaborados, se realizarán los estudios “in vitro” de cesión del principio activo contenido en los mismos utilizando muestras de piel humana.

PALABRAS CLAVES

Liberación “in vitro” de fármacos; Absorción percutánea; Flujo a través de celdas de difusión.

TRASDERMAL SYSTEMS: INFLUENCE OF TYPES OF MEMBRANES IN THE RELEASE OF SALICYLIC ACID THROUGH OF THE SKIN

The objective of the following work is to study the release of a model compound through membranes made of collodion and different amounts of plasticizer which were used to give the membranes the required flexibility.

For the synthetic membranes, the percentage of salicylic acid is greater when the amount of castor oil is increases in the membrane.

Membranes permit transport of molecular species at rates which are consistent with product or process requirements. In most cases, membranes are used the control drug release.

Drug release through two kinds of artificial membranes was studied both with drug and with out drug. Membranes of the two types were prepared by evaporation of solvents which were in a lipidic solution in which the collodion or the collodion and Salicylic Acid had dissolved.

The Salicylic Acid was chosen because this drug was used extensively in dermatology for it is rapid and easy analysis.

Drug release, through two kinds of artificial membranes were studied in order to determine the best option for the transdermal systems.

The trasdermal systems had a reservoir with drug in emulsion O/A and in artificial membranes. Membranes permit transport of molecular species at a rate which is consistent with product or process requirements. In most cases membranes are used to control drug release.

The objective of enhancing the trasdermal systems was carried out through in vitro release testing by using modified Franz cells. The human epidermis was the separator between donor and receiver phases.

KEY WORDS

In vitro Drug Release; Percutaneous absorption; Flow-through diffusion cell.

INDICE

INTRODUCCION y OBJETIVOS	1
ANTECEDENTES	5
A.1 ESTRUCTURA DE LA PIEL	5
1.1.- Epidermis	6
1.2.- Dermis	14
1.3.- Hipodermis	15
1.4.- Anejos Cutáneos.	15
A.2. ABSORCIÓN PERCUTANEA	17
2.1.- Etapas de la absorción	17
2.2.- Vias de penetración	17
2.3.- Factores que intervienen en la penetración cutánea	23
A.3. MECANISMOS DE PERMEACION	29

A.4. MODELOS CINÉTICOS	31
4.1.- Cinética de difusión de Fick a través de membrana	31
4.2.- Cinética de difusión de Higuchi	34
4.3.- Análisis Cinético de Pepas	36
A.5. SISTEMAS TRANSDERMICOS	37
5.1.- Introducción y definición	37
5.2.- Ventajas y desventajas de la administración transdérmica	38
5.3.- Componentes de los sistemas transdérmicos	41
5.4.- Clasificación	55
PARTE EXPERIMENTAL	
Capítulo 1 MATERIALES Y UTILLAJE	60
1.1. Materiales para elaborar la formulación	61
1.2.- Materiales empleados para elaborar las membranas	73
1.3.- Utillaje empleado	79
Capítulo 2 VALIDACION DEL METODO ANALÍTICO	82
2.1.- Determinación de la Linealidad	85
2.2.- Determinación de la Precisión	88
2.3.- Determinación de la Solidez	91
2.4.- Determinación de la Exactitud	92
2.5.- Determinación de la Especificidad	94
Capítulo 3 ELABORACION Y CARACTERIZACION DE LAS MEMBRANAS ARTIFICIALES	96
3.1.- Membranas Tipo I	97
3.2.- Membranas Tipo II	106
3.3.- Comentarios	112
Capítulo 4 ESTUDIOS DE CESION “In vitro” A TRAVES DE MEMBRANAS TIPO I	137
4.1.- Método de elaboración de la Emulsión O/A (Fase dadora)	138
4.2.- Ensayos de cesión a través de membranas TIPO I	139

4.3.- Influencia de las condiciones en que se encuentra la Membrana	142
4.4.- Influencia de la célula de diálisis que se emplea en los ensayos de cesión	144
4.5.- Resultados	146
4.6.- Comentarios	162
Capítulo 5 ESTUDIOS DE CESION “In vitro” A PARTIR DE MEMBRANAS TIPO II	183
5.1.- Ensayos de cesión a través de membranas TIPO II	183
5.2.- Influencia de la célula de diálisis que se emplea en los ensayos de cesión del AS a partir de membranas tipo II	184
5.3.- Influencia del volumen de la fase receptora en los ensayos de cesión	185
5.4.- Resultados	186
5.5.- Comentarios	210
Capítulo 6 ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA “In vitro” DE Ac. SALICILICO A TRAVES DE MEMBRANAS TIPO I o TIPO II y EPIDERMIS HUMANA	228
6.1.- Preparación de las membranas naturales para los ensayos de cesión	229
6.2.- Dispositivo utilizado en los ensayos de cesión a través de epidermis	229
6.3.- Influencia de la membrana en la transferencia del AS a través de la piel	230
6.4.- Resultados	231
6.5.- Comentarios	243
CONCLUSIONES	253
BIBLIOGRAFÍA	257

OBJETIVOS INTRODUCCION Y

Antiguamente se creía que los medicamentos aplicados tópicamente sólo podían ejercer su acción “in situ”, pero después de años de estudio se ha demostrado que a través de la piel, vía capilares periféricos, los fármacos pueden acceder a la circulación sistémica sin sufrir degradaciones producidas por el metabolismo hepático o por la acción de los ácidos y enzimas del estómago, lo que supone una gran ventaja (*Segot-Chicq y col., 1985*).

Por ello, actualmente las formas farmacéuticas de aplicación cutánea no se administran únicamente con el objetivo de conseguir una acción tópica, más o menos profunda a nivel de la epidermis, de tal forma que el fármaco pueda ejercer su efecto terapéutico, desde el estrato córneo a la epidermis viva; sin embargo, con este tipo de preparados tópicos no se pretende, en ningún caso, que el

fármaco llegue a la circulación sistémica. No obstante, como en la actualidad la piel se considera otra vía de administración de sustancias medicamentosas, podemos aplicar fármacos en la piel con el objetivo de conseguir efectos sistémicos.

El uso de la vía transdérmica como vía de administración de fármacos ofrece importantes ventajas frente a otras vías de administración más tradicionales como, por ejemplo, la vía oral. Frente a esa vía de administración, la vía percutánea tiene como ventajas: evitar la variabilidad en las concentraciones plasmáticas, los típicos “picos y valles” que se producen en la administración oral de formas farmacéuticas convencionales, además de la variabilidad en absorción que se puede producir. Además, se evitaría el efecto de primer paso que presenta esa vía debido al intenso metabolismo que pueden sufrir ciertos fármacos a su paso por el hígado. Esto se traduce en un aumento de la biodisponibilidad del fármaco y por tanto, en la posibilidad de poder administrar dosis terapéuticas menores para conseguir los mismos efectos terapéuticos que proporciona la vía oral.

La administración cutánea también presenta ventajas frente a la administración intravenosa, ya que no necesita de personal especializado para su administración, es más cómoda para el paciente y por ello, éste no tiene inconveniente en cumplir la posología. Además si se produce algún efecto adverso, éste se puede suprimir rápidamente, con la retirada del parche.

Pero, la ventaja fundamental que presenta esta vía es la posibilidad de administrar fármacos de acción sistémica a una velocidad constante y programada.

Todo esto hace que en los últimos años se hayan incrementado los esfuerzos al objeto de desarrollar sistemas terapéuticos transdérmicos (parches transdérmicos) de administración de fármacos con acción sistémica.

Entre los diversos tipos de sistemas transdérmicos que se encuentran actualmente en el mercado europeo, están aquellos en los que el control de la velocidad de liberación del fármaco lo ejerce una membrana polimérica, que puede ser: porosa, de polipropileno, de copolímeros como el etilen-vinil-acetato, etc. Este último tipo de membrana es la que llevan los parches Duragesic[®] que contiene fentanilo como principio activo, o el Estraderm TTS[®] que contiene estradiol (*Aulton, 2004*).

En el presente trabajo, concebido como continuación de los realizados por la directora de esta memoria, se investiga la posibilidad de utilizar como elemento controlador de la velocidad de liberación del fármaco las membranas de colodión y distintas cantidades de aceite de ricino, como plastificante (Membranas tipo I).

Además, con el mismo objetivo de controlar la velocidad de cesión del fármaco hacia la piel, se elaboran otro tipo de membranas, que llevan entre sus componentes distintos porcentajes de principio activo (Membranas tipo II).

En ambos casos el fármaco que se emplea para llevar a cabo estos estudios es el ácido salicílico que sirve como sustancia indicadora de la velocidad de transferencia o liberación del fármaco a través de la piel.

En el desarrollo de este estudio lo primero que se hace es caracterizar los dos tipos de membranas para poder establecer, si es posible, la relación existente entre las características de la membrana y la difusión del principio activo.

Una vez tipificadas las distintas clases de membranas preparadas, se ensayan aisladamente, empleando diferentes condiciones experimentales, para ver si éstas influyen en los procesos de transferencia del ácido salicílico.

Por último, se estudian las membranas simulando una “situación real”, es decir, colocándolas en la celda de difusión en contacto con muestras de piel humana obtenidas de operaciones quirúrgicas, para ver como se produce:

- a) la transferencia del fármaco, a través de las distintas membranas tipo I, desde la formulación tipo (emulsión O/A de ácido salicílico) o bien,
- b) la liberación del fármaco a partir de las membranas tipo II preparadas con diferentes porcentajes de ácido salicílico como principio activo de tal modo que, a partir de las cantidades de fármaco que atraviesan la piel humana y acceden al compartimiento receptor, en los ensayos de difusión, se pueda dilucidar si la membrana controla la velocidad de transferencia del ácido salicílico a través de la piel humana.

ANTECEDENTES

Durante mucho tiempo, la piel ha sido considerada como un órgano de protección total, que les servía a los seres vivos para protegerles y aislarles del entorno. Aunque su función principal sigue siendo la de protección contra los factores nocivos del medio exterior, también constituye un complejo metabólico, inmunológico y sensorial (*Berti y Lipsky, 1995; Wester y Maibach, 1992; Litter, 1996*).

Por tanto, el concepto de la piel como barrera infranqueable, ha ido evolucionando a medida que se iba conociendo la estructura y las funciones de la piel, llegándose a la situación actual en la que se considera a este órgano como un sistema de relación con el exterior, aislante de acciones perjudiciales para el cuerpo pero, también, lugar de paso de sustancias exógenas hacia el interior del mismo (*Walters y Roberts, 2002*).

A. 1. ESTRUCTURA DE LA PIEL

La piel recubre prácticamente todo el organismo humano, y debe considerarse como la frontera que separa nuestro medio interno del mundo exterior. Se trata de un sistema heterogéneo constituido por dos tejidos, uno epitelial que recibe el nombre de epidermis y uno conjuntivo especializado que recibe el nombre de dermis. Debajo de éstos, se encuentra el tejido subcutáneo o hipodermis, que es otra variedad de tejido conjuntivo especializado en el que predominan los adipocitos (*Barry, 1987; Williams y Barry, 1992; Pons-Gimier y Parra-Juez, 1995*) En la *figura A.1* se observa una sección transversal de la piel.

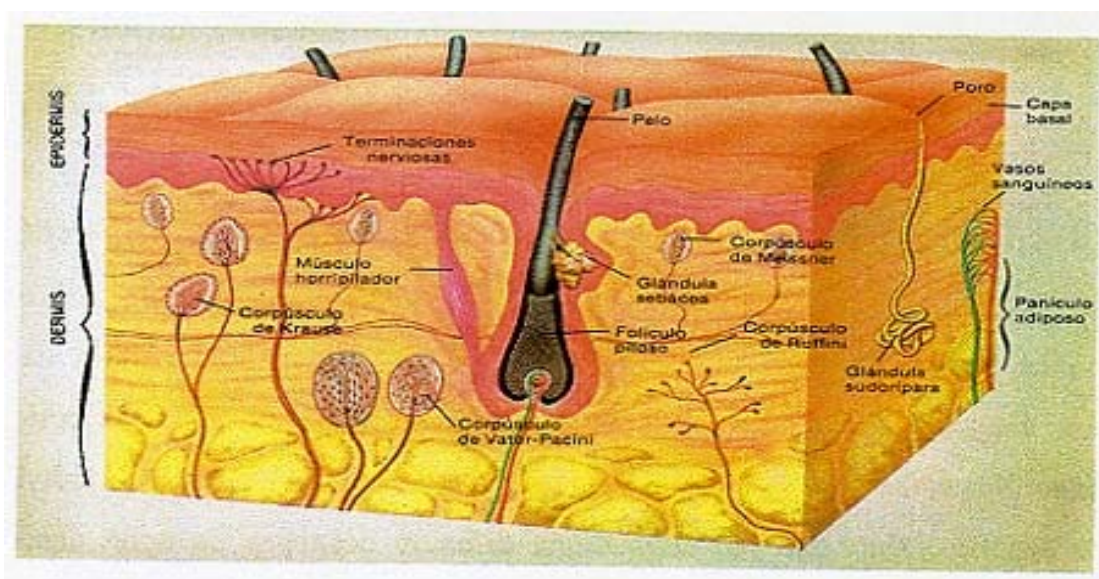


Figura A.1. Corte transversal de la Piel

La característica fundamental que diferencia la epidermis de la dermis e hipodermis, es que en la primera (tejido epitelial) predominan los elementos celulares, mientras que en la dermis e hipodermis (tejido conjuntivo) predomina la sustancia intercelular.

1.1. Epidermis

La epidermis es el tejido más externo de la piel y tiene numerosas funciones siendo una de las más importantes la generación del estrato córneo, como se verá más adelante. El grosor de la epidermis es de, aproximadamente, 0.2mm de espesor (*Parra-Juez y Pons-Gimier, 1995*). Según *Jennifer (1994)*, la epidermis está formada por tejido epitelial, plano, estratificado y queratinizado, derivado del ectodermo embrionario y está constituida por una serie de células ordenadas y distribuidas en distintas capas o estratos que, por sus distintas características se agrupan en dos zonas diferentes:

- a) la más externa es la **epidermis muerta** que constituye el *estrato córneo*, y
- b) el resto de estratos se agrupan en la denominada **epidermis viva** que se encuentra inmediatamente debajo del estrato anterior y que como indica su nombre, está formada por células vivas, a diferencia del estrato córneo que son células muertas.

a) *Estrato Córneo*

El estrato córneo es la capa más externa y heterogénea de la piel. Está constituido por 10-15 capas de células hexagonales, aplanadas, muertas y cornificadas, de 10-20 μm de espesor, embebidas en una matriz formada por lípidos intercelulares. El espesor del estrato córneo varía de unas zonas a otras del cuerpo humano; en zonas muy expuestas a rozamiento, como pueden ser la palma de las manos y las plantas de los pies, el espesor es mayor, y no es extraño que sustancias como el salicilato de metilo se

Antecedentes

absorban más lentamente aquí que en otras partes del cuerpo (*Walters y Roberts, 2002*).

Otra característica del estrato córneo es su débil hidratación, sólo el 15% frente al 70%, que es la cifra normal en el resto del cuerpo. Esta es una de las razones que explican su función como barrera a la penetración de fármacos a través de la piel. También influye el escaso espacio intercelular, el escaso valor de área superficial, ya que ese espacio intercelular es del orden de $0.1 \mu\text{m}$. Sin embargo, se ha observado que es a través de esos espacios es por donde pasan la mayoría de las sustancias. Esos *espacios intercelulares*, existentes entre los *corneocitos*, están formados, fundamentalmente, por *lípidos y desmosomas* que contribuyen a la cohesión de esas células.

Otro motivo que explica la función barrera del estrato córneo es la total renovación de células que se produce cada 2-3 semanas. Esto puede afectar a la previsión que se puede hacer de dosis absorbida de sustancias muy lipófilas, como las cremas solares, o que se unen fuertemente a la capa córnea como puede ser el hexaclorofeno.

El estrato córneo también actúa como barrera frente a la pérdida de fluidos corporales y agua endógena. Se ha comprobado que, en algunas enfermedades cutáneas, como la psoriasis, la renovación celular se produce en un tiempo más corto, cada 2-4 días.

_____Antecedentes

Luego, la epidermis consiste en una serie de células, ordenadas en estratos, con distintas características según sea su nivel de diferenciación.

El origen de las células de la epidermis radica en la ***lámina basal*** que se encuentra en la unión dermis-epidermis viva. En esta capa hay ***melanocitos***, células de ***Langerhans*** y de ***Merkel*** y dos clases de ***queratinocitos***.

- Unos tienen como única función la división celular y producir nuevas células (queratinocitos)
- La función de los otros es servir de anclaje entre la epidermis y la membrana basal (*Lavke y Sun, 1982*).

La ***membrana basal*** está formada por dos capas: la ***lámina densa*** y la ***lámina lúcida***. Está compuesta, principalmente, por proteínas: Colágeno tipo IV y Laminina, entre otras. El **colágeno** es el responsable de la estabilidad mecánica de la membrana basal, mientras **laminina** y **fibronectin** están implicadas en el anclaje de los queratinocitos basales a la membrana basal.

Las células de la lámina basal están unidas a la membrana basal por medio de hemidesmosomas que se encuentran en los queratinocitos basales (*Borradori y Sonnenberg, 1999*).

Los ***hemidesmosomas*** están formados por tres grupos de proteínas distintos:

BPAG1 y **BPAG2** e **integrinas**, estas últimas específicas de las células epiteliales (*Sawamura y col. 1991 y Li y col., 1993*).

Antecedentes

Unas participan en la organización del esqueleto celular (BPAG1), otras median en la unión célula-matriz extracelular (integrinas). Las células basales de la epidermis humana contienen integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_6\beta_4$.

Otras proteínas (BPAG2 y $\alpha_6\beta_4$) contribuyen en un alto porcentaje en el anclaje de los queratinocitos a la membrana basal, ya que hace que se extiendan los filamentos intermedios de queratina, a través de la lámina lúcida, hasta la lámina densa de la membrana basal. (*Burgeson y Christiano, 1997*). Esas proteínas interactúan en la lámina densa con otra proteína, la laminina-5, que se une al colágeno VII que es el mayor responsable del anclaje de las fibrillas dentro de la matriz dérmica. También se cree que esas dos proteínas (BPAG2 y $\alpha_6\beta_4$) median en la señal transductora para el inicio de la formación de hemidesmosomas (*Dowling y col, 1996*) y en la proliferación y diferenciación celular. La proteína $\alpha_3\beta_1$ está asociada con la actina y puede unirse a la laminina-5.

Es importante que la unión entre dermis y epidermis, entre las células de la lámina basal y las células de la membrana basal, sea segura. Cuando esta unión no es apropiada se producen enfermedades cutáneas crónicas.

Además de las uniones hemidesmosomas celulares-matriz, hay otro lugar de adhesión de las células basales de la epidermis a la membrana basal, las “uniones adherentes” (*Kaiser y col, 1993*). Esas uniones muestran perfiles proteicos distintos para hemidesmosomas y desmosomas. Mientras los desmosomas y hemidesmosomas están

_____Antecedentes

unidos a la queratina citoplasmática, esas “uniones adherentes” están unidas a los microfilamentos de actina. Los desmosomas

reemplazan a los hemidesmosomas en la unión entre las células que componen los distintos estratos de la epidermis viva. En la epidermis, los desmosomas son los responsables de mantener la unión y, de conectar, las estructuras de queratina citoesquelética individuales creando, así, un tejido muy resistente a las tensiones y fricciones.

La formación de hemidesmosomas y desmosomas parece ser que está inducida por el ión Ca^{2+} y está mediada por la activación de la proteína quinasa C (CPK) (*Kitajima y col., 1999*). Esa proteína juega un papel muy importante en la diferenciación de los queratinocitos (*Yuspa, 1994*).

En el estrato basal se encuentran además de queratinocitos, otros tipos de células, ***Células de Langerhans***. son células dendríticas que carecen de melanina, contienen gránulos de Langerhans y tienen funciones relacionadas con el sistema inmunológico cutáneo; actúan como macrófagos (*Teunissen, 1992*). También es importante esta labor en las reacciones de sensibilización cutánea por contacto (*Walters y Roberts, 2002*). Sin embargo, también se ha postulado que actúan en el control de la proliferación de queratinocitos (*Potten, 1976*). Estas células se encuentran en la zona suprabasal de la epidermis (principalmente a nivel del estrato espinoso), su forma es estrellada.

Los ***melanocitos*** descienden directamente sobre la membrana basal, situándose entre los queratinocitos del estrato basal, y extienden los procesos dendríticos entre las células del estrato

_____Antecedentes

espinoso (*Parra-Juez y Pons-Gimier, 1995*). En las dendritas se encuentran los melanosomas que se transfieren a los queratinocitos

suprabasales, probablemente, por una fagocitosis (*Prota, 1996*) cediendo la melanina a la epidermis. Los movimientos intracelulares de los melanosomas posiblemente estén mediados por la actina y la microtubulina (*Tuma y Gelfand, 1999*). La regulación de la melanogénesis es un proceso complejo (*Hearing, 1999*), donde están involucrados muchos genes.

La melanina es un pigmento que proporciona a la piel su color y tiene funciones protectoras contra las radiaciones U.V. del sol. Los *melanocitos* carecen de desmosomas, tienen pocos microfilamentos internos y presentan en su citoplasma melanosomas, cuerpos de melanina que se originan en la cresta neural (*Lázaro-Ochaita, 1993*), por tanto, los melanocitos actúan como una glándula exocrina que suministra pigmentos, melanina, que sólo se sintetiza en el interior de los melanosomas. La población de melanocitos se renueva lentamente mediante divisiones mitóticas.

El último tipo de célula que podemos encontrar en el estrato basal son las *Células de Merkel*. Se distinguen fácilmente de los queratinocitos porque tienen el citoplasma claro y no presentan tonofilamentos (*Walters y Roberts, 2002*), tienen un núcleo hendido, un complejo de Golgi prominente y numerosas vesículas densas. Proyectan prolongaciones citoplasmáticas dentro de los queratinocitos vecinos con los que quedan unidas mediante desmosomas (*Lázaro-Ochaita, 1993*).

Parece que estas células desempeñan funciones sensoriales, al estar asociadas a terminaciones nerviosas, presentes al otro lado de la membrana basal, siendo receptores del sistema nervioso; aunque, todavía no se ha podido demostrar que cedan neurotransmisores,

_____Antecedentes

hay acetilcolinesterasa dentro de estas células. No obstante, a pesar de la falta de información, hay autores que postulan que las células de Merkel tienen un papel importante en: a) la cesión de sustancias

bioactivas a estructuras subepidérmicas; b) en el estímulo y mantenimiento de la proliferación de queratinoitos y C) en el sistema mecano-sensorial también (*Tachibana, 1995*).

Luego, en este estado de diferenciación los queratinocitos tienen, además del núcleo y nucleolo, una serie de orgánulos citoplasmáticos: como son el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, mitocondrias y unos cuantos haces de filamentos de queratina; y están interconectados por más desmosomas que en el estrato basal (*Wertz y Downing, 1989*). El proceso de diferenciación sigue y estas células dan lugar a las del siguiente estrato.

Es decir, en función del grado de diferenciación celular, dentro de la epidermis se pueden distinguir varios estratos.

1.1.1.- Estrato germinativo

El estrato germinativo o basal o proliferante se encuentra en contacto con una membrana constitutiva de la unión dermo-epidérmica en la zona de separación entre la dermis y la epidermis. Las células que constituyen este estrato son indiferenciadas, carecen de marcadores bioquímicos característicos de las células más diferenciadas de las capas superiores y su proliferación está regulada por diversos factores intrínsecos y extrínsecos. Entre los reguladores intrínsecos destacan el factor de crecimiento epidérmico, los factores de crecimiento tumoral α y β , progesterona, epinefrina y vitaminas A y D.

En los queratinocitos basales se encuentran diversas proteínas estructurales, integrantes del citoesqueleto que colaboran con el proceso en el proceso mitótico y facilitan los cambios celulares propios del proceso de diferenciación. Además de microtúbulos y miofilamentos, es importante la presencia de los denominados

_____Antecedentes

filamentos intermedios de queratina. Estas queratinas propias del estrato basal se hallan agrupadas en filamentos cuyo diámetro oscila entre 7 y 10 nm. La subunidad proteica más elemental posee la

mitad de su estructura enrollada formando una α -hélice. Cada cadena queratínica se caracteriza por emparejarse con otra cadena, de tal forma, que coinciden sus correspondientes dominios helicoidales. Este par de subunidades se estabiliza por uniones hidrofóbicas y constituye una molécula de queratina.

Tras su proliferación las células del estrato basal ascienden para situarse en una posición suprabasal, pierden su capacidad proliferativa e inician el complejo proceso de diferenciación para dar origen al estrato espinoso.

1.1.2.- Estrato espinoso

Esta capa debe su nombre a la morfología que le confiere la existencia de numerosas estructuras proteicas, intra y extracelulares, denominadas **desmosomas**, constituidas por diversas moléculas de adhesión de células adyacentes (*Burge, 1994*).

Diversas glicoproteínas, denominadas cadherinas, parecen ser las responsables de la eficacia de los corneodesmosomas (Hunt y col. 1999). La interacción de las partes extracelulares de las cadherinas garantiza la adherencia selectiva de células que poseen el mismo nivel de diferenciación.

1.1.3.- Estrato granuloso

El proceso de diferenciación de las células del estrato espinoso conduce a la formación del estrato granuloso (*Fuchs, 1993; Wertz y van der Berg, 1998*). En estas células granulosas de la epidermis, abundan unas estructuras ovoides, bien delimitadas y de reducido tamaño, que poseen gran cantidad de lípidos denominados **cuerpos lamelares**.

Antecedentes

Estos cuerpos lamelares contienen vesículas lipídicas aplanadas formadas por bicapas en contacto, constituidas por glicosil-ceramidas, como componente mayoritario, y acil-ceramidas, cuya presencia probablemente, contribuye a estabilizar esta peculiar disposición. Además, los cuerpos lamelares contienen otros lípidos, algunas proteínas estructurales y diversos enzimas.

Cuando las células epidérmicas entran en la última fase de su proceso de diferenciación se llenan no sólo, de cuerpos lamelares de naturaleza lipídica, sino también de agregados densos de contorno irregular que se conocen con la denominación de gránulos de Queratohialina.

Estas estructuras contienen proteínas insolubles no queratínicas y permiten identificar a las células que los contienen como pertenecientes al estrato granuloso. Aunque no se conocen todos los componente proteicos que se integran en los gránulos de queratohialina, los más representativos son los que se relacionan a continuación.

- a) **Profilagrina.** Es una proteína rica en histidina, que se caracteriza por su elevado grado de fosforilación y por contener numerosas subunidades proteicas iguales, alineadas y enlazadas entre sí por segmentos de unión.
- b) **Involucrina,** proteína rica en glicina y ácido glutámico (Marekov y Sreitnert, 1998).
- c) **Ioricrina,** proteína rica en cisteína, serina y glicina (*Mehrel y col. 1990*)
- d) **Queratolinina** (*Takahashi y col., 1991*)
- e) **PRP,** proteína rica en prolina (Steinert y col., 1999)

El espacio citoplasmático de la célula granulosa se convertirá en un entramado proteico denso, formado por fibras de queratina y filagrina, encargado de ensamblar las queratinas dentro del corneocito. Tanto la profilagrina, precursor de las moléculas de filagrina, como la involucrina y

Antecedentes

la loricrina, destinadas a formar la envoltura proteica del corneocito, son fundamentales en la función barrera que realiza el estrato córneo. De esos componentes depende la

adecuada hidratación de los corneocitos y el control de la pérdida de agua por vía transepidérmica.

La célula del estrato granuloso se transforma en un corneocito a través de un proceso complejo que supone una transformación cuali y cuantitativa de los componentes proteicos y lipídicos (*Adams y Watts, 1993; Steinert y Marekov, 1997*). El primer paso corresponde a la exocitosis de los cuerpos lamelares que se han acumulado en las células del estrato granuloso. Esos corpúsculos se desplazan hacia la cara apical de la célula granulosa, fundiéndose su propia membrana con la membrana plasmática de la célula, que posee una composición muy parecida. La incorporación de los cuerpos lamelares permite no sólo el vertido de los lípidos y las proteínas almacenados al espacio intercelular, sino que hace posible la introducción de lípidos de membrana y de ciertas enzimas en la propia membrana plasmática

1.2. Dermis

La dermis o corion, es un tejido resistente, flexible y muy elástico, con un espesor de 1 a 5 mm. Está compuesta por una matriz densa de tejido conectivo o conjuntivo y posee **fibras**: colágenas (~70- 75%), elásticas (~ 4%), reticulares (~ 0,4%), y **células**: *fibroblastos*, *mastocitos*, *leucocitos* y *melanocitos*. Esta matriz está embebida en una sustancia mucopolisacárida amorfa e incluye, aproximadamente, el 20% de la masa dérmica; es la que le proporciona elasticidad a la dermis al contener las distintas fibras.

Los *fibroblastos*, son los encargados de producir los componentes del tejido conectivo de colágeno, laminina, fibronectina y vitronectina. Los *mastocitos* están implicados en

_____Antecedentes

procesos de respuesta inmune e inflamatoria y los *melanocitos* cuya función es fabricar melanina (*Walkers y Roberts, 2002*).

La capa superficial, o capa papilar, se interdigita con la epidermis de la que queda claramente delimitada. La capa más profunda o capa reticular, se pierde en el tejido subcutáneo.

La dermis, es un componente sustancial de nuestro cuerpo, ya que no sólo es el sostén de la epidermis, la que le proporciona nutrientes y sistemas de soporte e inmunológico, todo ello a través de la fina capa papilar adyacente a la epidermis, sino que además juega un papel importante en la regulación de la temperatura, presión y dolor de nuestro organismo (*Walkers y Roberts, 2002*)

La dermis proporciona a la piel una gran fuerza mecánica gracias al alto contenido de fibras colágenas, aportando, mediante sus distintos componentes celulares, una reserva de elementos regenerativos y defensivos capaces de combatir la infección y reparar las heridas profundas (*Wilkes y col., 1973*).

La dermis soporta los apéndices cutáneos: **glándulas sudoríparas** (apocrinas y ecrinas) y **unidades pilosebáceas** Las glándulas sudoríparas secretan sudor y las sebáceas, generalmente en la base del pelo, secretan el sebo cutáneo (*Williams y Barry, 1992*).

La dermis también contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Los vasos sanguíneos juegan un papel muy importante en la regulación de la temperatura corporal, aporte de nutrientes y oxígeno a la piel; además, sirve para eliminar productos de desecho y toxinas; la vascularización es vital para reparar la piel dañada.

Los capilares se encuentran a unos 0,2 mm. de la superficie corporal y, esencialmente, proporcionan condiciones “sink” para la mayoría de las moléculas que atraviesan la barrera cutánea, porque una vez que la sustancia accede a la dermis la sustancia llega a la extensa red capilar que existe en la dermis, que, además están anastomosados, pasa a arteriolas, arterias, llegando a circulación

_____Antecedentes

general. De este modo, la sangre ayuda a garantizar, que la concentración dérmica de un penetrante, esté generalmente próxima a cero y que la diferencia de concentración a través de la epidermis proporcione la fuerza de conducción necesaria para la permeación transdérmica (*Williams y Barry, 1992*).

1.3 Hipodermis

Por debajo de la dermis se encuentra la hipodermis o tejido subcutáneo. En muchas regiones del organismo este tejido celular es de tipo conectivo laxo y contiene numerosas *células adiposas* (*Litter, 1996*). Además de sus propiedades mecánicas, como amortiguador de los traumatismos, y de su capacidad para almacenar energía, esta capa es un importante aislante térmico. La mayor parte de las terminaciones nerviosas cutáneas, vasos sanguíneos y órganos de presión sensorial se encuentran en la hipodermis (*Williams y Barry, 1992*).

1.4 Anejos cutáneos

1.4.1.-Uñas

Las uñas son estructuras planas y elásticas de textura córnea situadas sobre los extremos de las superficies dorsales de los dedos de las manos y de los pies. La parte proximal de la uña, denominada raíz, se implanta en una hendidura de la piel. La parte expuesta constituye el cuerpo de la uña, cuyo extremo se denomina borde libre, la piel se une a la superficie subyacente de la uña formando el hiponiquio (*Williams y Warwick, 1992*).

1.4.2. -Pelos

Los pelos se encuentran en casi todas las regiones de la superficie corporal. Su longitud, grosor y coloración son muy variables, según la zona del cuerpo y la raza del individuo. Un pelo

_____Antecedentes

consta de una raíz o parte implantada en la piel y un tallo, o porción que sobresale de la superficie.

La raíz del pelo tiene un ensanchamiento denominado bulbo piloso que se asienta en una invaginación de la epidermis y de la porción superficial del corión denominado folículo piloso, que tiene dos capas, una externa formada por tejido fibroso, muy vascularizada y una interna, muy adherida a la raíz del pelo que consta a su vez de dos estratos denominados vainas radiculares externa e interna (*Williams y Warwick, 1992*).

1.4.3.-Glándulas sebáceas

Las glándulas sebáceas son pequeñas y saculares y se encuentran en la dermis, son abundantes en el cuero cabelludo y en la cara. Las glándulas sebáceas están formadas por un conducto único, que emerge de un racimo de alvéolos ovales o piriformes. Cada alvéolo está compuesto por una membrana basal que encierra varias células epiteliales y tiene una cavidad llena de materia grasa que constituye el sebo cutáneo. Dado que las células sebáceas producen su secreción a consecuencia la completa degeneración de sus células centrales a estas glándulas se las llama holocrinas (*Williams y Warwick, 1992*).

1.4.4.- Glándulas sudoríparas

Las glándulas sudoríparas se encuentran en casi todas las regiones de la piel y se dividen en dos:

- a) **Glándulas ecrinas:** son las más numerosas. Cada una de ellas está formada por un tubo único cuya parte más profunda se enrolla para constituir un cuerpo esférico u oval, que se sitúa en las capas más profundas del corión o en el tejido subcutáneo y se denomina cuerpo de la glándula. El tamaño de las glándulas es variable, siendo grandes en las regiones donde la transpiración es intensa (axilas). Su número

_____Antecedentes

también varia, son muy numerosas en la zona de las palmas de las manos y plantas de los pies.

- b) Glándulas apocrinas.* Son mayores que las ecrinas y producen una secreción más espesa. Las glándulas apocrinas son de forma tubular y presentan una amplia porción secretora enrollada desembocan mediante un conducto recto, y muy estrecho que corre paralelo a los folículos pilosos cercanos (*Williams y Warwick, 1992*).

A.2. ABSORCIÓN PERCUTANEA

La absorción percutánea de medicamentos puede ser definida como *la absorción de fármacos a través de la piel intacta para enriquecer el sistema circulatorio* (*Yasunori y col., 1994*).

2.1. Etapas de la absorción percutánea

La piel constituye una barrera muy selectiva al paso de sustancias. La epidermis, y dentro de la epidermis, el estrato córneo es el principal responsable de este control (*Barry, 1983*). Además, el flujo de moléculas a través de la piel depende de la naturaleza de la sustancia, coeficiente de reparto vehículo-piel y del coeficiente de difusión de la sustancia difusora a través de la piel (*Yasunori y col., 1994*). En la *figura A.2* se expone un esquema de la absorción percutánea junto con los pasos que se han de seguir. La absorción de los fármacos se produce en tres etapas:

2.1.1. - Liberación del principio activo y difusión

El principio activo contenido en una determinada formulación, tiene que difundir dentro del sistema de administración hasta la superficie cutánea.

Esta etapa viene condicionada por las características del principio activo y del sistema de dosificación.

2.1.2. - Penetración en la capa córnea

El principal obstáculo que se encuentra el fármaco para penetrar a través de la piel son las propiedades de barrera del estrato córneo. Esto está originado, en parte, por la geometría de la estructura interna de los corneocitos y en parte por la resistencia a la difusión de la estructura lipídica extracelular (*Lee y col., 1997*).

2.2. VIAS DE PENETRACIÓN A TRAVES DE LA PIEL

Cuando se administra una sustancia a través de la piel, puede alcanzar los capilares sanguíneos de la dermis a través de de dos rutas fundamentales de acceso: la transepidérmica y la transapendicular (*Figuras A.2*).

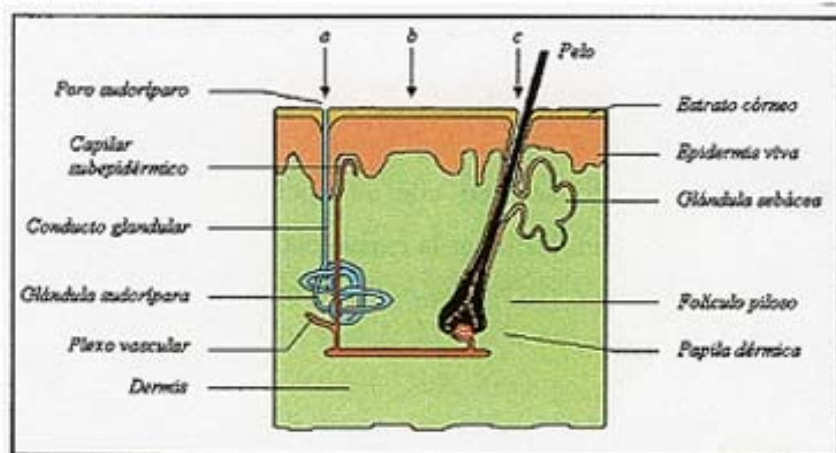
 Antecedentes


Figura A.2 Vías de penetración de los fármacos a través de la piel: a) trans-sudorípara. b) trans-epidérmica y c) trans-folicular

Los fármacos pueden atravesar el estrato córneo siguiendo tres vías:

2.2.1.- Transepidérmica

Las moléculas polares y no polares difunden a través del estrato córneo por diferentes mecanismos. Dos microvías fundamentales existen para la absorción percutánea a través del estrato córneo: la *ruta intercelular* y la *intracelular* (Figura A.3)

a) Intracelular

Las sustancias, ya sean polares o no polares, difunden a través del estrato córneo por mecanismos moleculares diferentes. El estrato córneo se hidrata, acumula el agua cerca de la superficie de los filamentos de las proteínas, y es a través de este agua inmovilizada por donde las moléculas polares pueden pasar a través de la piel.

Las moléculas no polares, por el contrario, probablemente, se disuelven y difunden a través de la matriz lipídica intracelular, no acuosa, que existe entre los filamentos de las proteínas,

 Antecedentes

fundamentalmente, a través de los triglicéridos. (*Scheuplein, 1967*). La energía de activación de las moléculas no polares es algo más baja que la difusión de las moléculas polares (*Idson, 1975*).

b) *Intercelular*

Se piensa que esta, aunque es la mayor barrera que se encuentran los fármacos en su paso a través de la piel, es la ruta de penetración que eligen la mayoría de los fármacos lipófilos para acceder a capas más profundas de la epidermis (*Stoughton, 1989; Hadgraft, 1996*).

Es una ruta tortuosa y la difusión del principio activo se realiza por los canales lipídicos que hay entre las células del estrato córneo, que es la membrana biológica más impermeable.

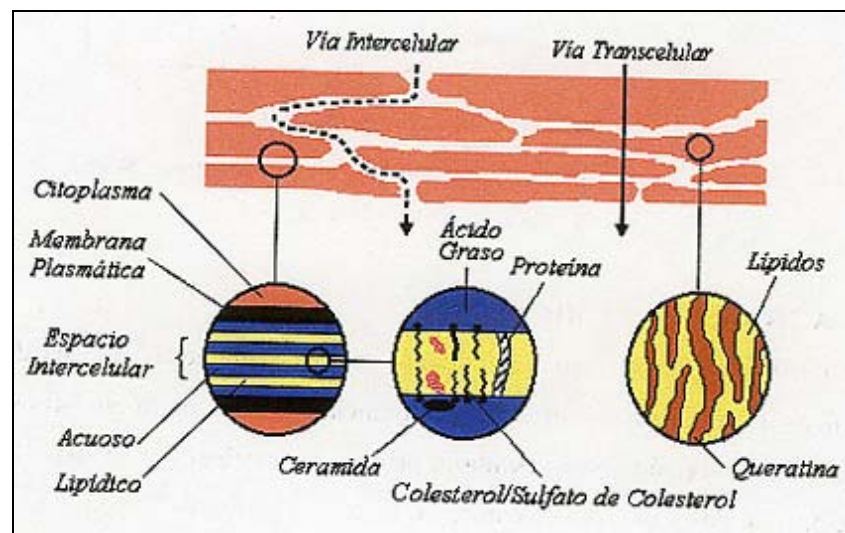


Figura A.3 Vías de penetración a través de la epidermis

Antecedentes

La permeación transepidérmica es compleja, con una gran variedad de **barreras**, una de ellas la de *Rein*, situada entre el estrato córneo y el espinoso (*Denoël y Jaminet, 1971*), se opone a la entrada y salida de sustancias y tiene una alta resistencia eléctrica (*Tregear, 1966*). Su función es evitar el paso de electrolitos y agua. Además, repele los aniones y fija los cationes, por estar cargada electronegativamente.

Es una barrera permeable a moléculas de bajo peso molecular (*Denoël y Jaminet, 1971*). Sin embargo, las macromoléculas parecen atravesarla, aunque a una velocidad muy pequeña (*Tregear, 1966*).

La forma en que penetra el agua a través de la piel ha sido objeto de múltiples investigaciones. Para el paso del agua se ha sugerido que una posibilidad es el camino difusional, de $\sim 800 \mu\text{m}$, el cual puede ser comparado directamente con el grosor del estrato córneo ($15 \mu\text{m}$).

Una de las características más importantes del estrato córneo es la naturaleza compleja de sus lípidos. En la mayoría de las membranas biológicas no hay fosfolípidos. Las ceramidas, el colesterol, el sulfato de colesterol, y los ácidos grasos libres o combinados están unidos en capas estructurales. Los grupos metilenos de las cadenas alquílicas, inmediatamente adyacentes a los grupos de las cabezas polares, son muy rígidos en naturaleza y crean una microviscosidad donde la difusión de las sustancias es lenta. La rigidez de esta región es probablemente un resultado de fuertes interacciones entre las cabezas polares adyacentes de las ceramidas (*Hadgraft, 1996*).

Potts y Francoeur, (1991), utilizan un método “in vitro” para medir los coeficientes de permeabilidad del agua a través del estrato córneo. Lo que hacen es medir, en función de la temperatura, el espectro de transmitancia infraroja del tejido

Antecedentes

cutáneo; demostraron que la permeabilidad del estrato córneo al agua se modifica en proporción directa a la frecuencia vibracional del grupo metileno de los lípidos intercelulares de las cadenas alquílicas. *Golden y col.(1987)* determinan que las temperaturas de transición de la fase lipídica del estrato córneo son bajas y se incrementan por hidratación de la membrana. *Guy, (1995)* indica que el transporte de agua a través del estrato córneo viene determinado por los lípidos, “cemento”, que hay entre los corneocitos; luego, existe a través del estrato córneo, una vía acuosa o polar para el paso de los fármacos; si el agua no sigue esta vía de transporte, en opinión de Guy, no se puede comprender que otros materiales lo puedan hacer así. Si el fármaco sigue esta ruta, difunde a través de la sustancia que rodea a los corneocitos, que es de naturaleza lipídica.

Esta ruta permite el paso, por difusión, de sustancias apolares, lipófilas, que difunden a través de las bicapas lipídicas que rodean a los corneocitos. Las sustancias polares, lo hacen difundiendo a través de las zonas acuosas que están en contacto con las regiones hidrófilas de esos lípidos (*Hatanaka y col, 1990 y Williams y Barry, 1992*).

Para los compuestos iónicos o polares no se conoce muy bien su ruta de transporte, y es posible que una vía paralela a la ruta lipofílica exista en la piel. (*Lee y col., 1997*).

2.2.2.- Transapendicular

Si el fármaco utiliza esta vía de acceso lo hará a través de los anejos cutáneos: *glándulas sudoríparas y sistema pilo-sebáceo*. Ambas alternativas, tienen una contribución escasa a la cinética global de la penetración transdérmica.

Antecedentes

a) Transfolicular

La penetración de las sustancias químicas por el aparato pilosebáceo está ligada a la presencia de un mayor o menor número de folículos pilosos en la piel. Cada folículo piloso lleva asociado una glándula sebácea, que segrega sebo, barrera de protección del estrato basal germinativo. Según *Williams y Barry, (1992)* un centímetro cuadrado de piel humana puede contener 10 folículos pilosos y 15 glándulas sebáceas.

El *sistema pilo-sebáceo*, está constituido por el pelo y la glándula sebácea. La existencia de esta vía de penetración fue demostrada por *Mackee y col. (1943)* quienes piensan que es la óptima para la absorción percutánea, ya que las moléculas sólo tienen que atravesar la capa basal del folículo pilosebáceo. En el aparato pilosebáceo la epidermis se vuelve más delgada, hasta reducirse, al nivel de la base del pelo, a una única capa de células no queratinizadas. Si un fármaco es capaz de difundir en el sebo del folículo pilosebáceo, podrá acceder a la dermis y llegar a la microcirculación sistémica con facilidad. Por vía transfolicular, las partículas se absorben a través de la vaina epitelial (unicelular no queratinizada), que corresponde al estrato basal germinativo, fácil de atravesar. Se puede, así llegar fácilmente a la dermis y a los vasos sanguíneos sin pasar por la barrera de Rein (*Denoël y Jaminet, 1971*).

Sin embargo, hay estudios que muestran que el espacio entre el pelo y su vaina es demasiado estrecho para que pueda haber penetración al nivel de la dermis. Parece que algunos fármacos acceden el organismo atravesando el sebo y, a continuación, penetrando en las células germinativas de las glándulas sebáceas (*Hadgraft, 1996*).

Cuando se hacen ensayos de penetración cutánea, la vía transfolicular es al principio la preponderante pero, una vez se han establecido los gradientes de difusión, la vía

Antecedentes

transepidérmica es la más importante (*Idson, 1975; Hadgraft, 1996*). Pero esta vía sólo representa del 0,15-1,2% del total del volumen de difusión disponible (*Wertz y Downing, 1983*).

Ciertos medicamentos, bastante lipófilos, al disolverse en el sebo, son capaces de superar esa barrera, viendo favorecida su absorción percutánea a través de la glándula. Por esta vía se absorben sustancias que tienen un alto coeficiente de reparto (lípidos/agua), solubles en el sebo. En ciertas circunstancias también es posible que difundan moléculas que se pueden acumular en los folículos pilosos (*Hadgraft, 1996; Denoel y Jaminet, 1971*).

b) Transudorípara

Es la vía menos importante ya que proporciona una pequeña ruta de absorción; según *Williams y Barry, (1992)* un centímetro cuadrado de piel humana puede contener 100 glándulas sudoríparas que pueden actuar como otra ruta difusional. Se cree que la difusión por esta vía sigue el modelo de “difusión por poros” (*Idson, 1975*).

Los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas (endocrinas y apocrinas) representan un camino potencial para superar la barrera epidérmica; su capacidad para la absorción percutánea es mínima, menos del 0,1%, pero a pesar de todo, incrementan la superficie de absorción de la piel (*Carmichael, 1994; Jennifer, 1994*).

Tanto la ruta transfolicular como la transudorípara pueden ser las más importantes para la absorción de iones y para las moléculas de gran polaridad, que tienen una permeabilidad baja a través del estrato córneo (*Williams y Barry, 1992*).

Antecedentes

- Las glándulas sudoríparas producen una sustancia de naturaleza acuosa, sudor, que se vierte al exterior a través del canal que conecta la parte más profunda de la glándula con la superficie de la piel. Este sudor tiene un papel muy importante en la termorregulación corporal.

A través de ese conducto pueden acceder a la dermis sustancias de carácter polar, hidrófilas de bajo peso molecular y que sean solubles en el sudor; así pueden llegar a la base de la glándula sudorípara, que al no estar queratinizada, no ofrece ninguna resistencia a ser atravesada y se producirá la absorción del compuesto. También, como en el caso anterior, al haber poca cantidad de glándulas sudoríparas, en comparación con la superficie que ocupan los corneocitos, esta ruta de acceso de las sustancias a la piel tampoco es significativa.

2.3. Factores que intervienen en la penetración cutánea

Los factores que intervienen en la absorción percutánea son muchos y muy variados, por ello los agruparemos, para realizar una somera revisión de los más significativos, en factores biológicos y factores físico-químicos.

2.3.1.- Factores biológicos

a) Zona de aplicación y estado de la piel

Si existen heridas, la piel estará destruida en mayor o menor medida, y no realizará su función de barrera protectora (Le Hir, 1995). Wester y Maibach, (1992) afirman que cuando la

Antecedentes

piel esta dañada o enferma, la absorción percutánea se incrementa y la habilidad para protegerse de la penetración de sustancias químicas disminuye. Las variaciones en la permeabilidad cutánea dependen del grosor; de la naturaleza de los lípidos del estrato córneo; de la densidad de los apéndices cutáneos; del coeficiente de reparto y de la solubilidad del fármaco entre el vehículo y la piel (Hadgraft, 1996; Berti y Lipsky, 1995).

Según *Gibaldi (1991)* la capa de queratina y los folículos pilosos varía según la zona del cuerpo considerada, por lo que hay que indicar en que condiciones se realizan los estudios de penetración cutánea. Además, no es lo mismo aplicar el medicamento sobre una piel lampiña o hirsuta; o si ésta se ha afeitado y ha sido brusco, pues pueden eliminarse numerosas capas del estrato córneo y aumentar la absorción (*Berti y Lipsky, 1995*). Según *Barry, (1988)*, la difusión decrece en el siguiente orden: plantas de los pies, palmas y dorsos de las manos, escroto y postauricular, axilas y cuero cabelludo, brazo, pierna y tronco.

b) Edad de la piel

La piel de los niños prematuros es más permeable a la absorción de productos porque la función barrera de la piel de los niños prematuros no está completamente desarrollada (*Barry, 1988; Berti y Lipsky, 1995*).

Kalia, y col., (1998) sugieren que esa función se desarrolla en el útero a las 34 semanas de gestación. Los niños que nacen prematuramente tienen velocidades elevadas de pérdida de agua transepidérmica y dificultad para mantener la homeostasis y es también, una puerta de entrada para infección. Establecen que la función barrera completa es indiferente de la edad de gestación y se logra entre 2-4 semanas después del nacimiento. Los resultados sugieren que niños que nacen con pesos ultra bajos (23-35 semanas de edad

Antecedentes

de gestación), el desarrollo completo de su estrato córneo puede requerir, más de 4 semanas

Investigaciones realizadas por *Lund, y col.,(1997)* en pacientes neonatos de UCI, que deben ser monitorizados, los equipos que se sujetan a la piel, al quitarlos y reemplazarlos muy a menudo pueden dañarles la piel, produciendo la ruptura en la función barrera en neonatos de distintas edades de gestación

c) Diferencias entre especies, razas y géneros

Hay diferencias entre la piel humana y la de los animales que se usan en el laboratorio en cuanto a: grosor del estrato córneo, densidad de glándulas sudoríparas y folículos pilosos. La piel más parecida a la humana es la de monos y cerdos, pero la piel que más se usa en los laboratorios es la de los roedores que presenta la característica de ser más permeable en comparación con la piel humana (*Idson, 1975; Barry,1988*)

Wester y Maibach, (1992) admiten que existen diferencias frente a estímulos químicos, en la piel de personas de razas distintas. *Williams y col.,(1991)* sugieren diferencias raciales en la absorción de nitroglicerina transdérmica. En el estudio, donde participan negros, caucásicos y asiáticos, los negros son los que presentan niveles más bajos de absorción. La explicación está en el trabajo de *Berti y Lipsky, (1995)* que encuentran diferencias fisicoquímicas entre la piel de negros y blancos. En los negros la adhesión celular y el contenido de lípidos es mayor.

En cuanto a la influencia del género, *Mattison, (1990)*, estudia la absorción transcutánea durante el embarazo de diversas sustancias y dice que el incremento se produce porque fisiológicamente la hidratación de la piel y el flujo sanguíneo son mayores.

d) Efecto de la circulación

Teóricamente, cambios en la circulación periférica puede afectar a la absorción percutánea. La vasoconstrucción producida por la aplicación de esteroides tópicos retarda la penetración (*Idson, 1975*), y un incremento en el flujo sanguíneo puede reducir el tiempo de penetración (*Barry, 1988*).

e) Grado de hidratación de la piel y modo de aplicación.

La naturaleza del excipiente puede influir en el grado de hidratación de la piel. Un excipiente hidrófobo puede ser oclusivo y mantener muy húmeda la piel subyacente; por el contrario, un excipiente higroscópico puede presentar el inconveniente de reseca excesivamente la piel. *Berti y Lipsky, (1995)* sugieren que la hidratación de la piel aumenta con el agua y detergentes los cuales facilitan la difusión del fármaco. *Idson, 1975*, afirma que la hidratación de la piel es uno de los principales factores que aumentan la penetración de los fármacos.

La hidratación, debida al agua originada en capas epidérmicas profundas o por la acumulación de la perspiración, al aplicar un vehículo o un plástico oclusivos. Bajo esas condiciones el estrato córneo pasa de ser un tejido, que contiene muy poca agua (5-15%) a uno con un 50% de agua, de este modo se incrementa la permeabilidad cuatro o cinco veces. El mecanismo de la hidratación consiste en aumentar el tamaño del poro, lo que provoca una alteración física del tejido, y un cambio en los coeficientes de difusión y de actividad del agente de penetración.

Según *Le Hir, (1995)* el modo de aplicación puede hacerse con una simple extensión, con fricción y masaje. En capas de distinto grosor con frecuencia y tiempo de contacto con la formulación diferente y con o sin oclusión.

Antecedentes

f) Relación Dosis-Respuesta

Se ha visto por diversos autores que aplicaciones múltiples de hidrocortisona incrementan su absorción y biodisponibilidad (*Melendres y col., 1990 y Wester y Maibach, 1992*). La interrelación dosis-respuesta esta definida en términos de: Cantidad (Q) (balance de masas por cada dosis aplicada), Concentración: Q/S unidad de área superficial (S). Frecuencia: exposición intermitente o constante. Tiempo de exposición: período de tiempo durante el cual la piel está en contacto con el fármaco antes de ser retirado de la piel.

g) Metabolismo de la piel

En la piel puede haber fijación, degradación, y metabolismo de sustancias a distintos niveles, por ejemplo: degradación parcial en la superficie de la piel, formación de depósito por fijación del p.a. a estructuras cutáneas y de degradación metabólica ocasionada por sistemas enzimáticos (*Sánchez, 1993*). Esto tiene una aplicación terapéutica importante, ya que se podrían administrar profármacos con características más adecuadas para atravesar la piel y una vez allí sufrir el proceso metabólico que le convierta en el fármaco deseado (*Barry, 1988*). Debido a esta función metabólica de la piel, existen actualmente importantes trabajos de investigación al objeto de poder conocer el papel de la piel como órgano metabólico dado el arsenal enzimático que posee (*Merk y col., 2004 y Gómez-Lechón, 2004*).

2.3.2. Factores Físico-Químicos

Son los que se refieren, fundamentalmente, al fármaco y al vehículo utilizado para su aplicación.

a) Vehículo

En principio la finalidad del vehículo debería ser únicamente depositar al fármaco en el lugar donde debe absorberse (estrato córneo), en las condiciones óptimas

Antecedentes

para que esa absorción tenga lugar, de forma que la misma dependa únicamente de las características físico-químicas del propio fármaco. Sin embargo, el vehículo puede modificar el grado de penetración del fármaco interaccionando con el mismo por afinidad, reteniéndolo y dificultando de ese modo su cesión (*Grandjean y col, 1988*).

También, el vehículo puede interaccionar con los componentes de la membrana modificando su viscosidad y la ordenación de sus constituyentes (*Wiechers, 1989*) o bien puede ejercer su influencia, indirectamente, desarrollando un efecto oclusivo que incrementará el grado de hidratación del estrato córneo, como ya se ha comentado, o un incremento de la temperatura en el tejido cutáneo.

b) Fármaco

Con respecto al fármaco, lo que interesa tener en cuenta es, fundamentalmente, su coeficiente de difusión a través de la piel. Su lipofilia intrínseca, las concentraciones que vamos a utilizar y la influencia del pH sobre la penetración.

c) Coeficiente de difusión

En el paso de las moléculas a través de membranas, la difusión viene determinada por la resistencia que oponga el medio al desplazamiento de la misma. La resistencia que ofrece la membrana es función de las características físicas del penetrante, de la viscosidad y de la temperatura del medio, y de las interacciones químicas producidas entre las moléculas de xenobióticos y los constituyentes de la membrana y el vehículo.

Asumiendo que las moléculas del penetrante son esféricas podemos aplicar la ley de Stokes-Einstein para determinar el coeficiente de difusión (*Flynn y col, 1974*). Por ello, las moléculas de bajo P_m difundirán con mayor facilidad que las de mayor P_m , como han probado *Marzulli y col (1965)*.

Sin embargo, *Scheuplein y Blank (1973)* llegan a resultados opuestos al realizar ensayos con una serie homóloga de alcoholes alifáticos. Ello es debido a que es más influyente la lipofilia del compuesto que su tamaño molecular en la penetración a través de las membranas. Por lo general, la lipofilia de un compuesto aumenta al aumentar su tamaño molecular.

También es importante citar que se pueden producir uniones entre la molécula del penetrante y la membrana, sobre todo si el compuesto presenta grupos polares.. Ello explica el porque moléculas como los antiinflamatorios esteroídicos presenten valores de penetración cutánea bajos, porque sus restos hidrófilos hacen que tengan una elevada polaridad.

d) Concentración de fármaco

En general, según la ley de Fick, la cantidad de sustancia que es capaz de absorberse a través de la piel, en unidad de tiempo y superficie, son proporcionales a la concentración de mismo en el vehículo (*Woolfson y col, 1988*). Sin embargo, esto no es siempre así, porque cuando la concentración del penetrante es muy elevada produce modificaciones en la membrana, o s modifica el coeficiente de reparto entre el vehículo y la barrera cutánea.

Esto se ha visto al estudiar la absorción percutánea de soluciones acuosas diluidas de butanol, . Se ha visto que flujo va incrementándose a medida que aumenta la concentración de butanol , hasta que se llega a un límite, a partir del cual, las cantidades absorbidas, son mayores que lo que predice la ley de la difusión. Ello se debería a la adsorción de la sustancia penetrante en el estrato córneo, cuando esta se aplica en concentraciones elevadas, lo que provoca una expansión de los corneocitos que favorece la difusión.

e) Lipofilia

La lipofilia constituye un parámetro importante en el grado de penetración de un compuesto a través de la piel. Es una característica intrínseca de cada molécula, determinada por su capacidad para formar enlaces de mayor o menor energía con el disolvente en el que se encuentre.

Es muy importante la determinación de la lipofilia del fármaco cuando se hacen estudios de penetración cutánea; la afinidad relativa entre un soluto y el medio acuoso que lo rodea y la membrana cutánea nos va a indicar la absorción a través de la piel de esa sustancia (*Díaz-Sales y col., 1993*).

Existen distintos parámetros para cuantificar la lipofilia de una sustancia. *Teherne (1956)* relaciona la absorción percutánea de diversas sustancias en soluciones acuosas con el coeficiente de reparto éter/agua, y demuestra que el grado de penetración cutánea es mayor cuanto mayor es ese coeficiente. *Blank (1964)*, se aproxima aún más en sus investigaciones con una serie homóloga de alcoholes al establecer que la relación de los coeficientes de reparto con la penetración cutánea es de tipo exponencial.

Esta idea general, sirvió de base para el desarrollo de los conceptos de *Scheuplein (1965 y 1967)* y *Blank (1964)*, quienes establecen un modelo realista para describir las características anatómicas y físico-químicas de la piel como barrera para la penetración. Un coeficiente de reparto elevado, favorable a los lípidos, en principio nos indica que la sustancia es candidata a la penetración cutánea (*Singh y Roberts, 1994*), pero esto no siempre se cumple ya que las sustancias muy lipófilas pueden acumularse en el estrato córneo, lo que dificulta su penetración hacia las capas más profundas de la epidermis.

f) Influencia del pH

Diversos estudios han demostrado que existen diferencias significativas entre la absorción percutánea de un compuesto, según se encuentre en su forma ionizada o no ionizada. Principalmente se absorbe la forma no ionizada, aunque también existe absorción a un pH tal que el compuesto esté totalmente ionizado, tal como demostró *Flynn y Poseman (1971)* empleando fenoles de distinto pKa.

Roberts y col. (1996) estudian la influencia de la presencia de grupos capaces de formar enlaces de hidrógeno, en la molécula de penetrante, en la penetración de éstas a través del estrato córneo. Obtienen en conclusión, que la lipofilia es muy importante en el reparto en el estrato córneo de la sustancia, a partir de soluciones acuosas, pero la capacidad del soluto para formar enlaces de hidrógeno es el principal determinante de su difusión a través del estrato córneo.

A.3.MECANISMO DE PERMEACIÓN

El transporte de moléculas a través del estrato córneo puede ser expresado por la primera ley de Fick:

$$J = \frac{(D \cdot K \cdot \Delta C)}{L}$$

ecuación 1

J = Flujo del fármaco ($\mu\text{g} \times \text{cm}^{-2} \times \text{seg}^{-1}$)

K = Coeficiente de partición entre el estrato córneo y el vehículo del fármaco

D = Coeficiente de difusión del fármaco en el estrato córneo ($\text{cm}^2 \times \text{seg}^{-1}$)

L = Grosor del estrato córneo (cm)

ΔC = Diferencia de Concentración a través de la membrana ($\mu\text{g} \times \text{cm}^{-3}$)

Antecedentes

Las unidades de flujo, se expresan por unidad de área de la piel. Esto significa que la cantidad de fármaco liberado a través de la piel por unidad de tiempo es dependiente del área que cubre el sistema para la liberación transdérmica (*Yasunori y col., 1994; Hadgraft; 1996; Brown y Langer, 1988*).

Las leyes de Fick's se expresan más correctamente en términos de potencial químico de difusión, en lugar de concentración (*Higuchi, 1960*). En un sistema ideal debe haber una relación lineal entre la velocidad de difusión de difusión y la concentración del penetrante. El flujo máximo será cuando la concentración del fármaco se incrementa hasta el límite de su solubilidad. Sin embargo es posible tener sistemas de administración en los que el principio activo, esta a supersaturación; son metaestables. La estabilidad puede incrementarse por un polímero antinucleante apropiado (*Hadgraft, 1996*).

Los estados supersaturados se pueden obtener por mezclas de cosolventes o por sistemas en los cuales los solventes se evaporen. Para ambos tipos de membranas y para la difusión de la piel se ha demostrado que el flujo del fármaco incrementa en proporción directa al grado de supersaturación (*Pellett y col., 1994; Davis y Hadgraft, 1991*).

Las propiedades de permeación de la piel pueden clasificarse en dos tipos: las que comprenden los fármacos lipofílicos donde el coeficiente de permeabilidad se correlaciona con el coeficiente de reparto y las que comprenden fármacos hidrofílicos donde el coeficiente de permeabilidad es casi constante (*Yasunori y col., 1994*). El estrato córneo se puede describir como una membrana con dos vías de penetración una para fármacos lipofílicos a través de los poros y otra a través de los lípidos para fármacos hidrofílicos (*Yasunori y col., 1994*).

Antecedentes

De una serie de estudios Guy, (1995) concluyó que el tamaño molecular y la polaridad de la molécula son factores dominantes que determinan la permeabilidad de la piel. Se miden los coeficientes de permeabilidad de una serie de compuestos y se correlacionan, luego, con propiedades fisicoquímicas tales como el coeficiente de reparto y el tamaño molecular. Las correlaciones que se obtienen se emplean luego para predecir los coeficientes de permeabilidad de otros compuestos de la misma familia, con estructuras semejantes.

El flujo transcutáneo de compuestos a través del estrato córneo está relacionado, en proporción directa, con el gradiente de concentración y puede atribuirse a la difusión pasiva. Compuestos altamente lipofílicos, con bajo peso molecular, demuestran que tienen mayor intervalo de flujo a través del estrato córneo. La alta lipofilicidad del fármaco hace que éste difunda a través de los lípidos, “cemento”, rápidamente pero es más lento cuando ellos se enriquecen de las capas acuosas de la epidermis. Para los compuestos hidrofílicos polares la barrera primaria es en realidad las capas lipídicas externas del estrato córneo. (*Berti, y Lipsky, 1995*)

A.4. MODELOS CINETICOS UTILIZADOS HABITUALMENTE EN LOS ESTUDIOS DE CESION

4.1. Cinética de difusión de Fick a través de membrana (*Wallwork y Grant, 1987; Atkins, 1991; Mérida-Cortijo, 1992; Martín, 1993*)

Según la primera ley de Fick, la cantidad de soluto “M” que atraviesa una sección “s” de una barrera en la unidad de tiempo “t”, resulta ser directamente proporcional al gradiente de concentración, dC/dx:

$$J = \frac{dM}{S \cdot dt} = -D \frac{dC}{dx}$$

ecuación 2

 Antecedentes

donde: J es el flujo de materia que difunde (moles/cm²seg ó g/cm²seg).

M es la masa (g)

S es la superficie de la membrana (cm²)

T es el tiempo (seg)

D es el coeficiente de difusión del principio activo (cm²/seg).

C es la concentración del principio activo (moles/cm³ ó g/cm³).

x es el espesor de la capa de difusión (cm).

El signo negativo hace referencia al sentido opuesto de los vectores de flujo y gradiente de concentración: el coeficiente de difusión "D" o difusividad puede no permanecer constante, cambiando su valor a elevadas concentraciones. También se ve afectado por la temperatura, presión, propiedades del solvente y la naturaleza química del principio activo.

Si queremos conocer el cambio que sufre la concentración de la sustancia que penetra en un punto del sistema, utilizamos la segunda ley de Fick. La concentración de las moléculas que difunden en un volumen determinado, cambia con el tiempo ($\Delta c / \Delta t$), así como el flujo de la cantidad difundida cambia con la distancia ($\Delta J / \Delta x$, en la dirección x).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = - \frac{\partial J}{\partial x}$$

ecuación 3

diferenciando la ecuación 2 con respecto a x, se obtiene:

$$- \frac{\partial J}{\partial x} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right)$$

ecuación 4

al sustituir $\frac{\partial c}{\partial t}$ de la ecuación 3 en la ecuación 4 se obtiene la segunda ley de Fick:

 Antecedentes

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right)$$

ecuación 5

que expresa la difusión sólo en una dirección, x.

La segunda ley de Fick establece que el cambio de la concentración del medicamento con el tiempo en una región determinada, es proporcional al cambio de gradiente de concentración que experimenta en ese punto del sistema. Con la primera ley de este autor, ecuación 2, podemos calcular la velocidad de difusión por unidad de área en el estado de equilibrio dinámico. La segunda ley nos dice como varía la concentración del medicamento a lo largo del tiempo, (para cualquier distancia, x).

En los experimentos de difusión se mantienen constantes las condiciones de gradiente máximo: la concentración en el compartimento receptor es baja, porque la solución en este compartimento se retira constantemente y se reemplaza por solvente fresco. La concentración en el compartimento dador disminuye, y la del receptor aumenta, hasta que se alcanza el equilibrio. Las concentraciones de medicamento a ambos lados de la membrana permanecen constantes, con respecto al tiempo, pero no será la misma en los dos compartimentos.

Si se considera que el proceso de difusión se realiza a través de una membrana que separa los dos compartimentos de una celda de difusión, de área "S" y espesor "h", y que la concentración en la parte izquierda y la derecha de la membrana son "C₁" y "C₂" respectivamente (Figura A.4.1.), la primera ley de Fick se podría expresar como:

$$\frac{dM}{S \cdot dt} = D \frac{(C_1 - C_2)}{h}$$

ecuación 6

 Antecedentes

donde $(C_1 - C_2) / h$ se aproxima a dC/dx . El gradiente $(C_1 - C_2) / h$ en la membrana se puede asumir como constante para un estado "cuasi" estacionario.

Las concentraciones " C_1 " y " C_2 " en la membrana no se conocen pero se pueden sustituir en función del coeficiente de partición " k ":

$$C_1 = K.C_d$$

$$C_2 = K.C_r$$

ecuación 7

Donde " C_d " es la concentración del principio activo en el compartimento dador, situando a la izquierda de la membrana y " C_r " es la concentración del principio activo en el compartimento receptor, situado a la derecha de la membrana.

Sustituyendo la ecuación 7 se obtiene:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{D.S.K.(C_d - C_r)}{H}$$

ecuación 8

Si existen condiciones "sink" $C_r = 0$

$$\frac{dM}{dt} = \frac{D.S.K.C_d}{h} = P.S.C_d$$

ecuación 9

siendo:

$$P = \frac{DK}{h}$$

ecuación 10

El coeficiente de permeabilidad " P " tiene unidades de velocidad lineal (cm/seg).

El cálculo del coeficiente de permeabilidad " P " es difícil de realizar de " D ", " K " y " h ", y sin embargo resulta relativamente sencillo utilizando datos de cantidades difundidas " M " en un tiempo determinado " t ". Integrando la ecuación 9, en la que se considera " C_d " constante, se obtiene:

$$M = P.S.C_d.t$$

ecuación 11

 Antecedentes

expresión que permite determinar el valor de “P”, conocidos “S” y “C_d”.

Cuando un sistema de liberación de esta naturaleza presenta como compartimento dador una solución sobresaturada con exceso de principio activo al estado sólido, fácilmente se cumple esta aproximación resultando cinéticas de cesión de orden cero.

Si por el contrario “C_d” cambia apreciablemente con el tiempo, resulta conveniente establecer la relación entre la cantidad de principio activo “M_d” y el volumen del compartimento “V_d”, de forma que:

$$C_d = \frac{M_d}{V_d}$$

ecuación 12

Sustituyendo la ecuación 12 en la 9 e integrando y tomando logaritmos se obtiene:

$$\log C_d = \log C_{d0} - \frac{P \cdot S \cdot t}{2,303 V_d}$$

ecuación 13

Ecuación que también nos permite obtener “P”, conocidas “S” y “V_d”.

Esta expresión sería aplicable a una forma de liberación en que no existe exceso de fármaco al estado sólido, y la velocidad de cesión disminuye de forma exponencial, manifestándose una cinética de orden uno.

En cualquier caso, el proceso de difusión puede no ser continuo desde el principio, existiendo un período en el cual se estabilizaría el gradiente de concentración a ambos lados de la membrana, período conocido como tiempo de latencia “t_L”:

$$t_L = \frac{h^2}{6D}$$

ecuación 14

4.2. Cinética de difusión de Higuchi (Higuchi, 1960 y 1961; Martín, 1993)

El modelo propuesto por Higuchi, 1960 y 1961 permite expresar la cesión de un fármaco homogéneamente disperso en una matriz polimérica. En este modelo se considera que el fármaco se disuelve en la matriz y difunde a través de ella. Para el desarrollo de este modelo, Higuchi parte de la primera ley de Fick, expresada de la siguiente forma:

$$\frac{dM}{S \cdot dt} = \frac{dQ}{dt} = \frac{Dx C_s}{h}$$

ecuación 15

donde dQ/dt es la velocidad de liberación del fármaco por unidad de área expuesta de la matriz.

A medida que el soluto es liberado de la matriz (figura A.4.2.), el espesor a través del cual se produce el mecanismo de difusión, “h”, se hace mayor. De esta forma, con el tiempo, el límite de separación entre la matriz cargada y vacía va retrocediendo progresivamente hacia el interior.

Higuchi, considerando que la distribución del fármaco en la capa de difusión disminuye de forma lineal entre “ C_s ” y cero (condiciones “sink”), calcula la cantidad infinitesimal liberada, “ dQ ”, cuando la capa límite de separación se traslada una distancia, “ dh ”, mediante la siguiente expresión:

$$dQ = A \cdot dh^{-1/2} \cdot (C_s \cdot dh).$$

ecuación 16

“ C_s ” es la solubilidad ó la concentración a saturación del principio activo en la matriz, y “ A ” es la concentración total (cantidad por unidad de volumen), disuelta y sin disolver, del principio activo en la matriz.

 Antecedentes

Sustituyendo el valor de “dQ” en la ecuación 15, se obtiene:

$$\left(A - \frac{1}{2}C_s\right)dh = \frac{D \cdot C_s}{h} \cdot dt$$

ecuación 17

y por integración:

$$t = \frac{2A - C_s}{4 \cdot D \cdot C_s} \cdot h^2 + C$$

ecuación 18

Expresión que relaciona el espesor de la capa de difusión “h” con el tiempo durante el cual se está produciendo la cesión del fármaco. El valor de la constante “C” se puede calcular a tiempo cero en el que “h” es también cero. Finalmente despejando “h” resulta la siguiente expresión:

$$h = \sqrt{\frac{4D \cdot C_s \cdot t}{2A - C_s}}$$

ecuación 19

El cálculo de la cantidad de fármaco liberado, “Q”, hasta tiempo “t”, se obtiene por integración de la ecuación 16:

$$Q = \frac{hA - 1/2}{(hC_s)}$$

ecuación 20

Sustituyendo la 19 en la 20 obtenemos la clásica ecuación de Higuchi:

$$Q = \sqrt{D(2A - C_s)C_s \cdot t}$$

ecuación 21

Como habitualmente $A \gg C_s$ la ecuación 21 se reduce a la siguiente expresión:

$$Q = \sqrt{2A \cdot D \cdot C_s \cdot t}$$

ecuación 22

Esta aproximación permite establecer que la cesión va a depender, directamente, de las características de solubilidad del soluto en la matriz, así como de la concentración del mismo en el sistema.

4.3. Análisis Cinético de Peppas (Peppas, 1985)

Este análisis cinético permite estudiar los datos obtenidos en los ensayos de cesión realizados con sistemas poliméricos.

A partir de la segunda ley de Fick aplicada a la difusión de solventes en matrices poliméricas e integrando la ecuación bajo condiciones definidas (condiciones sink perfecto...), Crank, 1975, obtiene una expresión compleja que permite el cálculo de la fracción liberada (M_t/M_∞) en función del tiempo "t".

Si se considera esta ecuación a tiempos cortos en los que la fracción cedida resulta inferior a 0,6, se simplifica notablemente esta expresión, obteniéndose:

$$M_t/M_\infty = K\sqrt{t}$$

ecuación 23

donde: K es una constante dependiente de las características estructurales y geométricas del sistema.

t es el tiempo

M_t Cantidad de medicamento en función del tiempo

M_∞ es la cantidad total inicial del medicamento en el vehículo

Peppas, con el fin de poder establecer el mecanismo predominante en el proceso de cesión, y manteniendo las condiciones indicadas, propone la utilización de la siguiente ecuación general:

$$M_t/M_\infty = K t^n$$

ecuación 24

siendo "n" un parámetro cuyo valor indica el proceso que predomina en la liberación del principio activo.

_____Antecedentes

En la tabla A.5.3 se recogen los mecanismos implicados para los posibles valores de “n”.

Tabla A.4.3. Significación del parámetro “n”.

<i>N</i>	<i>Mecanismo de Transporte</i>	<i>dM_t/dt como función del tiempo</i>
0,5	Difusión de Fick	$t^{-0,5}$
$0,5 < n < 1$	Transporte anómalo (no Fickiano)	t^{n-1}
1	Transporte Caso II	Orden 0 (tiempo dependiente)
$n > 1$	Transporte Super-Caso II	t^{n-1}

A. 5 SISTEMAS TRANSDERMICOS

5.1. Introducción y definición

La administración tópica de fármacos de acción sistémica es una práctica relativamente reciente. Al constituir la piel la barrera protectora del organismo, sólo se utilizaba para preparados dermatológicos de acción local (*Sánchez Morcillo, 1993*). Posteriormente, se pone en evidencia su permeabilidad y posibilidad de ser atravesada por determinados agentes, resultando en muchos casos, una vía de administración eficaz para fármacos destinados a ejercer una acción sistémica. Para ello, el fármaco aplicado tópicamente debe absorberse, pasar a circulación sanguínea, y finalmente llegar a los tejidos “diana” (*Dasta y col., 1982*), que, normalmente, están distantes del punto de administración del fármaco.

_____Antecedentes

En principio, los agentes activos se incorporan a formulaciones semisólidas, con los inconvenientes inherentes, y a finales de 1970, al disponerse de una tecnología adecuada para la administración, fiable y reproducible, de dichos principios a través de la piel intacta, aparecen los denominados Sistemas Terapéuticos Transdérmicos (*Langer, 1990*). Estos sistemas, de forma general, se pueden definir como “Formas de dosificación con cesión continua de una o más sustancias medicamentosas, con una velocidad programada y para un determinado período de tiempo, con acción sistémica o específica en un órgano determinado”. (*Sánchez Morcillo, 1993*)

5.2 Ventajas y desventajas de la administración transdérmica

Según Segot-Chiq y col., 1985; Barry, 1987; Chien, 1992; Del Pozo, 1993; Carmichael, 1994; Jennifer, 1994; Berti y Lipsky, 1995 y Guy, 1996 las principales ventajas de la administración transdérmica son:

- 1) El fármaco entra en la circulación sistémica sin sufrir el efecto del primer paso hepático, evitando así su posible destrucción y la formación de metabolitos causantes de efectos secundarios. Adicionalmente, el medicamento evita las enzimas presentes en la pared del intestino.
- 2) Además se consigue una correcta dosificación por parte del paciente, ya que solo necesita aplicar el fármaco diaria o semanalmente en lugar de hacerlo varias veces al día como ocurre con la administración oral. También se consigue un buen cumplimiento cuando hay que aplicar una posología que implique dosis no muy habituales e infrecuentes; con los los sistemas transdérmicos lo podemos conseguir ya que proporcionan tratamiento para períodos de entre uno y siete días, reduciendo la frecuencia y magnitud de la dosis a administrar.

Antecedentes

- 3) Mediante la administración percutánea se puede conseguir que el fármaco llegue, por vía sistémica, al tejido u órgano donde queremos que ejerza su efecto terapéutico. Por esta vía los niveles de fármaco en el cuerpo se mantienen constantes, prolongados y efectivos.
- 4) En la administración percutánea se pueden utilizar fármacos con bajo índice terapéutico, es decir, p.a. en los que la concentración plasmática tóxica está próxima a los niveles clínicos. Los fármacos con pequeña ventana terapéutica que se administran oralmente causan efectos desagradables y amplias fluctuaciones en los niveles plasmáticos.
- 5) También se pueden conseguir niveles plasmáticos controlados de fármacos potentes y cuando se presenta la toxicidad puede interrumpirse la administración. Con estos sistemas se tiene el control total de la cesión del fármaco, ya que hay la posibilidad de eliminación del sistema de administración de forma instantánea, en caso de que fuese necesario. Sin embargo el estrato córneo debe continuar con la liberación de moléculas a los tejidos por algún tiempo después de retirarse el sistema.
- 6) Es la ruta efectiva en pacientes que les de náuseas ingerir medicamentos o en pacientes que comienza a tener la medicación crónica.
- 7) Se evita la inactivación gastrointestinal con el cambio de pH, comidas, enzimas digestivas, motilidad variable y tiempo de tránsito
- 8) La terapéutica cutánea suele ser de interés, como coadyuvante de otros tipos de medicación y en otras ocasiones es la única vía para paliar dichas manifestaciones patológicas
- 9) Se pueden utilizar principios activos de semivida muy corta empleados en tratamientos de larga duración con lo que se

_____Antecedentes

favorece el cumplimiento de la posología por parte del paciente, posibilita la eliminación del sistema de administración de forma instantánea si fuese necesario.

Entre las principales desventajas de la administración transdérmica están (Goldstein, y col., 1978; Hogan y Maibach, 1990; Carmichael, 1994; Jennifer, 1994; Berti y Lipsky, 1995)

- 1.- Cuando el fármaco es hidrosoluble y, si la condición patológica se encuentra en las capas profundas de la epidermis o en la dermis, se puede requerir la administración sistémica. Por ejemplo los agentes antibacterianos y antimicóticos son a menudo más efectivos en las infecciones de la piel cuando se dan por vía oral o por sistémica que cuando se aplican en la superficie de la piel.
- 2.- Absorción de sustancias tóxicas a través de la piel. A menudo se producen efectos tóxicos por la absorción accidental a través de la piel de sustancias muy liposolubles que tienen diversos usos industriales por ejemplo: el tetracloruro de carbono y otros solventes orgánicos penetran por esta vía y pueden llegar a ocasionar efectos tóxicos graves, ocurre lo mismo con los fosfatos orgánicos y otros insecticidas nicotínicos, entre otros.
- 3.- Los sistemas de liberación transdérmicos pueden presentar reacciones adversas, que pueden ser sistémicas, intrínsecas al fármaco, o locales, en el sitio de aplicación. La absorción de los fármacos puede crear problemas de sensibilidad de la piel como dermatitis, eritema y quemaduras, las reacciones eccematosas que se presentan, se pueden tratar con esteroides tópicos. También se puede presentar sensibilidad por contacto: alergias y reacciones específicas de cada fármaco.

Respecto a esta desventaja de los sistemas transdérmicos, Thacharodi y Panduranga, (1995), estudian un sistema transdérmico utilizando un polímero natural, el chitosan y como

Antecedentes

fármaco modelo, el propranolol y observe que cuando en los sistemas transdérmicos se usan polímeros naturales, la mayoría de las reacciones adversas que se producen en la piel pueden minimizarse.

- 4.- Esta vía no puede utilizarse para fármacos que necesiten altos niveles sanguíneos, debido a la poca absorción que se produce a través de la piel.
- 5.- Además el uso del parche puede resultar incómodo y poco económico.

5.2.1. - Ventajas y desventajas en relación con otras formas de liberación tópica

Estos sistemas de aplicación tópica, actúan de soporte de principios activos de acción sistémica, con liberación programada. El sistema transdérmico ideal debe liberar una cantidad de medicamento por unidad de superficie, inferior a la que deja pasar la región menos permeable de la piel. (Ranade, 1991). Los dispositivos transdérmicos tienen ventajas y desventajas, a parte de las que hemos comentado, que enumeramos a partir de los datos de distintos autores (Wester y col., 1983; Guy y Hadgraft, 1987a; Kydonieus A.F. 1987; Miyajima y col., 1987; Nakashima y col., 1987; Yeung y col., 1987; Swarbrick, 1996).

Las principales ventajas de los sistemas transdérmicos en relación con otras formas de liberación tópica ,además de las expuestas en el punto anterior son:

- Σ Liberación controlada del principio activo, se pueden conseguir niveles en sangre del principio activo más sostenidos, constantes y mejor controlados.
- Σ Dado los mejores perfiles de niveles en sangre que se obtienen con estos sistemas, hay una disminución de los efectos secundarios.

_____Antecedentes

- Σ Se produce una reducción en las variaciones inter e intra individuales.
- Σ Comodidad en la administración. Tiene buena acogida por parte del paciente que ve disminuir el número de veces que tiene que recibir el principio activo, pudiendo colocárselo personalmente y con gran facilidad.
- Σ Se pueden usar especies químicas que son precursores de fármacos que pasan a la forma activa por la acción de las enzimas existentes en la epidermis.

Como consecuencia de todas estas ventajas, podemos decir que estos sistemas aportan un importante aumento de la eficacia del principio activo.

Por otra parte los sistemas transdérmicos presentan algunos inconvenientes (además de los mencionados.); derivados principalmente de la acción barrera de la piel en relación con otras formas de liberación tópica.

- Σ Solo un pequeño número de principios activos puede emplearse como principio activo con posibilidad de atravesar la piel.
- Σ El fármaco debe tener una gran actividad ya que las dosis diarias no sobrepasaran los 10 mg, prefiriéndose, incluso, aquellas que sólo necesitan 5 mg.
- Σ Los principios activos deben tener un coeficiente de reparto lipofilia/hidrofilia tal que les permita atravesar, en cantidad razonable, el estrato córneo.
- Σ El tamaño molecular debe ser del orden de 600 dalton.
- Σ Otra limitación importante es lo que se ha llamado efecto de primer paso a través de la piel, debida a la biotransformación de los fármacos por los microorganismos presentes en la superficie de la piel y a las enzimas de la epidermis.

5.3. Componentes de los sistemas transdérmicos

5.3.1. - Membrana Impermeable

a) Concepto

Si atendemos a las definiciones de membrana que nos proporciona el Diccionario de la Real Academia Española, 1984, comprobamos que en todas ellas existe la idea de *membrana biológica, lámina o capa delgada y flexible, sin que aparezca ninguna alusión a las membranas artificiales.*

Al repasar la bibliografía nos encontramos con una escueta definición de membrana dada por *Friedlander y Rickles, (1965)* que la describe como una barrera imperfecta entre dos fluidos

Flynn y col.,(1974) separan estos dos conceptos y definen, por separado, membrana y barrera. **Membrana** es una *lámina de material sólido o semisólido que resulta insoluble en el medio circundante y que separa dos fases que son, normalmente, pero no necesariamente fluidas. Barrera* es la *región o conjunto de regiones de un sistema, contiguos o físicamente separados, que ofrece una resistencia finita al transporte de una sustancia, desde un punto en una región de un sistema a otro punto localizado a cierta distancia, bajo la acción de un potencial de difusión.*

Hay otra definición dada por *Reboiras, (1972)* más adecuada. Este autor dice que *es una fase que actúa como barrera al flujo de especies moleculares o iónicas presentes en los líquidos o vapores que están en contacto con sus dos caras.* Esta definición pone de manifiesto las dos características principales de las membranas, su diferente resistencia al flujo de moléculas o iones que da lugar a diferentes velocidades de transporte y la necesaria existencia de potenciales de distinta índole que actúan como fuerzas impulsoras para que exista un flujo.

b) Clasificación

Las membranas se pueden clasificar atendiendo a diversos aspectos:

1.- Por su estado físico

Sólidas: Las membranas sólidas se encuentran en este estado y tienen rigidez y tendencia a mantener forma y volumen. La mayoría de las membranas utilizadas pertenecen a este grupo.

Líquidas: Tienen las características de este estado, se adaptan a la forma del recipiente que las contiene, pueden fluir libremente, tienen volumen propio y son difícilmente comprimibles. Las membranas líquidas presentan algunas ventajas como *homogeneidad* y *orientación interfacial* siendo, también, fáciles de elaborar, pero es difícil de mantener su estabilidad y el control de la membrana durante la operación. Mientras que el espesor de una membrana sólida permanece constante, el de una líquida puede variar durante el curso de la operación modificando la permeabilidad y la selectividad (*Rosano y col., 1961*).

2. - Por las fases que las constituyen

Membranas Homogéneas: Son las formadas por una sola fase.

Las membranas serán *SOLIDAS HOMOGENEAS* cuando, formadas por una fase sólida única, la lámina presente unas características uniformes, siendo normalmente transparentes, translúcidas. Ejemplos de este tipo de membranas las tenemos en las membranas de oro, paladio, aluminio, plata, grafito, cobre, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, nylon, etc. (*Friedlander y Rickles, 1966*).

Por su parte una membrana *LIQUIDA HOMOGÉNEA* estará formada por una capa líquida única, ya sea de una sustancia pura o de una disolución, formando una sola fase.

Membranas Heterogéneas: Una membrana será heterogénea cuando contenga dos o más fases en su composición. Las *SOLIDAS HETEROGÉNEA*, que presentan dos o más fases en su composición; cada una de ellas cumple una función determinada. Por otra parte, se forman membranas *LIQUIDAS HETEROGÉNEAS* cuando existe más de una fase en la membrana. (*Friedlander y Rickles, 1966*)

3. Por la morfología de los poros

Concepto de poro

Al describir la estructura física de las membranas sólidas, aparece casi siempre como una constante, la existencia de poros, de tamaño suficiente como para permitir el paso de ciertas partículas a su través. De manera general el *Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española, 1984* nos dice que significa vía, pasaje, y en segunda acepción, lo define como intersticio que hay entre las partículas de los sólidos de estructura discontinua.

En las membranas poliméricas, la existencia de poros en su estructura está admitida por muchos autores y, quizás, la definición de poro más concisa se deba a *Paulson y col., (1984)* al describirlos como “*aberturas en la matriz de la membrana*”.

De acuerdo con *Wrasidio y Mysels, (1984)*; las membranas sólidas, homogéneas o heterogéneas, se pueden subdividir en *simétricas* o *asimétricas* según el

tamaño del poro se mantenga constante o varíe a lo largo del espesor de la membrana.

Membranas Simétricas: Son aquellas en las que el diámetro del poro se mantiene constante a lo largo de todo el espesor de la membrana.

Al grupo de membranas sólidas homogéneas simétricas pertenecen las membranas utilizadas en *ultrafiltración y diálisis* fabricadas con materiales orgánicos o inorgánicos (*Beck y Schultz, 1970; Kesting y col., 1983; Paulson y col., 1984*). Las membranas sólidas heterogéneas simétricas las tenemos descritas por *Flynn y col., (1971)*; por ejemplo, consisten en membranas de dimetilpolisiloxano conteniendo sílice como fase dispersa para darles resistencia mecánica.

Membranas Asimétricas: Son aquellas en las que el diámetro del poro varía a lo largo del espesor de la membrana.

Las membranas sólidas homogéneas asimétricas presentan, a su vez, diferentes tipos según la forma de asimetría de los poros, las más conocidas son las denominadas membranas con “*piel*”. En estas membranas los poros más finos, cercanos a la superficie superior, se forman dejando que las capas superficiales de polímero se sequen exhaustivamente, de suerte que aparece la “*piel*” en forma de un denso revestimiento superficial de unas 0,2 μm . de espesor. El resto de la película es de mayor espesor, (unas 100 μm), y de estructura esponjosa, de celda abierta (*Friendlander y Rickles, 1966*).

Entre las membranas sólidas heterogéneas asimétricas tenemos las utilizadas en *ósmosis inversa* que presentan una “*piel*” de *acetato de celulosa* y una estructura

esponjosa del mismo material reforzada con silicato de aluminio recubierto (*Baum y col., 1972*).

Wang y col., (1998) utilizan membranas asimétricas de poli(4-metil-1-penteno) (TPX), que se obtienen por el método de inversión secado/húmedo para realizar el estudio de la liberación transdérmica de nitroglicerina (NTG) a través de dichas membranas. Los resultados indican que el flujo de NTG a través de membranas simétricas (TPX) depende en gran medida de la estructura de la membrana. Esa estructura se puede modificar mediante la adición de diferentes clases de no solventes en la solución de vertido y ajustando, también, las cantidades que se adicionan, así se obtienen membranas que proporcionan diferentes velocidades de liberación de NTG. Además, encuentran que la velocidad de disolución de la NTG de un parche prototipo de TPX es comparable al parche de NTG comercial Transderm-Nitro

4. Por la capacidad de Intercambio Iónico

Membranas Inertes: Son las que pueden ser atravesadas por todos los iones, cualquiera que sea su signo y están formadas por materiales sin carga que forman una fase inmisible con las soluciones que separan (*Eisenman y col., 1967*).

Membranas Iónicas: Se caracterizan por la presencia de grupos iónicos que dan lugar a espacios cargados eléctricamente. Tienen la propiedad, cuando se interponen entre dos disoluciones electrolíticas, de permitir el paso a su través de iones de un signo particular y rechazar a los de signo contrario (*Reboiras, 1972*)

Antecedentes

Jenke, (1989) realiza ensayos con una membrana iónica, que se emplea ampliamente en cromatografía, y como principio activo utiliza el clorhidrato de dopamina a pH 4,0; los resultados que se obtienen dicen que la liberación del fármaco es discreta, pero continua. Este investigador propone que para incrementar el flujo hay que controlar la temperatura y la solución reservorio del fármaco.

Según investigaciones de *Åkerman, y col., (1998)*, las membranas de intercambio iónico, porosas, tienen aplicaciones en los sistemas de liberación transdérmicos. La permeabilidad de esas membranas puede ser controlada por factores como son el pH y la fuerza iónica; pero también las propiedades del fármaco tienen un papel importante en el proceso de permeación. Se demuestra la influencia, de la carga, la lipofilia y el peso molecular en el flujo difusional de fármaco.

Las membranas que se utilizan son de *polifluoruro de vinilideno* (PVDF) a las cuales se les adiciona ácido poliacrílico (PAA) irradiando con electrones. Las membranas son catiónicas, selectivas, debido a la ionización parcial de los grupos carboxilos colocados en las cadenas de PAA.

Los fármacos ensayados son propanolol, cimetidina, ftalidamida, cafeína, salicilato sódico, timolol y manitol. A bajo pH los poros de la membrana están abiertos y el fármaco puede difundir a través de la membrana fácilmente. Sin embargo a pH 7,0 los poros se bloquean y el flujo difusional de las moléculas de fármacos, ya sean moléculas grandes o pequeñas, decrece.

Antecedentes

Cuando se estudia la influencia de la carga del fármaco en la difusión de los fármacos a través de las membranas el resultado es que las membranas de PAA-PVDF facilitan el transporte de fármacos catiónicos y repele los aniónicos.

Las membranas iónicas sólidas se pueden subdividir en:

Membranas Disociada: Cuando el poro de una membrana sólida es lo suficientemente ancho para que no existan interacciones entre las cargas de la pared y los contraiones de la disolución existente en el poro, las membranas se denominan *disociadas*. (Eisenman y col., 1967).

A este grupo pertenecen: los polímeros con pocos entrecruzamientos, el colodión húmedo, los minerales poco compactados y los minerales divididos (Garrels y col., 1962).

Membranas Asociadas: Cuando el poro de la membrana es tan pequeño que no supera el tamaño del agua líquida, es decir, inferior a 1 nm. de diámetro, la situación se parece a una migración iónica de un intercambiador a otro intercambiador. En este caso la membrana se denomina *sólida Iónica Asociada*. El límite de este tipo de membrana se presentaría cuando el agua estuviera totalmente excluida del intercambiador y los poros fueran los intersticios de la matriz anhidra. En este tipo de membrana cobran el máximo interés las interacciones entre las especies móviles y los intercambiadores iónicos. Como ejemplo de este tipo de membranas tenemos las de polímeros orgánicos muy entrecruzados, las de colodión seco, los electrodos de

Antecedentes

vidrio muy estrecho y los minerales altamente compactados. (*Eisenman y col., 1967*)

Por el signo de la carga que portan:

Las iónicas se pueden subdividir por el signo de las cargas que portan en:

Membranas Aniónicas: Se denominan así a las cambiadoras de cationes, a las que tienen grupos fijos negativos, o un catión como contra-ión móvil.

Membranas Cationicas: Otra denominación es *cambiadoras de aniones*.

Se les denomina así a las que tienen grupos fijos positivos o un catión como contra-ión móvil (*Friedlander y Rickles, 1966*).

Una de las membranas de este tipo; de amplio uso en los últimos tiempos, es el quitosano, que es un polímero natural policatiónico.

Thacharodi y Panduranga. (1993) estudian en celdas de difusión de Franz, membranas de quitosano, con la cadena entrecruzada con diferentes concentraciones de glutaraldehído, y como fármaco hidrofóbico modelo, utilizan el nifedipino, y observan que cuando se incrementa el grado de entrecruzamiento de la cadena, disminuyen: el coeficiente de difusión, el coeficiente de reparto y el coeficiente de permeabilidad.

5. Por la existencia o no de poros

Membranas no porosas: *Peppas., (1984)* en su trabajo sobre difusión de medicamentos a través de polímeros, indica que las membranas poliméricas, denominadas *no porosas* no son las que no presentan poros, sino, las que tienen poros de tamaño molecular muy pequeños,

normalmente comprendidos entre 1 y 10 nm, y es el espacio que queda entre las cadenas macromoleculares que conforman el polímero el que actúa como elemento de control en la cesión de medicamentos.

Membranas Microporosas: *Beck y Schultz, (1970)* las define como aquellas que contienen un número importante de poros (10^{10} a 10^{11} poros/cm²), de un tamaño muy pequeño (0,009 a 0,06 μ m).

El término microporoso también lo utiliza *Peppas* para describir membranas con pequeños poros, de diámetro comprendido entre 10 y 50 nm., llegando incluso a 1nm. Para este autor, la estructura del poro es el principal parámetro que gobierna el paso de un medicamento a través de las membranas, pues la absorción de sustancia a través del poro y el tamaño relativo entre el medicamento y el poro hace del polímero un factor importante en el proceso global de transferencia.

Este tipo de membranas se ha utilizado mucho en la fabricación de comprimidos recubiertos. Por ejemplo, *Zannou y col., (1998)* elaboran comprimidos de metilprednisolona como principio activo (bomba osmótica) de liberación sostenida en los que utilizan como excipiente osmótico (SBE)_{7M}- β -CD que actúa como solubilizante y para la cubierta emplean *etilcelulosa* como membrana microporosa; en los experimentos que realizan para estudiar la membrana, utilizan celdas de difusión Side-Bi-Side®. Los resultados demuestran que la permeabilidad efectiva de la membrana decrece, significativamente, cuando la concentración de (SBE)_{7M}- β -CD se incrementa, además también advierten, que la prednisolona se transporta, en gran cuantía, a través de la membrana microporosa .

Membranas porosas: Su propia denominación define a estas membranas. Son las que presentan aberturas en su estructura que permite el paso de materia a su través. En este apartado podemos incluir a las membranas utilizadas en los fenómenos de ósmosis inversa, *ultrafiltración y diálisis*.

5.3.2. Reservorio: Principios Activos y Excipientes

Según *Carmichael, 1994; Jennifer, 1994; Guy, 1996; Swarbrick, 1996* hay una serie de requisitos que deben cumplir los principios activos y los excipientes que se utilizan en sistemas transdérmicos:

Peso Molecular bajo. La FDA exige que sea inferior a 320 Daltons, ya que el intervalo de difusión a través de la piel decrece cuando se incrementa el tamaño molecular *Tamaño molecular* pequeño (<500 daltons). *Coefficiente de reparto* adecuado. *Punto de fusión ó punto de ebullición* bajo. Para que se produzca una buena absorción, el *fármaco* debe tener una *acción farmacológica potente y no irritante*, dado que el tamaño del parche no puede exceder de 50 cm² (para que sea práctico, económico y por razones estéticas). La cantidad total de fármaco que se libera no puede exceder de 15 mg/día. *Necesidades clínicas* (Administración prolongada y reducción de la dosis). Debe ser *estable a las enzimas* que se encuentran en la piel. *Polaridad* Propia No se debe *unir* significativamente a proteínas. Buen balance de solubilidades aceite en agua.

El fármaco debe ser efectivo, cuando se liberan bajas concentraciones en un largo período de tiempo, porque la piel presenta una excelente resistencia a la difusión del fármaco. El fármaco *no debe producir irritación* y si lo hace debe ser la más baja posible.

Actualmente están registrados diversos sistemas transdérmicos de clonidina, escopolamina, estradiol, dininatro de isosorbide,

Antecedentes

fentanilo, indometacina, nicotina, nitroglicerina, testosterona, y se ensayan otros fármacos cardiovasculares que ofrecen una atractiva vía de administración mediante el sistema transcutáneo, como por ejemplo el timolol agente beta bloqueante que está sometido al efecto de primer paso en su metabolismo. El principio activo se incorpora en una matriz de Plexigel 50W en concentraciones de 30 mg y 60 mg, en una superficie de 25 cm². Cuando la concentración es de 30 mg/25 cm²; el máximo nivel sanguíneo que se alcanza es de 10 ng/ml y para la concentración de 60 mg es de 20 ng/ml (*Guy y Hadgraft, 1987a*).

Las hormonas, como el estradiol (Oesclim® y Estraderm®) testosterona (Andromer® y Testoderm®) y la progesterona, que tienen la ventaja, de ingresar, a través de la mucosa, directamente en su lugar de acción y en la dosis predeterminada excluyéndose, así, su penetración indeseable en otros órganos (*Plate, 1986; Ranade, 1991*).

Miyajima y col., 1987 han estudiado otra sustancia activa, el antivírico 9 (arabinofuranosiladenina, Ara-A); con diferentes tipos de membrana reguladoras de la cesión, tales como la poli (2-hidroxietilmetacrilato) y copolímeros de estireno (N-vinil pirrolidona con hidroxietil metacrilato) y han visto que los coeficientes de permeabilidad del Ara-A a través de los copolímeros citados están en el rango de 10⁻⁵ a 10⁻⁸ cm/s.

En la actualidad hay muchos sistemas en fase de experimentación, siendo muy variados los fármacos incluidos en ellos, así nos encontramos con: antiinflamatorios no esteroides, antibióticos, hormonas, beta-bloqueantes, fármacos para el sistema nervioso central, antihistamínicos, etc. etc. La compañía Elan, Co. ha desarrollado dos sistemas transdérmicos, Dermaflex y Panoderm, que son semejantes a pulseras que se colocan en el brazo; los ingredientes activos son absorbidos cuando se aplican impulsos eléctricos (iontoforesis).

_____Antecedentes

En relación a los *excipientes* se utilizan tradicionalmente: lactosa, parafina líquida, agua, alcohol, etc. Recientemente, se se usan promotores de absorción como son: disolventes especiales (alquil metil sulfóxido), tensoactivos y otros agentes diversos (ciclodextrinas) (*Sánchez Morcillo, 1994*).

En cuanto a las *ciclodextrinas*, *Loftsson y col., (1998)* realizan experimentos con un fármaco modelo, preparado en solución acuosa con ciclodextrinas y polivinilpirrolidona ó hidroxipropilmetilcelulosa. De los resultados obtenidos concluyen que las ciclodextrinas y, los complejos que forma con el fármaco, son capaces de penetrar a través de las barreras biológicas, aunque generalmente a baja velocidad. En general las ciclodextrinas no incrementan la permeabilidad de compuestos hidrosolubles, pero sí son capaces de incrementar la disponibilidad de moléculas de fármaco que se encuentre disuelto en la superficie de la barrera lipofílica. Las ciclodextrinas, lo que hacen, es aumentar, principalmente, la permeabilidad de fármacos lipófilos debido al incremento en la disponibilidad de las moléculas de fármaco disuelto en la superficie de la membrana. La máxima permeabilidad del fármaco se obtiene cuando una cantidad de ciclodextrina suficiente se adiciona al vehículo para disolver todo el fármaco.

La adición de pequeñas cantidades de polímeros hidrosolubles y, el calentamiento en el autoclave, incrementan la penetración del fármaco ya que aumentan los efectos de las ciclodextrinas; los polímeros pueden reducir significativamente la cantidad de ciclodextrina que se necesita para solubilizar grandes cantidades de fármaco.

5.3.3. Módulo de liberación

El módulo de liberación, consta de un depósito de principio activo y un sistema controlador de la liberación del fármaco y está constituido generalmente, por un *material polimérico*.

_____Antecedentes

El polímero en unos casos adopta la forma de **membrana** o barrera de difusión, que puede ser de muy diferentes tipos: *microporosas, semipermeables, ultraporosas, no porosas, elastoméricas*, etc. y en otros casos actúa como **matriz**, realizándose la difusión del principio activo a través del polímero; desde ahí se cede a la superficie cutánea, en función de un gradiente de concentración (*Sánchez Morcillo, 1994*). Los materiales que se emplean con esta finalidad son diversos: *sistemas impregnados* (fibras huecas y plásticos), *hidrogeles y elastómeros*.

Las sustancias poliméricas que se emplean en los módulos de liberación deben cumplir una serie de requisitos que permitan su utilización y que se resumen a continuación.

- El peso molecular, la temperatura de transición vítrea y la estructura química del polímero deben permitir la difusión y la cesión de medicamento
- No debe reaccionar químicamente con el medicamento; debe ser estable durante toda la vida del dispositivo
- Debe poder incorporar gran cantidad de sustancia activa sin un deterioro excesivo de sus propiedades mecánicas y
- El coste del dispositivo no debe ser excesivo, para poder hacer del sistema de liberación transdérmico un producto competitivo.
- Además el polímero, y sus productos de degradación, no deben ser tóxicos ni antagonistas del medicamento.

Entre los polímeros que se pueden utilizar, del trabajo de *Kydonieus, (1987)*, se transcribe una lista de ellos que pueden emplearse en la fabricación de sistemas transdérmicos.

Polímeros Naturales: Carboximetilcelulosa (CMC), Aceto ftalato de celulosa (CAP), Etilcelulosa, Gelatina, Goma arábica, Metilcelulosa, Almidón, Zeina, Nitrocelulosa, Propilhidroxilcelulosa, Ceras, Proteínas, Caucho natural.

Elastómeros sintéticos: Polibutadieno, Poliisopreno, Neopreno, Polisiloxano, Caucho de Estireno butadieno, Caucho de silicona, Cloropreno, Caucho butilo, Acrilonitrilo.

Antecedentes

Polímeros de síntesis: Alcohol polivinílico (PVA), Polietileno, Poliestireno, Poliuretano, Polivinil pirrolidona (PVP), Polimetacrilato de metilo, Poliacetato de vinilo, Poliacrilato, Poliacrilamida, Poliester, Polieter, Poliamida, Resinas epoxi, Copolímero de etilen vinil acetato (EVAc), Policloruro de vinilideno

En la bibliografía encontramos otros productos que se utilizan en este tipo de dispositivos. *Obermayer,(1987)*, describe en su trabajo, la utilización de Poroplastic, que es una membrana microporosa, de célula abierta, fabricada con triacetato de celulosa. Según el autor, la versatilidad y adaptabilidad de esta membrana la hacen muy adecuada para este uso.

Las resinas acrílicas también han sido estudiadas como potenciales componentes de los dispositivos transdérmicos de cesión controlada. Estas resinas, comercializadas con el nombre de Eudragit® LR y LS, se emplean desde hace bastante tiempo en la preparación de fórmulas orales de cesión controlada, como recubrimiento de comprimidos o pequeñas partículas (*Liebowitz y col., 1987*).

5,3.4. Sistema Adhesivo

El sistema afianzador es un adhesivo situado en la parte del sistema destinada a contactar con la piel, que permite su fijación mediante presión. En algunos casos actúa como membrana de difusión o incluso lleva incorporado el principio activo y sustituye a la matriz.

En los sistemas provistos de auténtica membrana, ocupa la totalidad de la superficie (disposición frontal) y en los sistemas matriciales, está situado sólo en los bordes, (disposición periférica). El sistema de anillo periférico da lugar a un dispositivo más grande y, por tanto, más difícil de fabricar (*Sánchez-Morcillo, 1994*).

_____Antecedentes

En los dos casos el sistema de adhesión debe cumplir una serie de requisitos: cohesión, adhesión, cualidades deslizantes, estabilidad, no debe causar irritación ni sensibilización de la piel, hipoalérgico, debe poder retirarse fácilmente sin dejar residuos que no puedan eliminarse mediante el lavado, debe ser física y químicamente compatible con el principio activo, no debe afectar a la velocidad de cesión del medicamento, no debe alterar la acción de los promotores.

Los agentes más usados en la actualidad son los *polímeros acrílicos, silicona hipoalérgica, resinas, aceites minerales, poliisobutileno*, etc. (*Sánchez Morcillo, 1994*).

Takemasa y col.(1994) ensayaron un Pressure-Sensitive Adhesive PSA con cuatro fármacos diferentes: dipropilftalato, aminopirina, ketoprofeno y lidocaína. El PSA está compuesto por goma, acrilato y polímeros de silicona. Determinan el coeficiente de difusión (D) de cada fármaco a través de las matrices adhesivas, la solubilidad, la temperatura de transición vítrea y el coeficiente de expansión térmico. A partir de los resultados que obtienen concluyen que la interacción polímero-fármaco está ampliamente influenciada por los grupos funcionales polares de los fármacos y del PSA. La interacción del fármaco y el PSA afecta al valor de D y el cambio en D afecta a la permeabilidad de la piel y ésta está influenciada por factores como el grosor de las matrices adhesivas de fármaco y por el valor de D.

5.3.5. Promotores de Absorción empleados en dispositivos transdérmicos

A las sustancias que colaboran en el tránsito cutáneo de los medicamentos se les denomina promotores de absorción (*Bindschaedler y col., 1986*).

Según *Guy y Hadgraft, (1987b)* el promotor debe reunir una serie de características para poder actuar correctamente. Así, debe

_____Antecedentes

poder actuar específicamente y de forma reversible durante un período de tiempo determinado, debe carecer de irritabilidad local, efectos alérgicos y/o toxicidad sistémica, y, por fin, debe ser de fácil inclusión en la forma galénica.

Los promotores pueden clasificarse en cuatro grupos:

Solventes lipófilos: Dimetilsulfóxido, Dimetilformamida, Dimetilacetamida.

Agentes tensoactivos: Lauril sulfato sódico, Dodecilmetil sulfóxido, Decilmetil sulfóxido.

Sistemas de dos componentes: Propilenglicol/ácido oleico; 1,4 butano diol/ácido linoleico.

Otros productos: 2-Pirrolidona, 1-dodecilazacicloheptano-2-ona (Azone), Propilenglicol, limoneno, etc.

En cuanto al mecanismo de acción según esos mismos autores, los promotores reunidos bajo la denominación de *disolventes lipófilos* actúan mediante la solubilización, hasta un límite, de los componentes de la piel, así se produce una disminución parcial de su acción barrera. Estos promotores actúan sobre sustancias polares.

Los *agentes tensoactivos* potencian la penetración de los fármacos hidrofílicos. Algunos de ellos como el decilmetilsulfóxido, parece ser que actúan más selectivamente, sobre una ruta determinada de penetración a través del estrato córneo.

Los *sistemas formados por dos componentes*, uno lipídico y otro hidrofílico, parece ser que actúan sobre las capas hidrofílicas-lipofílicas de la piel. *Barry y col.,(1985)* seleccionan una serie de sustancias tales, como la progesterona, la hidrocortisona y el manitol, como modelos para estudiar la acción de los promotores de absorción. Los resultados parecen indicar que el manitol penetra por vía polar, la hidrocortisona por vía lipídica y la progesterona

_____Antecedentes

también por vía lipídica, pero su velocidad de penetración está afectada por la presencia de capas acuosas.

También se utilizan asociaciones de promotores como las que usan *Ghosh y Bagherian, (1996)* que colocan n-decilmetilsulfóxido y azona, en un sistema transdérmico diseñado para contener metadona como principio activo disperso en un adhesivo de poliácrlato y con dos membranas de Scotch pack ®. Estos autores, realizan estudios “in vitro” con piel de ratón y con piel de cadáver humano. De los resultados que obtienen concluyen que la velocidad de penetración a través de la piel humana es más baja en comparación con la piel de ratón. Los perfiles de absorción para las dos clases de piel muestran que la cantidad liberada (Q) versus tiempo (t) está controlada por la membrana. La velocidad de penetración en la piel, depende de dos factores: del grosor de la capa adhesiva (1,5 mm de espesor, con piel de ratón) y de la dosis de fármaco contenida en la matriz (15% P/P). Los promotores de absorción producen una velocidad de penetración en la piel humana efectiva en una concentración de un 5% P/P. Estos estudios iniciales demostraron la posibilidad de administrar metadona a través de piel intacta desde sistemas transdérmicos.

5.3.6.- Envase

Está formado por dos láminas impermeables y flexibles, herméticamente selladas, rodeando al sistema y cuya función es impedir pérdidas de principio activo. Están fabricadas de *material plástico* (poliéster, polietileno, cloruro de polivinideno), *metálicas* (papel de aluminio), o *mixtas* (aluminio plastificado).

Membrana externa: situada en la parte opuesta a la zona de aplicación, constituye el soporte del módulo de liberación, su función es absorber la humedad y excesos de líquidos desprendidos de la piel.

Segunda membrana: unida a la zona de aplicación del sistema, actúa como protector interno y se ha de retirar antes de la administración.

_____Antecedentes

Finalmente algunos sistemas llevan:

Sistema de Protección: constituido por una bolsa de papel de aluminio y polietileno de baja densidad (*Sánchez Morcillo, 1994*).

5.3.7. Aplicación

Es importante asegurarse que los parches sean aplicados con la piel limpia, seca y sana, la cual debe estar libre de pelos, de polvos de talco o de lociones. Se puede limpiar con un paño seco, pero se debe evitar el uso de detergentes y agua. El parche no debe colocarse en el lugar donde se colocó el anterior, sino en un lugar nuevo para prevenir la maceración del sitio de aplicación, luego, preferiblemente se colocará en el lado opuesto del cuerpo donde se hizo previamente. Si se produce irritación, indica que hay que cambiar el parche del lugar de aplicación; si continua la irritación, puede necesitarse una ruta alternativa de liberación del fármaco (*Berti y Lipsky, 1995; Jennifer, 1994*).

El parche ha de aplicarse siguiendo las indicaciones que se exponen a continuación: el parche debe aplicarse en una región que presente la menor cantidad de pelo posible; si no es posible, hay que afeitar la zona (*Berti y Lipsky, 1995*). Cuando se quita el papel de protección del adhesivo se debe quitar con cuidado sin tocar el adhesivo y presionar luego el parche firmemente en la piel. Las manos se deben lavar después de aplicar el parche particularmente, después de quitar otro parche. Con este parche usado hay que tener consideraciones importantes: colocarlo en un sitio con cuidado, para que esté lejos de los niños, porque puede contener aún principio activo. Esto es especialmente peligroso en parches que contienen Fentanilo como principio activo. Todos los parches tiene una cara lavable, por lo tanto, pueden usarse bajo la ducha; sin embargo, no debe ser durante un período de tiempo prolongado porque se caería el sistema (*Jennifer, 1994*).

_____Antecedentes

La medicación percutánea es, relativamente, un tratamiento nuevo, que genera ansiedad, por esto es importante prestar atención psicológica y toda la información posible al enfermo porque, por ejemplo, el paciente puede angustiarse y el miedo se le puede quitar si se aplica el parche en la nalga y no en el lugar de donde tiene la enfermedad (por ejemplo en el corazón en el caso de los parches de trinitrato de glicerina) (*Jennifer, 1994*).

5.4. Clasificación

La clasificación de los sistemas transdérmicos se puede realizar de muchas formas y atendiendo a diversos criterios. Por ejemplo, en función del componente del sistema transdérmico que controle la velocidad de cesión del fármaco, o se puede realizar en función de la forma del parche, de si el adhesivo ocupa toda la superficie del parche o no, etc. Si la clasificación se realiza en función del componente del sistema transdérmico que controla la liberación del fármaco esos **Sistemas** se clasifican en:

5.4.1.-- Liberación controlada por la membrana

El principio activo se encuentra incluido en un reservorio líquido o semisólido y su liberación está controlada por una membrana de diferentes características

5.4.2.-- Liberación controlada por el adhesivo

El fármaco está disperso en un polímero de naturaleza adhesiva que se pega a la piel y que es el que controla la velocidad de liberación.

5.4.3.- Liberación controlada por la matriz polimérica

En este tipo de sistemas es el polímero formador de la matriz, donde el principio activo se encuentra, por lo general, disperso el que controla la velocidad de liberación del fármaco.

a) *Sistemas controlados por membranas*

_____Antecedentes

Todos los sistemas transdérmicos en los que la liberación esta controlada por una membrana constan de: una lámina impermeable que protege todo el dispositivo, un depósito de principio activo, una membrana que controla la velocidad de liberación del fármaco y un adhesivo.

Es el tipo de sistema transdérmico donde tendrían aplicación, si presentan las características adecuadas, las membranas que se elaboran y estudian en la presente memoria.

Capítulo 1 MATERIALES Y UTILLAJE

Como ya se ha expuesto anteriormente, el objeto de esta memoria es el estudio de la transferencia de fármacos a través de membranas sintéticas, para poder dilucidar si es factible la utilización de éstas como constituyentes de sistemas transdérmicos, en los cuales el control de la cantidad de fármaco que puede estar disponible para atravesar la piel y ejercer el efecto terapéutico, lo ejerce la membrana polimérica.

Pero, para llevar a cabo estos estudios, además de los dos tipos de membranas sintéticas que se elaboran (siguiendo el protocolo recogido en el Capítulo 3), es necesario utilizar un fármaco que nos permita comprobar como se produce el transporte, la transferencia, a través de las distintas membranas que se utilizan en los ensayos descritos en los capítulos 4, 5 y 6 de esta memoria.

A continuación se describen los materiales y utillaje que se emplean para realizar estos ensayos. La descripción de las técnicas de elaboración de las membranas y de la formulación utilizada se recoge en los capítulos 3 y 4, respectivamente.

1.1. Materiales

1.1.1.- Principio Activo: Acido Salicílico

La elección del ácido salicílico (AS) como sustancia trazadora responde a varios puntos:

- Es un fármaco ampliamente estudiado y que se utiliza con frecuencia en dermatología,
lo que nos permite disponer de abundante bibliografía.
- Por ser una molécula de bajo peso molecular y por lo tanto de fácil difusibilidad en el
vehículo que la contiene
- por su estabilidad y por su velocidad de difusión a través de membranas (*Singh y Roberts, 1993b*).
- La de presentar la ventaja de poseer técnicas analíticas suficientemente sensibles para
permitir detectar la presencia de cantidades mínimas de ácido salicílico.

Entre esas técnicas está la espectrofotometría, que según *Glombitza, y col, (1994)* es un método rápido, preciso y reproducible. Por ello, dada la gran cantidad de muestras que hay que valorar en los ensayos de transferencia del AS a través y, a partir, de las diversas membranas que se estudian, es por lo que se elige la espectrofotometría como técnica para analizar el ácido salicílico contenido en las muestras.

También, en la bibliografía consultada, se ha visto que el ácido salicílico es un fármaco que se utiliza mucho como sustancia tipo o de referencia, porque penetra bien a través de la piel humana y

animal, aunque su absorción está muy influenciada, por variables como: concentración de fármaco, tipo de vehículo usado, hidratación y condición barrera que ejerce la piel al paso de los fármacos (*Davis y col., 1997*).

Por todo ello, se elige este fármaco como elemento trazador para estudiar los procesos de transferencia a través de distintas membranas, tanto sintéticas (membranas *tipo I*, y *tipo II*) como naturales (*Piel humana*).

Para ello, el ácido salicílico se formula como emulsión O/A, constituyendo ésta la fase dadora en los ensayos de transferencia, a través de:

- a) membranas tipo I (ver Capítulo 4)
- b) piel humana (ver Capítulo 6).

Sin embargo para los ensayos de transferencia utilizando membranas tipo II el ácido salicílico se incorpora a la membrana, siendo ella misma la fase dadora en esos ensayos (ver Capítulo 5).

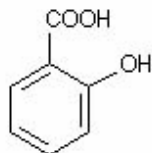
a) Propiedades químicas

Al ácido salicílico es el ácido o-hidroxibenzoico, (*Remington, 1995, Martindale 2002; British Pharmacopoeia, 1999*), ácido 2-hidroxibencenocarboxílico (*Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004*), ácido Ortóxicoibenzoico (*Martindale, 2002*), ácido espireico, ácido espirólico (*Castaño y col., 1998*) y ácido 2-hidroxisalicílico (*USP. 26, 2003*).

Debe contener no menos 99,0% (*Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004; British Pharmacopoeia, 1999*), ó 99,5% (*U.S.P 26, 2003*) y no más del 100,5% (*Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004; British Pharmacopoeia, 1999*) ó 101,0% (*USP. 26, 2003*) de $C_7H_6O_3$, calculado con respecto a la sustancia desecada.

- **Fórmula empírica.** $C_7H_6O_3$

- **Fórmula desarrollada**



- **Peso molecular:** 138,12 (*Remington, 1995; U.S.P. 26, 2003; British Pharmacopoeia, 1999*) 138,1 (*RFE, 1997; European Pharmacopoeia, 2004; Martindale 2002; Castaño y col., 1998*)

- **Constante de disociación:** $pK_a = 3.0, 13.4 (25^\circ)$ (*Clarkre's, 2004; Goth, 1986*)

- **Punto de fusión.** 158-161°C (*Remington, 1995; Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004; U.S.P. 26, 2003; British Pharmacopoeia, 1999; Castaño y col., 1998*)

- **Punto de ebullición:** 211°C (*Castaño y col., 1998*)

b) Obtención

Principalmente por el proceso Kolbe-Schmidt, en el cual se hace reaccionar CO_2 con fenolato de sodio a presión y a 130°C formándose salicilato de sodio seguido de un tratamiento con ácido mineral.

c) Características

Cristales aciculares, blancos o polvo cristalino esponjoso blanco. (*Remington, 1995; Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004; Dale, 1996; British Pharmacopoeia, 1993; U.S.P. DI, 1986*). El A.S. sintético es blanco e inodoro (*Remington, 1995; Martindale 2002; U.S.P. DI, 1986*)

d) Solubilidad.

La solubilidad del ácido salicílico en distintos medios se recoge en la tabla 1.1

Tabla 1.1.- Solubilidad del Acido Salicílico en distintos medios

<i>Solvente</i>	<i>Remingt on,1995</i>	<i>Castaño y Real col., 1998</i>	<i>Real Farmacopea Española,</i>	<i>European Pharmacopoeia, 2004;</i>	<i>Martinda le, 2002</i>
<i>Agua</i>	460 ml	500 p.	P.S.	P.S.	460 ml
<i>Agua hirviente</i>	15 ml 3 ml	15 p. 3 p.	- F.S.	- F.S.	15 ml 3 ml
<i>Alcohol</i>	135 ml	135 p.	-	F.S.	-
<i>Benceno</i>	-	3 p.	F.S.	-	3 ml
<i>Eter</i>	-	45 p.	-	F.S.	45 ml
<i>Cloroformo</i>	-	3 p.	-	B.S.	-
<i>Acetona</i>	-	80 p.	-	-	-
<i>Aceite de oliva</i>	-	10 p. 60 p.	- -	- -	- -
<i>Aceite Ricino</i>	-	Soluble	-	-	-
<i>Glicerina</i>					
<i>Vaselina filante</i>					

P.S.= Poco soluble
soluble

B.S.=Bastante soluble

F.S.= Fácilmente

e) Identificación

Primera identificación a,b. Segunda identificación a,c.

a.-Punto de fusión 158 °C a 161 ° C (*Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004; U.S.P. 26, 2003; British Parmacopoeia, 1999*)

b.-Examinar la sustancia por espectrofotometría de absorción en el infrarrojo, comparando con el espectro obtenido con el ácido salicílico SQR. (*Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004; Bristish Parmacopoeia, 1999*)

c.-Disolver 30 mg aproximadamente de la sustancia a examinar en 5 ml de hidróxido de sodio 0,05 M, neutralizar si es necesario y diluir hasta 20 ml con agua R. 1 ml de la disolución da la reacción de los

salicilatos. (*Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004; U.S.P. 26, 2003; British Pharmacopoeia, 1999*)

f) Ensayos

Disolución S: Disolver 2,5 g de la sustancia a examinar en 50 ml de agua destilada R a ebullición, dejar enfriar y filtrar. (*Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004*)

Aspecto de la disolución: Disolver 1 g de la sustancia a examinar en 10 ml de disolución es límpida e incolora. (*Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004 ; British Pharmacopoeia, 1999*)

Cloruros: 10 ml de la disolución S diluídos hasta 15 ml con agua R satisfacen el ensayo límite de cloruros (100 p.p.m.) (*Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004; U.S.P. 26, 2003; British Pharmacopoeia, 1999*)

Sulfatos: 15 ml de la disolución S satisfacen el ensayo límite de sulfatos (200 p.p.m.) (*Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004; U.S.P. 26, 2003; British Pharmacopoeia, 1999*)

Metales pesados: Disolver 2,0 g en 15 ml de alcohol R y añadir 5 ml de agua R. 12 ml de esta disolución satisfacen el ensayo límite B para metales pesados (20 ppm Pb). Preparar una referencia utilizando una disolución patrón de plomo (2 ppm Pb) preparada por dilución de la disolución patrón de plomo (100 ppm Pb) R con una mezcla de 5 volúmenes de agua R y 15 volúmenes de alcohol R. (*Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004; U.S.P. 26, 2003; British Pharmacopoeia, 1999*)

Pérdida por desecación: No más del 0,5 por ciento, determinada en 1,00 g en un desecador. (*Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004; U.S.P. 26, 2003; British Pharmacopoeia, 1999*)

Cenizas sulfúricas: No más del 0,1 por ciento, determinadas en 2,0 g. (*Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004; British Pharmacopoeia, 1999*)

Residuo de ignición: no más del 0,05% (U.S.P.26,2003)

g) Valoración

- Disolver 0,120 g de la sustancia a examinar en 30 ml de alcohol R y añadir 20 ml de agua R. Valorar con hidróxido de sodio 0,1 M utilizando 0,1 ml de disolución de rojo de fenol R como indicador, hasta que se obtenga un color rojo violeta. 1 ml de hidróxido de sodio 0,1 M equivale a 13,81 mg de $C_7H_6O_3$ (Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004; British Pharmacopoeia, 1999).
- Disolver 500 mg de A.S., en 25 ml de alcohol diluído que previamente ha sido neutralizado con hidróxido de sodio 0,1 N. (U.S.P. 26,2003)
- Espectrofotometría: El A.S. disuelto en NaOH 0,5N presenta el máximo de absorción a 300 nm; H_2SO_4 0,1 N a 302 nm; en solución ácida acuosa a 236 nm, en solución alcalina acuosa a 298 nm (Clarke´s, 2004)

Con el objetivo de mirar las interferencias de agentes tópicos usados en psoriasis (p. ej A.S.) con fototerapia, se hacen extracciones con diferentes solventes y se lee en el espectrofotómetro entre 280-320 nm, se concluyó que las preparaciones con A.S. deben ser quitadas antes y/o después de la fototerapia. (Kornreich y col., 1996)

h) Conservación

En envase bien cerrado, protegido de la luz. (Real Farmacopea Española, 2002; European Pharmacopoeia, 2004; British Pharmacopoeia, 1999). **Es estable al aire** (U.S.P. DI, 1986; Castaño y col., 1998), pero se colorea gradualmente cuando se expone a la luz solar (Castaño y col., 1998).

i) Mecanismo de acción.

La acción *queratolítica* consiste en reducir el espesor de la capa córnea de la piel, destruyendo las células epiteliales que se hinchan, se ablandan y se desprenden; de esta forma la capa córnea se descama, más que se disuelve. Estas sustancias desintegran la molécula de queratina por separación de las uniones del emparrillado característico de esta proteína (*Velasco, y col., 1993*); es decir facilita la descamación al solubilizar el cemento intercelular que une las células en el estrato córneo, dejando por tanto, que se desprenda la queratina. Posee por ello un efecto descamativo o *exfoliante*. La acción exfoliante se emplea en el tratamiento local de hiperqueratosis y paraqueratosis (*Flórez, 1997*).

Este efecto queratolítico puede proporcionar una acción *antifúngica* debido a que al eliminar el estrato córneo se suprime el crecimiento de hongos; también ayuda a la penetración de otros fármacos antifúngicos (*U.S.P. Di, 1986*). *Korolkovas y col. (1978)* afirman que el A.S. tiene la propiedad de formar quelatos y debe su acción biológica, total o parcialmente, a esta propiedad.

La acción *queratoplástica* consiste en incrementar el espesor de la capa córnea de la epidermis, al estimular la reproducción de las células del estrato basal o germinal del cuerpo de Malpighio. (*Velasco, y col., 1993*),

j) Usos

Empleado tópicamente, ejerce una leve acción *antiséptica-antifúngica* y un marcado efecto *queratolítico* (*Remington, 1995; British Pharmacopeia, 1999; Martin dale, 2002; U.S.P. Di, 1986; Korolkovas, 1978*). Por esta última propiedad ejerce un efecto beneficioso en el tratamiento local de ciertas formas de dermatitis eccematosa.

Forma parte de productos empleados en el tratamiento de psoriasis, para lo cual la FDA lo incluye en la categoría I (*Remington, 1995; Martindale, 2002; Kornreich y col., 1996*). Las células se

hinchán, ablandan y finalmente se descaman. Con frecuencia se utilizan parches de ácido salicílico con este propósito.

Por sus propiedades *antifúngicas* es especialmente útil en el tratamiento de “tinea capitis” (tiña del cuero cabelludo) y de “tinea pedis” (pie de atleta), para lo cual se usa al 40% de concentración en una base rubefaciente ya que el hongo se desarrolla en el estrato córneo (*Esterowitz y col., 1995; Goodman & Gilman, 1996*).

Usualmente se combina con el ácido benzóico en un ungüento conocido como el ungüento de Whitfield. (*Remington, 1995; Martindale, 2002; Goodman & Gilman, 1996; Velasco y col., 1993*). *Ponnighaus y col. (1994)* utilizan el ungüento de Whitfield (A.S. 3% y ácido benzóico 6%) y clotrimazol en el tratamiento de infecciones de la piel

El ácido salicílico forma parte de preparaciones para el tratamiento del acné, caspa (dermatitis seborreica) y picaduras de insectos. En concentraciones altas, es *cáustico* y puede ser usado para eliminar callosidades, verrugas y otras hiperplasias (Enfermedades cutáneas hiperqueratósicas). (*Remington, 1995; U.S.P. DI, 1986*)

Se ha estudiado el empleo de ácido salicílico al 7,5% en vaselina, con 0,05% de vitamina A y con 1% de 5-fluoruracilo, formulados en una crema base, para aplicar a pacientes con enfermedad de Darier, (*Knulst y col., 1995*).

En la bibliografía aparece, incluso, un caso de un paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida y sarna, que al ser tratado con una loción de lindano al 1%, ungüento de sulfúrico al 5% y ácido salicílico al 2%, las lesiones de la piel desaparecen (*Suarez-Fernández y col., 1995*).

k) Dosificación

En concentraciones <1% es *queratoplástica* irritante (Castaño y col., 1998). Sin embargo, según Flórez, (1997) no se ha podido comprobar este efecto.

Para la acción *queratolítica*, las concentraciones son del 1-20% (Castaño y col., 1998): Se emplea al 2-10% como colodión para aplicar sobre el callo; el alcohol y el éter del colodión flexible se evaporan rápidamente, dejando una capa de piroxilina que contiene AS que destruye lentamente el callo (Remington, 1995; Velasco y col., 1993). Por su efecto *cáustico*, como colodión al 20%, ungüento al 25-60% o parche al 40% (Remington, 1995; Martindale, 2002; USP DI, 1986).

A concentraciones superiores al 15% puede ser *necrosante* (Flórez, 1997).

Para la psoriasis, caspa, eczema, hiperhidrosis e ictiosis, se utiliza al 1-10% (Castaño y col., 1998). El A.S. lo utiliza Kristensen, (1989) al 2% en una crema para reducir lesiones sporiáticas. Sin embargo, Panizzon, (1995) usan ungüento ó aceite al 5% ó 10.

Steen y col. (1996) usan ungüentos de A.S. en concentraciones del 1,5% y 3 % con efectos analgésicos; el estudio demostró que soluciones saturadas del fármaco en el área del dolor conducen a suprimir el dolor, por encima del 96%, en menos de 20 minutos.

l) Toxicidad. Interacciones medicamentosas y/o problemas asociados

Se han comunicado casos de toxicidad sistémica resultante de la aplicación sobre áreas grandes de piel. La aplicación continua del A.S. sobre la piel puede causar dermatitis. No se emplea internamente como analgésico debido a su efecto irritante local, sobre el tracto gastrointestinal (Remington, 1995; Martindale,

2002). Actúa como irritante suave y puede provocar dermatitis si se administra repetidamente sobre la piel (*Castaño y col., 1998*).

La aplicación tópica no debe usarse durante largos períodos de tiempo, en altas concentraciones, y en grandes áreas del cuerpo o en inflamaciones de la piel. Por ello, la relación riesgo/beneficio al usar crema al 25%, pomada (25-60%) y parches al 40%; debe evaluarse cuando hay diabetes mellitus o enfermedad vascular periférica (puede producirse inflamación aguda o ulceración, especialmente en las extremidades) y cuando hay inflamación o infección cutánea (*U.S.P. DI, 1986; Castaño y col., 1998*).

Su uso en pediatría está muy discutido ya que, se han descrito muchas muertes, de niños, después de aplicar cantidades excesivas de AS sobre grandes áreas del cuerpo (*Martindale, 2002; Castaño y col., 1998; Velasco y col., 1993*). En un estudio de *Germann y col.* (1996) se discute la toxicidad del A.S., usado en un ungüento al 10% para ichthyosis vulgaris, con la necesidad de poder establecer terapias seguras en niños.

Brubacher y col. (1996) presentan un caso poco usual de salicilismo por el uso de una preparación tópica de salicilato aplicada a una mujer de 80 años diagnosticada de eritrodermia y tratada con un ungüento que contiene salicilato; después de 6 días de tratamiento, la paciente presenta paranoia, que se trata con bicarbonato, que provoca que, después de dos días, la paciente regrese a su estado mental normal.

Aunque no se han realizado estudios en humanos, los estudios realizados en ratas y en monos han demostrado que el A.S. tiene efectos teratógenos. La dosis oral administrada a los monos puede representar 6 veces la dosis máxima humana diaria de A.S. (equivalente a 28 g. de A.S. en forma de gel al 6%) cuando se aplica externamente sobre una gran superficie corporal (*U.S.P. DI, 1986*).

En la lactancia el A.S. puede absorberse sistémicamente, dando lugar a posibles reacciones adversas graves en lactantes (*U.S.P. DI, 1986*), aunque esto no está descrito en humanos.

Una vez repasadas las características, usos, etc. del AS, se pasa a describir los materiales y utillaje que se emplean para llevar a cabo este estudio.

1.1.2. - Componentes de la emulsión

Los componentes que lleva la emulsión, además de ácido salicílico como principio activo, y agua, como constituyente fundamental de la fase acuosa, son:

a) Vaselina

Es un excipiente clásico utilizado en preparaciones epidérmicas. La penetración del ácido salicílico a partir de la vaselina, ha sido objeto de múltiples investigaciones (*Roberts y Horlock, 1978; Shen y col., 1976; Whitworth, 1968*).

La vaselina, también conocida como *Petrolatum*, constituye un sistema de dos fases con estructura de gel, la fase líquida está formada por parafinas e isoparafinas líquidas y por hidrocarburos olefínicos y la fase sólida por un componente cristalino (n-parafinas) y un componente microcristalino (isoparafinas) (*Herraez y López, 1.997; Pajor y col., 1967*).

Obtención

Se obtiene mediante tratamiento adecuado de determinadas fracciones del petróleo bruto (*The Merck Index, 2001*) y pueden ser naturales o sintéticas. Se suelen diferenciar, en relación con el procedimiento usado para su obtención, tres variedades: vaselina natural, de nafta y artificial (*Herraez y López, 1997*).

*Fórmula general: C_nH_{2n+2} (n=16-32)

*Peso específico a 60 ° C: d= 0,815 - 0,865 (*Nogueira y col., 1990*)

*Punto de fusión: 38 - 60 ° C (*Nogueira y col., 1990*).

*Insoluble en agua, etanol (96%) (*British Pharmacopoeia, 1999*).
Glicerina y acetona (*Handbook of Pharmaceutical Excipients,*

2000).

*Soluble en cloroformo y éter (*British Pharmacopoeia, 1999*). Benceno y hexano (*Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2000*).

Características

La vaselina, es un sistema coloidal de hidrocarburos sólidos los cuales forman un esqueleto reticular, coherente, tridimensional en el que se alojan los hidrocarburos líquidos (*The Merck Index, 2001; Nogueira y col., 1990; Herraéz y López, 1.997*). La viscosidad de la vaselina depende de los tratamientos a que se la someta para su obtención (*Nogueira y col., 1990*) y de su composición. También las propiedades físicas: punto de fusión, consistencia, ductilidad (a la que debe la vaselina su carácter filante), longitud, color y olor, así como la composición química de la vaselina, depende sobre todo de la fuente de obtención y del método de purificación (*Martíndale, 2002*).

La vaselina es un semisólido de color amarillento o blanco, de aspecto graso, suave, inodora, o a lo más con un débil olor característico, insípida, untuosa al tacto, inalterable al aire, no se enrancia, débilmente fluorescente aún después de fundida, semitransparente o traslúcida en láminas delgadas o transparentes incluso a 0°C, se extiende muy bien por su punto de fusión. Es inerte químicamente por eso es compatible con la mayoría de los medicamentos y productos como ácidos, álcalis, oxidantes y reductores.

La vaselina presenta carácter lipófilo. Su hidrofobia se puede disminuir utilizando

sustancias auxiliares (*Denoel y Jaminet, 1971*). Como inconvenientes se dice que es difícil de eliminar de la piel y mancha la ropa (*Herráez y López, 1997*).

Conservación:

Se conserva bien y raramente da reacciones cutáneas (*Denoel y Jaminet, 1971*). Debe almacenarse en recipientes herméticos, protegida de la luz, en lugares frescos y secos (*Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2000*).

Toxicidad

Se utiliza mucho en formas farmacéuticas de aplicación tópica porque no presenta toxicidad y porque, generalmente, no produce irritación sobre la piel, aunque puede ocasionar algunas manifestaciones alérgicas (*Goldstein y col. 1978; Trillo, 1.993*). Sin embargo, en la literatura se recoge datos de que los componentes que parecen que producen la alergia son los hidrocarburos aromáticos policíclicos que están presentes como impureza (*Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2000*).

Legislación relativa: *Real Farmacopea Española, 2002 y United States Pharmacopoeia 26 (2003)*

b) Labrafil M-2130-CS®*Características Físico-química*

Es una mezcla de glicéridos saturados poli-oxietilenados de 12-18C. Es el glicérido lauro palmito esteárico polioxietilenado.

- Se obtiene a partir de los aceites de palmera.
- El punto de fusión está comprendido entre 35° y 40°C.
- El valor de HLB es de 4-5. Es anfifílico y favorece la acción de los humectantes

(*Boletín Gattefosée*).

Aspecto

Es un sólido, céreo, de color blanco con un débil olor característico. Sustancia grasa, no iónica, ligeramente hidrófila y perfectamente tolerable por las mucosas y tegumentos. Es un excipiente de síntesis de gran poder de penetración que se usa en preparaciones dermatológicas.

Solubilidad:

*Poco soluble en: Etanol (96%).

*Soluble en: Oxido de etileno, Hexano, Etil dietilenglicol, Hexilenglicol, Benceno, Cloroformo, Keroseno, Aceites vegetales, Alcohol butílico e isoamílico, Eter etílico, Miristato de isopropilo, Acetona, Aceite de parafina y Eter de petróleo.

*Insoluble en : Glicoles, Poliglicoles y gliceroles.

*Insoluble pero dispersable en: Agua y suero fisiológico.

*Perfectamente miscible con los hidrocarburos a los que confiere mayor poder de penetración (*Spang-Brunner y Speiser, 1976*).

Usos

Se usa en preparaciones dermatológicas y cosméticas que ejercen su acción en profundidad. Se emplea en la proporción de un 2-10% en emulsiones donde se puede utilizar como emulgente o como componente de la fase lipídica. Actúa como promotor de la penetración, aumentando la difusión y penetración de los principios activos lipófilos contenidos en las preparaciones dermatológicas.

Toxicidad

Se utiliza en formas farmacéuticas de aplicación tópica porque no presenta toxicidad y porque, generalmente, no produce irritación en la piel, aunque, a veces, pueda ocasionar alguna manifestación alérgica (*Goldstein y col., 1978*). Los test de inhibición primaria y alergia epicutánea dan resultados negativos. Por lo tanto la toxicidad local en preparados dermatológico de uso humanos, es nula.

*c) Tween 80 ® (Polisorbato 80)**Características Físico-Químicas*

Es un tensoactivo no iónico utilizado para formar emulsiones O/A. Es el Monooleato de polioxietileno sorbitano (*Donbrow y Friedman, 1975; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2000*)

 Material y Utillaje

- Pm=1.310 D.
- La fórmula general: $C_{64}H_{124}O_{26}$ (*Real Farmacopea Española, 2002; British Pharmacopoeia, 1999*).

Solubilidad.

En la tabla 1.2. aparece recogida la solubilidad del Polisorbato 80 según las distintas fuentes bibliográficas.

Toxicidad

No hay conclusiones determinantes de posibles acciones carcinogénicas de este compuesto, por ello se admite que el Tween - 80 no presenta esa acción. Son considerados como no tóxicos y no irritantes (*Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2000*).

Tabla 1.2.- Solubilidad del Tween-80 según las distintas referencias bibliográficas

<i>Solvente</i>	<i>Remington, 1995</i>	<i>British Pharmacopoeia, 1999</i>	<i>The Merck Index, 2001</i>	<i>Martindal e, 2002</i>
-----------------	----------------------------	--	----------------------------------	------------------------------

<i>Agua</i>		Soluble	Soluble	Soluble	Miscible
<i>Alcohol</i>		Soluble	Soluble	Soluble	Miscible
<i>Aceites fijos</i>		-	Insoluble	-	Insoluble
<i>Aceite de algodón</i>	<i>de</i>	Soluble	-	Soluble	e
<i>Aceite de maíz</i>		Soluble	-	Soluble	1:125
<i>Aceite de maíz</i>		Soluble	Soluble	Soluble	-
<i>Acetato de etilo</i>		-	-	-	-
<i>Cloroformo</i>		-	-	-	Miscible
<i>Eter</i>		-	-	-	Miscible
<i>Eter de petróleo</i>		Soluble	Soluble	Soluble	Insoluble
<i>Metanol</i>		Soluble	-	Soluble	e
<i>Tolueno</i>		Insoluble	Insoluble	Insoluble	Miscible
<i>Parafina</i>					-
					Insoluble
					e

1.2. Materiales empleados para elaborar las membranas tipo I y tipo II

1.2.1. Piroxilina.

La Piroxilina es la sustancia de la que se obtienen el colodión, que va a ser el soporte inerte, el componente encargado de mantener la integridad de la barrera, de las membranas sintéticas que se van a elaborar a partir de él. La piroxilina también se llama Nitrato de celulosa (*British Pharmacopoeia, 1999; Martindale, 2002*) o Algodón pólvora (*Martindale, 2002; Real Farmacopea Española, 2002*); Se disuelve en una mezcla de tres partes de éter y una parte de alcohol etílico (*British Pharmacopoeia, 1999; The Merck Index, 2001; Babor e Ibarz, 1968*), para formar el Colodión, que se usa para preparar membranas de diálisis (*Babor e Ibarz, 1968*)

Características

Sólido blanco ó blanco amarillento con olor a alcohol isopropílico, si se presenta humectado con este alcohol (*The Merck Index, 2001*). La piroxilina se presenta en masas filamentosas con aspecto de

algodón pero más ásperas al tacto. Para un transporte seguro debe ser humectado con 25 - 30% de agua ó alcohol (*The Merck Index, 2001; Martindale, 2002*). El algodón pólvora utilizado para preparar las membranas que se utilizan en los ensayos de transferencia del p.a. está humectado con alcohol isopropílico.

Obtención

Producto obtenido por nitración de celulosa de alta pureza con una mezcla de ácido nítrico y sulfúrico en pulpa de madera o algodón. Se utiliza como filmógeno. Está disponible en diferentes grados de polimerización (*British Pharmacopoeia, 1999; Boletín UEE, 1996*).

Definición: Nitrato de Celulosa

Fórmula general: $(C_6H_7O_2(OH)_{3-x}(NO_3)_x)_n$ -Para %N = 12, x= 2,26 (*Boletín UEE, 1996*).

Nitrógeno: 11,80 - 12,30 % (Ficha de producto UEE, 1996). 11,7 - 12,2 % (*British Pharmacopoeia, 1999*)

Cenizas: Máximo 0,10% (*Boletín UEE, 1996*).

Viscosidad: 397 mPa´s (*Boletín UEE, 1996*).

Estabilidad: 132° C: Máximo 2,0 ml/g (*Boletín UEE, 1996*).

Turbidez: Máximo 50 mg/kg (*Boletín UEE, 1996*).

Color Hazen: Máximo 70 (*Boletín UEE, 1996*).

Prueba sobre cristal (cualitativa): No debe dar insolubles (*Boletín UEE, 1996*).

Materias Volátiles: 30 - 35 % ± 2 (*Boletín UEE, 1996*).

Punto de inflamación: 40° F . Arde entre 160 - 170 (*Babor e Ibarz, 1968*). La piroxilina es muy inflamable, sobre todo la que tiene un alto contenido en nitrógeno que, incluso, puede explotar (*Farmacopea Española, 2002; Babor e Ibarz, 1968; The Merck Index, 2001*).

Tolerancia: Excelente tolerancia a hidrocarburos aromáticos (*Boletín UEE, 1996*).

Temperatura de deflagración > 180° C (*Boletín UEE, 1996*).

Densidad aparente entre 0,25 y 0,60 g/ml (*Boletín UEE, 1996*)

Residuo de ignición: no más de 0,3% (*U.S.P. DI, 1986*).

Acidez y sustancias solubles en agua: no más de 1,5 mg (*U.S.P. DI, 1986*)

Compatible con la mayoría de las resinas y plastificantes (*Boletín UEE, 1996*).

Da recubrimientos, de rápido secado al aire (*Boletín UEE, 1996*).

.Solubilidad.

La tabla 1.3 recoge las solubilidades que presenta la piroxilina en los distintos medios.

Tabla 1.3.- Solubilidad de la piroxilina en distintos medios

<i>Solvente</i>	<i>Boletín UEE, 1996</i>	<i>Remington, 1995</i>	<i>The Merck Index, 2001</i>
<i>Esteres</i>	Soluble	–	–
<i>Cetonas</i>	Soluble	Soluble	Soluble
<i>Agua</i>	Insoluble	–	–
<i>Alcohol</i>	Soluble	–	–
<i>Metanol</i>	–	Soluble	–
<i>Ácido Acético</i>	–	Soluble	Soluble
<i>Glacial</i>	–	Soluble	–
<i>Acetato de Amilo</i>	–	Soluble	Soluble
<i>1 Volumen Alcohol + 3 Volúmenes de Éter</i>			

Conservación

Este producto al ser tan peligrosos exige unas normas de conservación muy estrictas:

- No se aconseja tener en el almacén cantidades elevadas de nitrocelulosa,

Hay que almacenar en lugar fresco y con ventilación adecuada (*Boletín UEE, 1996*).

En recipientes herméticamente cerrados (*The Merck Index, 2001; Real Farmacopea Española, 2002*)

- Mantener lejos del calor, llama o cualquier fuente calorífica (*Boletín UEE, 1996*) y a temperaturas que no excedan los 15°C

Material y Utilaje

(*British Pharmacopoeia, 1993*)

- Mantener alejado de la luz (*British Pharmacopoeia, 1993*; U.S.P. DI, 1986) directa del sol (*Boletín UEE, 1996*)
- La nitrocelulosa no debe ser almacenada junto con ácidos, álcalis fuertes, aminas o agentes oxidantes, pero sí humectada con agua o alcohol.

Usos.

Se utiliza principalmente para formar Colodiones, adhesivos, tintas (*The Merck Index, 2001*)

Forma películas claras, tenaces, duraderas, flexibles, fáciles de aplicar y reparar (*Boletín UEE, 1996*).

Toxicidad

La *nitrocelulosa* por sí misma no es tóxica. La toxicidad del producto depende del agente humectante (Alcohol Isopropílico).

DL50/oral/rata: > 5840 mg/kg.

Degradabilidad: 99%. Débil contaminante del agua. (*Boletín UEE, 1996*)

Estabilidad y Precauciones.

Es estable bajo condiciones normales de almacenamiento y manipulación., pero hay que tener precauciones, evitar la exposición al calor, golpes y rozamientos. Con el incremento de temperatura decrece la estabilidad y comienza la degradación del producto. (*Boletín UEE, 1996*)

Identificación de peligros.

- La nitrocelulosa adecuadamente humectada es un sólido inflamable
- La nitrocelulosa puede incendiarse por llama, calor, choque, impacto, fricción, chispas de electricidad estática.
- El humectante alcohólico puede causar irritación en los ojos, en la piel, y en las vías respiratorias.

- La nitrocelulosa en combustión puede producir vapores tóxicos. (*Boletín UEE, 1996*)

1.2.2. Colodión.

El colodión es una solución de Piroxilina al 5% en una mezcla constituida por 1 volumen de alcohol al 90% y 3 volúmenes de éter, diluida con la misma mezcla de solventes hasta una viscosidad cinemática de 405-700 centistokes (*British Pharmacopoeia, 1999*).

Características

Según la Farmacopea Británica (*British Pharmacopoeia, 1999*) este producto es un líquido viscoso, claro, sin color y con un olor característico a éter.

Obtención

La Farmacopea Americana (*U.S.P. DI, 1986*), parte de 4g. de Piroxilina, 75 ml de éter y 25 ml de alcohol para obtener el colodión y específica: “no debe contener menos del 5% P/P de piroxilina”. Cuando esa solución se extiende en capas finas que se exponen al aire se forma, por evaporación de los solventes, una película resistente, incolora (*The Merck Index, 2001*), flexible (*British Pharmacopoeia, 1999*) y fina. Cuando se adiciona agua, la piroxilina precipita (*The Merck Index, 2001*).

El residuo de la evaporación total de 5g. de colodión debe pesar 0,25g. con un error de $\pm 0,02$ g.

Almacenamiento

El Colodión debe almacenarse en contenedores herméticos (*Real Farmacopea Española, 2002; The Merck Index, 2001*) a temperaturas inferiores a 30° C (*Remington, 1995*) ó 25°C (*The Merck Index, 2001*), por ser altamente inflamable.

$d_{25}^{25} = 0,765 - 0,775$ [10, *The Merck Index, 2001*)

Peso por ml. = 0,785 - 0,795 g. (*U.S.P. DI, 1986*)

Contenido en alcohol = 22,0 -26,0%

1.2..3. Aceite de Ricino.

Es el componente lipídico de la membrana. También se llama aceite de castor o de Palma Christi (*The Merck Index, 2001*), es el Oleum Ricini; aceite fijo que se obtiene por expresión en frío de las semillas del Ricinus communis, Linné (*Real Farmacopea Española, 2002*) Familia Euphorbiaceae (*U.S.P. DI, 1986*).

Características

Es una molécula que presenta un carácter apolar, debido a su composición química. Es un líquido viscoso, amarillo pálido o casi incoloro, transparente, de olor débil, característico, sabor suave al principio pero, ligeramente desagradable después, algo acre y nauseabundo, que no se enrancia (*Martindale, 2002; The Merck Index, 2001*).

Composición

El aceite de Ricino está compuesto por glicéridos de los ácidos ricinoleico (80%) e isoricinoleico. La composición porcentual en ácidos grasos es aproximadamente: 87% ricinoleico, 7% oleico, 3% linoleico, 2% palmítico, 1% esteárico y trazas de dihidroesteárico (*The Merck Index, 2001*).

Las semillas de Ricinus comunis son tóxicas por contener una albúmina tóxica, ricina (8) y una base tóxica: ricinina (*Remington, 1995*).

Densidad a 20°C = 0,952 - 0,965 (*MartinMartindale, 2002; Real Farmacopea Española, 2002; British Parmacopoeia, 1999*)

$d_{15.5}^{15.5} = 0,961 - 0,963$ (*Merck Index, 2001*); 0,957-0,961 (*U.S.P. DI,*

1986)

Índice de refracción: $n_D^{20} = 1,477 - 1,481$ (*Real Farmacopea*

Española, 2002; The Merck Index, 2001; British Parmacopoeia, 1999)

$n_D^{25} = 1,473 - 1,477$ (*The Merck Index, 2001*)

$$n_D^{40} = 1,466 - 1,473 \text{ (The Merck Index, 2001)}$$

Rotación óptica: +3,5° a + 6,0 ° (*Real Farmacopea Española, 2002; British Pharmacopoeia, 1999*)

Absorbancia: máxima 269 ±1 nm (*Real Farmacopea Española, 2002*).
268-270 nm (*British Pharmacopoeia, 1999*).

Viscosidad a 25 °C = 6-8 poises (*The Merck Index, 2001*).

Grado de acidez: <7 (*The Merck Index, 2001*); <2 (*Real Farmacopea Española, 2002; Remington, 1995; British Pharmacopoeia, 1999*)

Índice de hidroxilo 161 - 169 (*The Merck Index, 2001*); >150 (*Real Farmacopea Española, 2002; British Pharmacopoeia, 1999*)

Índice de yodo 81 - 91 (12); 82 - 90 (*Real Farmacopea Española, 2002; British Pharmacopoeia, 1999*)

Índice de peróxidos < 5 (*Real Farmacopea Española, 2002; British Pharmacopoeia, 1999*)

Índice de saponificación 180-185 (*The Merck Index, 2001*); 176-187 (*The Merck Index, 2001.; British Pharmacopoeia, 1999*)

Insaponificable: <0,8% P/P (*Real Farmacopea Española, 2002; British Pharmacopoeia, 1999*)

Valor de Reichert-Meissl: <0,5 (*The Merck Index, 2001*).

Valor de Polenske: <0,5 (*The Merck Index, 2001*).

Índice de aceto: 144-150 (*The Merck Index, 2001*); 180 (*Real Farmacopea Española, 2002*).

Metales Pesados: 0,001%

Solubilidad

La solubilidad del aceite de ricino se recoge en la tabla 1.3

Tabla 1.3.- Solubilidad del Aceite de Ricino en distintos solventes

	<i>Real Farmacopea Española,</i>	<i>The Merck Index, 2001</i>	<i>Remingt on, 1995</i>	<i>British Parmacopo eia, 1999</i>	<i>U.S.P. DI, 1986</i>	<i>Martinda le, 2002</i>
<i>Acido Acético</i>	S.	-	-	-	-	-
<i>Alcohol</i>	S.	M.	S.	-	1 v.	S.
<i>Alcohol 96</i>	4 v.	-	-	M.	-	-
<i>Metanol</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Hexano</i>	-	-	-	-	P.S:	-
<i>Eter de petróleo</i>	P.S. P.S.	1 v. I.S.	-	P.S. -	-	P.S. -
<i>Aceite de vaselina</i>	-	-	M. M.	- M.	-	M. M.
<i>Alcohol deshidratado</i>	-	M. M.	M. M.	S. S.	-	M. M.
<i>Acido acético glacial</i>						
<i>Cloroformo</i>						
<i>Eter</i>						

S.= soluble; P.S.= poco soluble; I.S.= insoluble; M.= miscible

Conservación.

Se conserva en recipientes herméticos, al abrigo de la luz (*Real Farmacopea Española, 2002*) y el calor (*U.S.P. DI, 1986*), a temperaturas inferiores a 40°C (*Remington, 1995*).

Usos

De todas las utilidades que puede tener el aceite de ricino, sólo nos interesa su uso como plastificante del colodión en la formación de membranas artificiales.

El aceite de Ricino entra a formar parte de la composición del colodión flexible, que es el formador de la membrana, en distintas proporciones.

Según las distintas farmacopeas : 2,5 g. en la B.P (*British Parmacopoeia, 1999*).; 2,5 g. en el Martin Dale (*Martindale, 2002*); 3 g. en la U.S.P. (*U.S.P. DI, 1986*).

1.3. Utillaje empleado

Además del material fungible que se utiliza comúnmente en el laboratorio, se usa el específico que se cita a continuación

1.3.1.- Para la preparación y caracterización de las membranas

- **Preparación:** Soporte de mercurio (18 cm x 20 cm)
Erlenmeyer de 100ml y 250 ml de capacidad, con tapón esmerilado
Material quirúrgico (pinzas y tijeras)
- **Peso de las membranas:**
 - *Balanza Analítica Metler ® AT200
 - *Balanza Analítica Satorius ®
- **Espesor de la membrana:** Nonius o Pie de Rey Inox Temp Storm ®
- **Resistencia a la rotura:** Analizador de texturas TA-XTZ/25 Stable Micro Systems ®
- **Estructura:** Microscopio Electrónico de barrido Jeol ®JSM6400

1.3.3.- Para los ensayos de cesión se utiliza

- Agitadores magnéticos :
 - * Selecta
 - * Multi6stirrer (Velp Scientifica ®)
- Baño termostatzado
- Celdas de Franz modificada
- Célula de difusión: *placa* (Tapa de una placa Petri de vidrio de 9,5cm de diámetro a la que se acopla un dispositivo especial, de corcho, con objeto de obtener una capa de emulsión de espesor mínimo y constante).
- Cinta de teflón
- Cristalizadores de vidrio
- Cronómetro
- pHmetro (pHmeter GLP 22 Crison®)
- Purificadores de agua Milli-Ro-8-Plus y Milli-Q 185. Millipore
- Tampón fosfatos de pH 7 y pH 4

Material y Utillaje

- Teflones lisos y de cabeza estrellada
- Termómetros de mercurio
- Termostato Tempette Junior ® TE-8J con termómetro (0-80°C ±1°C) y agitador de hélice.
-

1.3.4.- Para analizar el principio activo

- Espectrofotómetro Beckman DU-6
- Cubeta de cuarzo de 1cm x 1cm. Hellman (Ref. QS 1000)

y los aparatos de medida comunes en el laboratorio: Balanzas, Granatarios, etc.

Capítulo 2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Las Normas de Buena Fabricación y Control de medicamentos obligan a la validación de los métodos de análisis y control de medicamentos y ya en el número 103 del Boletín Oficial del Estado del año 1985 aparece recogido este concepto: Se llama *validación a la obtención de pruebas convenientemente demostrativas de que un método de fabricación o control es lo suficientemente fiable como para producir un resultado previsto dentro de intervalos definidos* (B.O.E. N° 103 del 30 de Abril de 1985).

Las características de funcionamiento de un método analítico comprenden todos los datos y resultados experimentales que demuestran su aptitud para el uso al que se destina y para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación (B.O.E. N° 103 del 30 de Abril de 1985).

Estas características comprenden los cinco criterios fundamentales de validación, que se recogen a continuación, no necesariamente aplicables en todos los casos, y de los que se derivan en la práctica todos los parámetros de validación (*Cemeli, 1985; Bamio-Nuez, 1992*).

- **Proporcionalidad entre concentración de analito y respuesta del instrumento.** Este concepto se relaciona con los parámetros: linealidad, intervalo y sensibilidad.
- **Dispersión de una serie de resultados alrededor del valor medio.** Este concepto se relaciona con los siguientes parámetros: precisión, repetibilidad, reproducibilidad y solidez.
- **Diferencia entre el valor hallado en el análisis y el valor verdadero.** Concepto relacionado con los parámetros de exactitud y recuperación.
- **Cantidad mínima de analito requerida para obtener un resultado significativo.** Concepto relacionado con los parámetros: sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación.
- **Capacidad de un método para determinar el analito sin interferencias de otras sustancias.** Concepto relacionado con los parámetros: selectividad y especificidad.

Se necesita validar el método analítico porque proporciona un alto grado de confianza y seguridad en dicho método analítico y en la calidad de los resultados. Además permite obtener un conocimiento profundo de sus características de funcionamiento lo que se traduce en una disminución del número de fallos y repeticiones, con el consiguiente ahorro de los costes asociados, cumplimiento de los plazos previstos de análisis y, una optimización del método.

Por lo tanto, lo primero que se realiza en este estudio es: la validación del método de análisis cuantitativo del principio activo (ácido salicílico) presente en las muestras de fase receptora (tampón fosfato pH 7), que se obtienen en los ensayos de transferencia de ácido salicílico a través de membranas, que se recogen en los capítulos siguientes (4 -6).

Para determinar analíticamente la concentración de ácido salicílico presente en dichas muestras, se recurre a la técnica de la espectrofotometría directa UV/visible por ser un método rápido, preciso y reproducible (*Glombitza y col. 1994*). Se utiliza para ello, un espectrofotómetro Beckman DU-6 y una cubeta de cuarzo de 1 cm. de paso óptico.

En primer lugar, en la validación del método analítico, se comienza por determinar el espectro de absorción del ácido salicílico disuelto en tampón fosfatos de pH 7. Para ello, se prepara una solución de 1 mg de ácido salicílico por mililitro de solución tampón y se realiza un barrido espectrofotométrico entre 210 y 340 nm al objeto de establecer la longitud de onda en la que el ácido salicílico presenta la máxima absorbancia.

El ácido salicílico disuelto en tampón fosfato de pH 7.0 presenta un máximo de absorción a la luz ultravioleta a una longitud de onda de 296 nm. (*Figura 2.1*). Ese valor está comprendido dentro del intervalo que utiliza Kornreich, para analizar el ácido salicílico de preparaciones tópicas utilizadas en el tratamiento de la psoriasis (*Kornreich y col. 1996*).

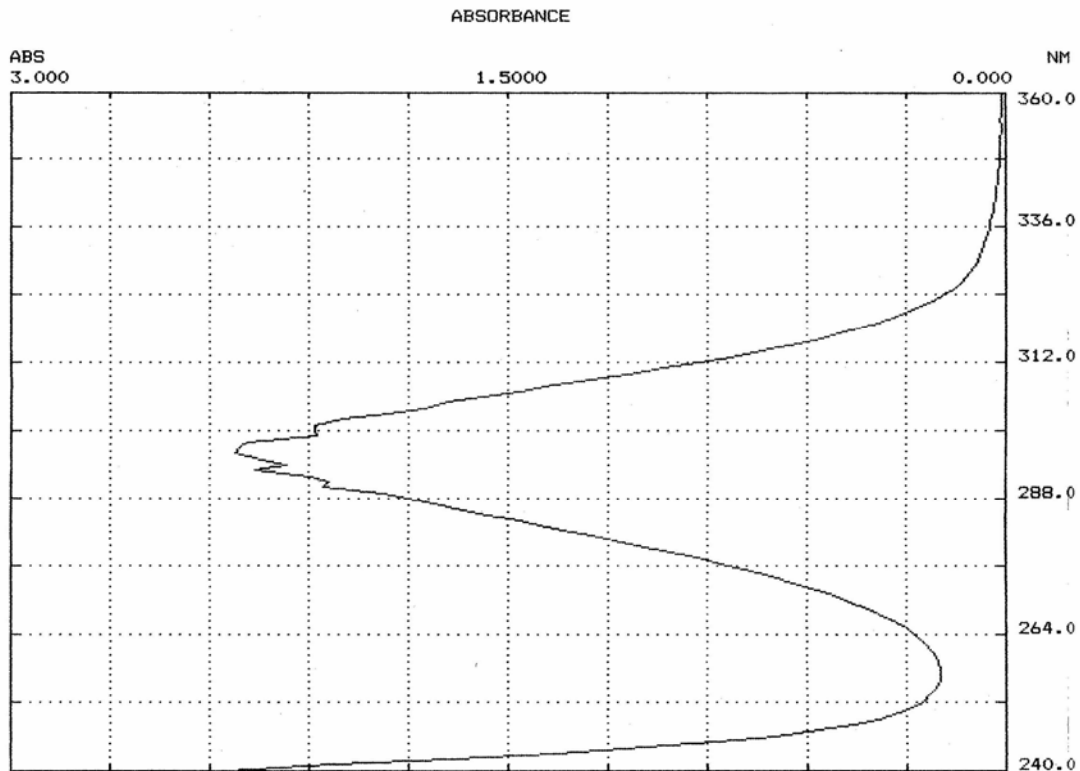


Figura 2.1. Espectro de absorción del ácido salicílico en tampón fosfato de pH 7.0

Una vez determinado el máximo de absorción, se realiza la validación del método analítico a esa longitud de onda. Para ello, se parte de una "solución madre" que contiene 100 mg. de ácido salicílico, exactamente pesados, que se disuelven en un matraz aforado de 100 ml. con tampón fosfato pH 7.0.

De esta solución madre se hacen diluciones, con lo que se obtiene una serie de soluciones de concentración conocida de ácido salicílico, comprendidas entre 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 48 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las absorbancias que presentan esas soluciones se leen en el espectrofotómetro frente a un blanco de tampón de fosfato de pH 7.

La U.S.P. determina que los parámetros que se deben considerar en una validación son:

- Linealidad
- Precisión
- Exactitud

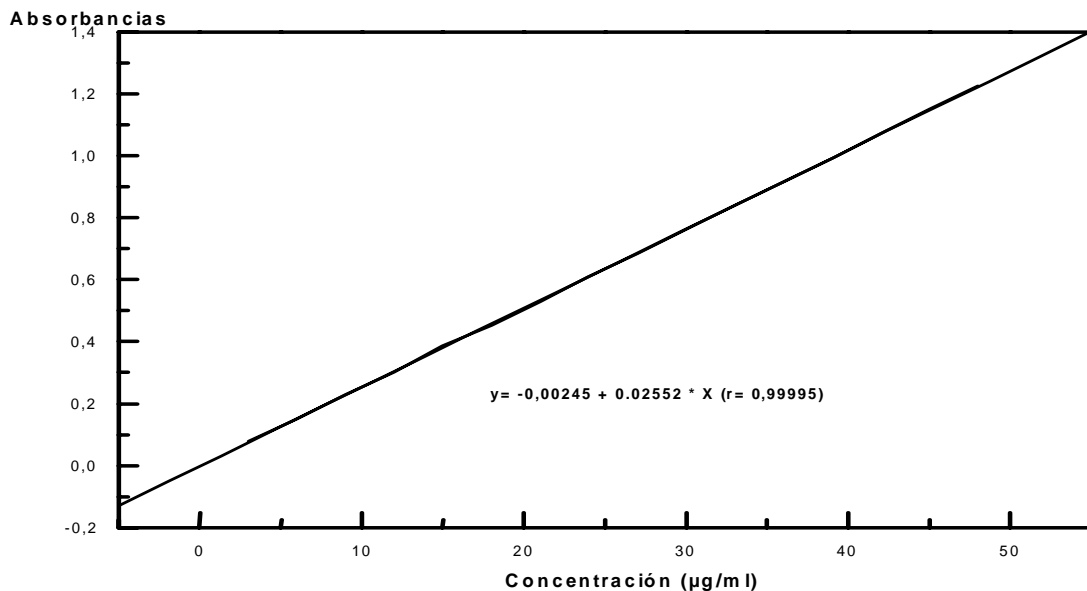
- Especificidad

2.1. Determinación de la Linealidad

La linealidad es la capacidad del método analítico par obtener resultados lineales, es decir, directamente proporcionales entre la concentración de analito presente en la muestra y la respuesta que se obtiene, así como el intervalo de concentración de analito para los cuales el método es satisfactorio.

La linealidad del método analítico se verifica a través de la realización de la curva de calibración. Para ello, las normas establecidas por la ICH exigen el análisis de un mínimo de cinco concentraciones diferentes de analito. Sin embargo, en el presente estudio de linealidad se emplean dieciséis concentraciones distintas de principio activo (ácido salicílico) comprendidas entre 3 y 48 $\mu\text{g/ml}$, realizadas por triplicado.

Las muestras analizadas se elaboran diluyendo alicuotas de la "solución madre" reparadas el mismo día del análisis. En la *figura 2.2*, se muestra la recta de calibrado obtenida al representar los



valores de absorbancia leídos para cada concentración de analito preparada.

Figura 2.2. Curva de calibración de ácido salicílico en tampón fosfato de pH 7.0

Una vez obtenidos los valores de absorbancia de las distintas muestras preparadas, se analiza la linealidad del método de valoración del p.a. mediante la aplicación del programa estadístico “SOLO”.

Los datos del análisis de regresión por mínimos cuadrados, bajo la hipótesis de un modelo lineal, de ecuación $y = a + bx$, se muestran a continuación (ecuación 2.1).

$$\text{Absorbancia (D.O.)} = -0.00245 + (0.02552) \text{ Concentración} \quad (\text{Ec.2.1})$$

Estos resultados nos indican que la linealidad, existencia de relación directa entre absorbancia y concentración de analito, es adecuada ya que el coeficiente de determinación es >0.99 ($r^2=0.99990$). El coeficiente de correlación ($r=0.99995$), al tener un valor próximo a uno, nos indica que, con una alta probabilidad, existe una relación directa entre la concentración de principio activo presente en la muestra y la lectura de absorbancia (D.O. Densidad óptica) obtenida,

Los valores de los parámetros estadísticos, correspondientes al estudio de linealidad y proporcionalidad, que se obtienen al realizar el tratamiento estadístico de los datos de absorbancia obtenidos para cada concentración de analito, se recogen en las tablas 2.1 y 2.2.

Tabla 2.1.- Estudio de Linealidad del método analítico: Parámetros estadísticos del análisis de regresión de la pendiente (b) de la curva de calibración $y = -0.00245 + 0.02552x$

<i>Parámetro</i>	<i>Método</i>	<i>Valor Aceptado</i>
<i>Factor de Respuesta</i>	0.02544	
<i>Coefficiente de Correlación (r)</i>	0.99995	

<i>Coefficiente de Determinación (r²)</i>	0.99990	
<i>Coefficiente de variación de b (CV)</i>	1,1787%	<5%
<i>Varianza de la pendiente (S_b²)</i>	4,6515x10 ⁻⁹	
<i>Varianza del error experimental total</i>	1,4233x10 ⁻⁵	
<i>Desviación estándar de la pendiente, b</i>	6,8202x10 ⁻⁵	
<i>Desviación relativa estándar de b</i>	0,2675%	<2%
<i>Límite superior de confianza de b</i>	0,02566	
<i>Límite inferior de confianza de b</i>	0,02537	
<i>Test estadístico de la pendiente ("t" de Student)</i>	374,18	>2,45

Tabla 2.2.- Parámetros estadísticos del análisis de regresión de la ordenada en el origen (a) de la curva de calibración $y = -0.00245 + 0.02552 x$

<i>Parámetro</i>	<i>Método</i>	<i>Valor Aceptado</i>
<i>Valor de ordenada al origen: a</i>	-0,00245	
<i>Varianza de la ordenada en el origen: a</i>	3,9142x10 ⁻⁶	
<i>Desviación estándar (S_a) de a</i>	1,9784x10 ⁻³	
<i>Desviación estándar relativa</i>	-80,7528%	
<i>Límite superior de confianza</i>	1,7938x10 ⁻³	
<i>Límite inferior de confianza</i>	-6,6938x10 ⁻³	
<i>Test estadístico de a</i>	1,2383	<2,145

Como ya se ha indicado anteriormente, el grado de significación del valor obtenido para el coeficiente de correlación "r" es mayor de 0,999. Por tanto, existe una correlación directa o positiva ($r > 0,999$) entre las variables "x" (cantidad de analito) e "y" (absorbancia). Además, el valor del coeficiente de determinación

“ r^2 ” nos indica que el 99,99%, de la variación de “y” puede explicarse por la variación de “x”.

Por *el análisis de varianza de la regresión*, primero se rechaza la hipótesis nula de la pendiente (**b**); por tanto, la recta de regresión difiere significativamente de la horizontal, y segundo, nos indica que existe una relación lineal entre la respuesta y la concentración de analito. Luego, el método es lineal ya que los valores obtenidos se encuentran dentro de los límites especificados. Además, a partir de los resultados del estudio de linealidad, se obtiene el valor de la pendiente de la recta de calibrado, que nos indica la sensibilidad del calibrado. Ese parámetro nos indica la capacidad que tiene el método analítico de detectar ligeras variaciones en la concentración de analito que está presente en una muestra determinada (*Karnes y col., 1991*).

El valor de la ordenada en el origen (**a**) no difiere significativamente de cero, luego, el método cumple la condición de proporcionalidad, ya que el cero debe encontrarse dentro de los límites de confianza. Como al aplicar la t-Student a los datos, el $t_{exp} < t_{tablas}$ la probabilidad de que el valor de la ordenada en el origen, **a**, sea igual a cero es muy elevada.

Por todo lo anterior, se puede concluir que el método es proporcional, es decir, existe proporcionalidad entre la concentración de analito y la lectura de absorbancia.

2.2. Determinación de la Precisión

La precisión es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea; es decir, nos indica la distribución de los valores analíticos alrededor de su valor medio (*Franquesa-Graner, 1990*).

Este parámetro indica el grado de reproducibilidad del método analítico bajo condiciones normales de trabajo, refleja el error

aleatorio y mide la dispersión de los valores analíticos referida al promedio de los mismos. Esta dispersión es debida a varias fuentes de variación, por ejemplo: instrumental, personal.(*Castro y col., 1989*)

Matemáticamente, se expresa por el coeficiente de variación. En función de las distintas fuentes de variación, la precisión se puede designar con distintos nombres:

2.2.1.-Repetibilidad

La repetibilidad es la precisión del método cuando éste se lleva a cabo en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, se realiza por el mismo analista, en un mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y, en el curso de la misma serie de análisis. Es decir, la repetibilidad muestra la precisión de un método analítico que se realiza, en las mismas condiciones, sobre una misma muestra (*Camacho-Sánchez y col., 1993*).

Las normas de la ICH (Conferencia Internacional de Armonización) exigen la realización de un mínimo de nueve análisis dentro del rango para el cual se valida el método (por ejemplo, tres mediciones de cada concentración, utilizando tres concentraciones distintas dentro del rango de concentraciones estudiadas). En nuestro caso, el estudio de repetibilidad se lleva a cabo con las mismas concentraciones de la recta de calibrado, realizando seis réplicas de cada concentración y en un mismo día. Es decir, la muestra correspondiente, por ejemplo, a una concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ se lee, en el mismo día, seis veces seguidas. Después, para cada una de las concentraciones utilizadas, se calcula la concentración media, su desviación estándar y los coeficientes de variación.

En la tabla 2.3 se recogen los parámetros estadísticos obtenidos en el estudio de repetibilidad. Para ello se utilizan las lecturas de absorbancias o densidad óptica (D.O.) “y” producidos para cada concentración “x”.

Tabla 2.3.- Repetibilidad: Resultados del análisis y Parámetros estadísticos.

<i>Conc</i> <i>·</i> <i>µg/</i> <i>ml</i>	<i>D.O.</i> <i>1°</i>	<i>D.O.</i> <i>2°</i>	<i>D.O.</i> <i>3°</i>	<i>D.O.</i> <i>4°</i>	<i>D.O.</i> <i>5°</i>	<i>D.O.</i> <i>6°</i>	<i>D.O.</i> <i>Media</i>	<i>Desviaci</i> <i>ón</i> <i>Estándar</i>	<i>C.V.</i>
3	0,080	0,082	0,078	0,079	0,081	0,080	0,080	1,41x10 ⁻³	1,76
6	0,153	0,154	0,153	0,152	0,151	0,154	0,153	1,17x10 ⁻³	0,76
9	0,235	0,237	0,234	0,235	0,234	0,236	0,235	1,30x10 ⁻³	0,55
12	0,306	0,307	0,309	0,303	0,302	0,304	0,305	2,63x10 ⁻³	0,86
15	0,395	0,397	0,391	0,398	0,391	0,397	0,395	3,12x10 ⁻³	0,79
18	0,466	0,469	0,466	0,463	0,468	0,467	0,466	2,30x10 ⁻³	0,49
21	0,537	0,539	0,537	0,534	0,535	0,539	0,537	2,04x10 ⁻³	0,38
24	0,605	0,600	0,607	0,609	0,605	0,604	0,605	3,03x10 ⁻³	0,50
27	0,694	0,692	0,694	0,697	0,694	0,693	0,694	1,67x10 ⁻³	0,24
30	0,773	0,768	0,773	0,778	0,773	0,774	0,773	3,18x10 ⁻³	0,41
33	0,834	0,836	0,830	0,837	0,830	0,836	0,834	3,12x10 ⁻³	0,37
36	0,916	0,919	0,916	0,913	0,918	0,917	0,916	2,07x10 ⁻³	0,23
39	0,995	0,997	0,995	0,992	0,993	0,997	0,995	2,04x10 ⁻³	0,20
42	1,078	1,073	1,080	1,082	1,078	1,077	1,078	3,03x10 ⁻³	0,28

 n del Método Analítico

45	1,145	1,140	1,145	1,150	1,145	1,146	1,145	$3,18 \times 10^{-3}$	0,27
48	1,228	1,226	1,228	1,231	1,228	1,227	1,228	$1,67 \times 10^{-3}$	0,13

El coeficiente de variación (CV) máximo aceptable para tres determinaciones es 3,3 con un intervalo de aceptación del 95-105%; por tanto, para seis determinaciones ese CV sería superior a 3,3.

En nuestro caso, el mayor valor de CV que se obtiene es de 1,76 valor inferior, incluso, al máximo aceptable (3,3) cuando se realizan sólo tres determinaciones de las muestras. Por lo tanto, podemos decir que, en las condiciones experimentales ensayadas, el método es repetible.

2.2.2- Reproducibilidad

Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico, cuando se lleva a cabo utilizando la misma muestra, pero empleando condiciones distintas de ensayo. Por ejemplo, cuando se realiza la lectura de las absorbancias, que presentan las muestras, en distintos días o con distintos aparatos (*Bamio-Nuez y col., 1992*).

En nuestro caso se realiza este estudio, determinando las absorbancias de todas las muestras (16 concentraciones) utilizadas en el cálculo de la curva de calibración, por triplicado, en tres días distintos; por lo tanto, en el presente estudio, la variable utilizada es el tiempo. En la tabla 2.4 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad del método. Así mismo, se recogen los resultados del tratamiento estadístico de los datos de absorbancias (**y**) obtenidos para cada concentración (**x**), en los tres días distintos de ensayos.

Tabla 2.4.- Reproducibilidad: Resultados del análisis y Parámetros estadísticos

<i>Concen</i> <i>μg/ml</i>	<i>Absorb.</i> <i>1° día</i>	<i>Absorb.</i> <i>2° día</i>	<i>Absorb.</i> <i>3° día</i>	<i>Absorb.</i> <i>Media</i>	<i>Desviación</i> <i>Estándar</i>	<i>C.V.</i>
<i>3</i>	0,079	0,080	0,077	0,079	$1,53 \times 10^{-3}$	1,94
<i>6</i>	0,146	0,153	0,153	0,151	$4,04 \times 10^{-3}$	2,68
<i>9</i>	0,226	0,235	0,227	0,229	$4,93 \times 10^{-3}$	2,15
<i>12</i>	0,298	0,306	0,301	0,302	$4,04 \times 10^{-3}$	1,34
<i>15</i>	0,388	0,395	0,377	0,387	$9,07 \times 10^{-3}$	2,35
<i>18</i>	0,443	0,466	0,444	0,451	0,013	2,88
<i>21</i>	0,532	0,537	0,520	0,529	$8,74 \times 10^{-3}$	1,65
<i>24</i>	0,601	0,605	0,618	0,608	$8,89 \times 10^{-3}$	1,46
<i>27</i>	0,685	0,694	0,670	0,683	0,012	1,77
<i>30</i>	0,762	0,773	0,751	0,762	0,011	1,44
<i>33</i>	0,847	0,834	0,837	0,839	$6,81 \times 10^{-3}$	0,81
<i>36</i>	0,909	0,916	0,916	0,914	$4,04 \times 10^{-3}$	0,44
<i>39</i>	0,989	0,995	0,991	0,992	$3,05 \times 10^{-3}$	0,31
<i>42</i>	1,073	1,078	1,059	1,070	$9,85 \times 10^{-3}$	0,92
<i>45</i>	1,158	1,145	1,148	1,150	$6,81 \times 10^{-3}$	0,59
<i>48</i>	1,223	1,228	1,226	1,226	$2,52 \times 10^{-3}$	0,20

Además, en la misma tabla se recogen los parámetros estadísticos resultantes del análisis: valor medio de absorbancia, desviación estándar que presenta ese valor y el coeficiente de variación (C.V.).

Cuando para realizar el análisis estadístico de los resultados se dispone sólo del resultado de tres determinaciones para cada valor, el coeficiente de variación máximo aceptable es 3,3.

Como se puede observar en la tabla, ningún valor de coeficiente de variación calculados es superior 3,3. Por lo tanto, el método es reproducible y se puede concluir que, en la precisión del

método no influye, en ningún caso, que los análisis se realicen en distinto días.

2.3. Determinación de la Solidez

Es la capacidad del proceso analítico de proporcionar resultados fiables cuando se realizan pequeñas modificaciones en las condiciones experimentales de determinación del analito. Por ejemplo, modificación en el pH de la solución donde se encuentra disuelto el analito; o de las condiciones ambientales de conservación de las soluciones: obscuridad, luz (solar o artificial), temperatura (ambiente, nevera , estufa), etc.

Para determinar la solidez o robustez del método analítico, en nuestro caso, se utiliza como variable la modificación del pH. Para ello, se preparan tres soluciones tampón de pHs: 5.3 , 7.0 y 7.4 y con ellas se preparan las correspondientes "soluciones madre" de ácido salicílico, como ya se indicó anteriormente.

A partir de cada "*solución madre*" se preparan las distintas curvas de calibración del ácido salicílico en cada una de las soluciones tampón (pH=5.3, 7.0 y 7.4). Hay que mencionar, que en este estudio, como en los casos anteriores, se utilizan dieciséis concentraciones distintas de ácido salicílico.

En la tabla 2.5 se recogen los parámetros de cada una de las rectas de regresión de ácido salicílico en tampón de distintos pHs (pH= 5.3, 7.0 y 7,4).

Tabla 2,5.-Parámetros de las rectas de regresión obtenidas para el ácido salicílico disuelto en diferentes medios de disolución (tampón de pH= 5.4, 7.0 ó 7.4)

<i>Parámetro</i>	<i>Tampón pH 7,0</i>	<i>Tampón PH 5,4</i>	<i>Tampón pH 7,4</i>	<i>Valor aceptad o</i>
<i>Nº total de datos</i>	16	16	16	
<i>Coefficiente de correlación "r"</i>	0,99995	0,9999	0,99993	
<i>Coefficiente de determinación "r²"</i>	0,99990	0,99980	0,99986	
<i>Pendiente "b"</i>	0,02552	0,02561	0,02555	
<i>Límite Superior</i>				0,02566
<i>Límite Inferior</i>				0,02537
<i>Desviación estándar de b"</i>	6,537x10 ⁻⁵	9,449x10 ⁻⁵	8,225x10 ⁻⁵	
<i>Ordenada en el origen "a"</i>	-0,00245	-0,00258	-0,00288	
<i>Límite Superior</i>				0,00179
<i>Límite Inferior</i>				3
				-
				0,00693
				7
<i>Desviación estándar de "a"</i>	0,0019	0,00274	0,00239	

Como se puede observar en la tabla, los valores correspondientes a las pendientes de cada una de las rectas de regresión, así como de las ordenadas al origen, se encuentran dentro de los límites estadísticos obtenidos (por ejemplo, para la pendiente esos límites son: 0,02537-0,02566). Por lo tanto, el método es robusto.

2.4. Determinación de la Exactitud

Se define la exactitud, como la capacidad del método analítico de proporcionar resultados lo más próximos posible al valor considerado verdadero.

La exactitud refleja el error sistemático, que puede ser constante o proporcional a la cantidad de analito. Matemáticamente, la exactitud se expresa en forma de diferencia entre el valor hallado experimentalmente y el verdadero. Para llevar a cabo la determinación de la exactitud del método analítico, se realiza el estudio estadístico de los datos experimentales. Para ello, se utiliza, normalmente, el test estadístico de la "t- student" para determinar si el valor medio, hallado a partir de los datos, y el verdadero no difieren entre sí, significativamente, para un grado de probabilidad determinado.

Si la diferencia entre el valor verdadero y el valor hallado es pequeña la exactitud del método analítico es buena (*Garcés y col., 1988*).

Para realizar el estudio de exactitud del método espectrofotométrico, se analizan los datos experimentales obtenidos con anterioridad, en el estudio de la determinación de la linealidad del método.

En la tabla 2.6 se reúnen los resultados obtenidos en el estudio de la exactitud del método analítico. También se muestran los parámetros estadísticos resultantes del estudio: valor medio de las absorbancias obtenidas experimentalmente, desviación estándar con respecto al valor de esa media y el "t exp."

Tabla 2.6.- Estudio de la Exactitud del método: Resultados del análisis y Parámetros estadísticos

<i>Conc. $\mu\text{g/ml}$</i>	<i>Absorb. Media</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Valor Verdadero</i>	<i>Desviación Estándar de la Media</i>	<i>t_{exp}</i>
3	0,079	$5,773 \times 10^{-3}$	0,07411	$3,3330 \times 10^{-3}$	1,47
6	0,151	$7,549 \times 10^{-3}$	0,15067	$4,3584 \times 10^{-3}$	0,08
9	0,229	$9,291 \times 10^{-3}$	0,22723	$5,3641 \times 10^{-3}$	0,33
12	0,302	$5,686 \times 10^{-3}$	0,30379	$3,2828 \times 10^{-3}$	0,55
15	0,387	$7,211 \times 10^{-3}$	0,38035	$4,1632 \times 10^{-3}$	1,60
18	0,451	$4,163 \times 10^{-3}$	0,45691	$2,4035 \times 10^{-3}$	2,46
21	0,532	$1,000 \times 10^{-3}$	0,53347	$5,7736 \times 10^{-3}$	2,55
24	0,608	$2,645 \times 10^{-3}$	0,61003	$1,5272 \times 10^{-3}$	1,33
27	0,683	$2,000 \times 10^{-3}$	0,68659	$1,1547 \times 10^{-3}$	3,11
30	0,762	$2,081 \times 10^{-3}$	0,76315	$1,2015 \times 10^{-3}$	0,96
33	0,839	$2,516 \times 10^{-3}$	0,83971	$1,4526 \times 10^{-3}$	0,49
36	0,914	$2,886 \times 10^{-3}$	0,91627	$1,6662 \times 10^{-3}$	1,36
39	0,992	$2,309 \times 10^{-3}$	0,99283	$1,3331 \times 10^{-3}$	0,62
42	1,070	$2,645 \times 10^{-3}$	1,06939	$1,5271 \times 10^{-3}$	0,40

 n del Método Analítico

45	1,146	$9,570 \times 10^{-3}$	1,14595	$5,5279 \times 10^{-3}$	0,09
48	1,226	$2,309 \times 10^{-3}$	1,22251	$1,3331 \times 10^{-3}$	2,62

Al obtenerse, en todos los casos, valores de $t_{exp} < t_{tablas}$ (4,403) nos indica que no existen diferencias, estadísticamente significativas (con una probabilidad de $p < 0,05$) entre el valor verdadero y el obtenido experimentalmente, lo que nos indica que el método analítico tiene la exactitud requerida, dentro de los márgenes de concentraciones utilizadas en el estudio.

2.5. Determinación de la Especificidad

La Especificidad o Selectividad es la capacidad que tiene el método analítico de medir exacta y específicamente el analito, sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados o excipientes que puedan estar presentes en la muestra (*Karnes y col., 1991*).

En los barridos espectrofotométricos realizados con la solución de principio activo en tampón pH 7,0, no se han observado diferencias respecto a los efectuados con el principio activo disuelto en una solución sin tampón (*Figura 2.3*); por lo tanto, el tampón no interfiere en las mediciones. Luego, el método analítico es selectivo y específico, en las condiciones de trabajo estudiadas.

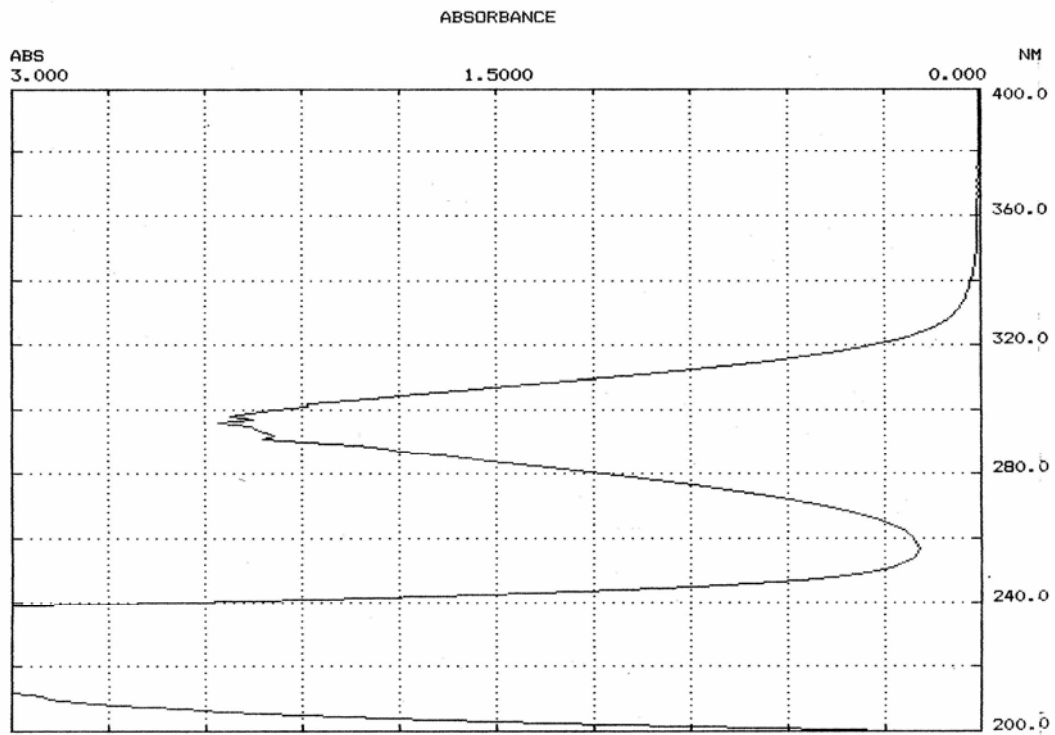


Figura 2.3. Espectro de absorción del ácido salicílico en tampón fosfato de pH 7.4

Capítulo 3 ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS ARTIFICIALES

Con el fin de estudiar la posible evolución que experimenta la cesión de una sustancia activa incorporada a una forma semisólida de uso tópico (emulsión O/A) en función del tipo de membrana, se realiza el estudio de la difusión del ácido salicílico (A.S.) a través de distintos tipos de éstas.

El transporte de principios activos a través de membranas depende de la difusión de la molécula en la superficie de la membrana, de su adsorción y su solubilidad en los constituyentes de la misma ().

Luego, la elección del tipo de membrana es importante en los estudios de transferencia de principios activos a través de las mismas, pues según la naturaleza de la membrana el fenómeno estudiado puede ser diferente (*Zuber y col., 1980*).

Las membranas que se estudian en este trabajo, que denominamos **TIPO I** y **TIPO II**, son: lipídicas, compuestas, no porosas, constituidas por colodión (soporte mecánico inerte), cuya función es mantener la integridad de la membrana y aceite de

ricino, como fase lipídica, que actúa como plastificante.

3.1. Membranas TIPO I

Estas membranas se van a utilizar para estudiar la transferencia del ácido salicílico, desde una emulsión óleo-acuosa hacia una fase receptora de naturaleza acuosa (solución tampón de fosfatos de pH 7.0). Su composición y elaboración, así como su tipificación se describen a continuación:

3.1.1. - Componentes de la membrana

Para preparar las membranas tipo I, que se utilizan en los ensayos de transferencia de ácido salicílico recogidos en el capítulo 4, se emplean los siguientes componentes:

- Piroxilina 2,5 g.
- Eter etílico 37,5 ml.
- Alcohol etílico 12,5 ml.
- *Aceite de Ricino* *X.0* g.

La cantidad de aceite de ricino (x) = 0.5g, 0.65g, 0.75g, 0.85g ó 1.0g que se incorpora al colodión (colodión: solución de piroxilina en una mezcla de alcohol y éter) es variable y tiene como finalidad disminuir la rigidez y fragilidad de las membranas que sólo contienen colodión; el resto de los componentes no varían. Por tanto, se obtienen 5 tipos de membranas diferentes dependiendo de la cantidad de ricino que lleven en su composición.

3.1.2. - Elaboración de las membranas

En general, las diferentes clases de membranas sintéticas se pueden obtener por distintas técnicas (*Leforet y col., 1977; Cadotte, 1985*). Esto es importante porque su estructura física depende del método de preparación que se utilice (*Cherjan, 1986*) y no sólo de los componentes que se empleen en la obtención de las mismas

(*Donbrow y Friedman, 1975*). En el presente estudio, la elaboración de las membranas se realiza según el siguiente protocolo (*Rodríguez Bayón, 1989*):

- 1º) En un erlenmeyer, provisto de tapón esmerilado, se pesa el aceite de ricino y se le añade el algodón pólvora, previamente pesado en un vidrio de reloj.
- 2º) Se lava el vidrio de reloj con sucesivas porciones de alcohol y se añaden esos líquidos al erlenmeyer.
- 3º) Se agita
- 4º) Se deja en reposo durante 5 minutos
- 5º) Se le añade el éter.
- 6º) La mezcla se agita, constantemente, hasta que se disuelva totalmente el algodón pólvora y se obtenga una mezcla homogénea, que denominamos "*solución madre*".

Esa solución madre es un líquido muy viscoso y no presenta las características adecuadas para obtener la membrana. Por ello, para disminuir la viscosidad y facilitar la extensión de la "*solución madre*" sobre el soporte de la membrana (mercurio), se hace la siguiente dilución:

- 7º) A 30 ml. de la solución madre, se le añaden 21 ml. de éter y 7 ml. de alcohol etílico.
- 8º) Se agita vigorosamente la mezcla.
- 9º) Se deja reposar hasta que no quede ninguna burbuja de aire interpuesta.
- 10º) Posteriormente, se extiende esta solución sobre una superficie lisa de mercurio (*Leforet y col., 1977; Donbrow y col., 1975*).

La forma de extender la membrana es fundamental, ya que este hecho va a influir sobre la homogeneidad de la misma. Por ello, se vierte la solución sobre el mercurio y con una varilla de vidrio se reparte por igual, por toda la superficie, sin que queden burbujas de aire. Posteriormente, se coloca una tapa especial sobre el recipiente y se deja que se evaporen los solventes orgánicos.

La velocidad de evaporación de los solventes, éter y alcohol etílico, es muy importante. Es fundamental que se efectúe lentamente () y en condiciones controladas. Así, al cabo de 24 horas ya se ha formado la membrana, y se puede retirar del soporte de mercurio (*Gurny y col., 1976*). Al final, al evaporarse el alcohol y el éter, las membranas Tipo I quedarán formadas, exclusivamente, por el algodón pólvora y la cantidad de aceite de ricino (A.R.) que se utiliza en su elaboración.

Una vez retiradas las membranas del soporte de mercurio, lo primero que se hace es observarlas para poder detectar posibles anomalías. Se examina su aspecto, color, flexibilidad, integridad (si se han retirado íntegramente del soporte de mercurio o por el contrario se han fracturado y han quedado restos de la membrana sobre él; si se ha realizado correctamente la extensión de la solución, ya que en caso contrario aparecerán orificios en la superficie de la membrana), etc. Todo ello para poder detectar los posibles defectos que existan en la membrana.

Una vez comprobado que la membrana está correctamente preparada se realizan los ensayos que se especifican a continuación.

3.1.3. - Ensayos de Membrana

Las pruebas que se realizan para caracterizar las distintas membranas tipo I, son:

- a) Caracteres organolépticos
- b) Espesor de la membrana
- c) Evolución ponderal de las membranas en contacto con solución
tampón de fosfatos de pH 7.0
- d) Resistencia a la ruptura
- e) Análisis morfológico

A continuación se detalla la realización de cada ensayo así como los resultados obtenidos.

a) Caracteres Organolépticos.

Una vez obtenidas las membranas tipo I se observan detenidamente y así se puede ver que las membranas que se preparan exclusivamente con colodión, sin ningún plastificante, no presentan características idóneas para los estudios de transferencia del ácido salicílico, ni tampoco para su manejo porque no presentan la flexibilidad adecuada, su superficie no es lisa y aparece arrugada sobre el soporte de mercurio. Esto mismo ya se observó en un trabajo anterior (*Rodríguez Bayón, 1989*).

Para dar elasticidad a estas membranas, a los componentes iniciales se le añade aceite de ricino que actúa como plastificante. La cantidad que se adiciona va a influir en las características y propiedades de la membrana. La cantidad mínima de ricino con la que se obtiene una membrana de características adecuadas para su estudio y manejo es 0,5 g. Conforme se aumenta la cantidad de ricino en membrana, ésta se hace más flexible, elástica y más fácilmente manejable.

Todas las membranas, independientemente de la cantidad de ricino que contengan, tienen un aspecto semejante: son transparentes, resistentes y tienen un débil olor característico, a aceite de ricino. Además, presentan una ligera tonalidad opalina, más o menos amarillenta dependiendo de la cantidad de aceite de ricino que contengan: a mayor cantidad de ricino, más amarillenta es la membrana.

b) Determinación del Espesor de la membrana

Para realizar esta determinación, se toma una membrana, se corta en 10 tiras iguales de 2 cm de ancho cada una, se apilan y se mide su espesor con un Nonius o "Pie de rey" por la zona central, superior e inferior. El mismo procedimiento se repite con tres membranas diferentes.

Una vez finalizadas las medidas, las tiras de cada una de las membranas utilizadas, se guardan para, posteriormente, utilizarlas en los ensayos de resistencia a la fractura, evolución ponderal de la membrana en contacto con lo que se utilizará como fase receptora en los ensayos de transferencia de ácido salicílico (solución tampón de fosfatos de pH 7.0) y en la observación de su morfología por microscopia electrónica de barrido.

Los resultados que se obtienen de las medidas de espesor, se recogen en la tabla 3.1 donde aparecen los valores individuales de espesor de cada membrana, el valor medio correspondiente a esos valores y la desviación estándar que se produce con respecto al valor medio.

Tabla 3.1.- Espesor de las membranas tipo I en función del contenido de aceite de ricino (A.R.)

<i>Cantidad de A. R. (g)</i>	<i>Espesor Membran N°1 (μm)</i>	<i>Espesor Membran N°2 (μm)</i>	<i>Espesor Membran N°3 (μm)</i>	<i>Espesor Valor medio (μm)</i>	<i>Desviación n Estándar</i>
0,50	39,2	39,4	39,6	39,40	0,2000
0,65	42,5	42,0	42,8	42,43	0,4041
0,75	44,0	44,2	44,8	44,33	0,4163
0,85	46,8	46,6	46,5	46,63	0,1527
1,00	48,8	49,1	49,2	49,03	0,2082

c) Evolución ponderal (Imbibición) de la membrana en contacto con solución tampón de fosfatos de pH 7.0

Este ensayo se realiza con objeto de ver si la membrana sufre alguna modificación, debida a captación de líquido o pérdida de alguno de sus componentes, cuando se pone en contacto con una solución tampón de fosfatos de pH 7.0, que es la que se utiliza como fase receptora en los ensayos de

transferencia del ácido salicílico a través de membranas tipo I, que aparecen recogidos en el Capítulo 4 de esta memoria.

Como paso previo a la realización de este ensayo, al retirar la membrana del soporte de mercurio, se mide y se pesa, con la mayor exactitud posible, y se establece la **Relación Peso/Superficie**. Para ello se utilizan, para cada valor de cantidad de ricino, cuatro membranas idénticas elaboradas, con: 0.5 ; 0.65 ; 0.75 ; 0.85 ó 1.00 gramo de aceite de ricino.

En la tabla 3.2 se recogen los resultados de estas determinaciones.

Tabla 3.2.- Relación peso/superficie en función de la cantidad de aceite de ricino presente en la membrana tipo I

<i>ACEITE DE RICINO</i>		<i>MEMBRANA</i>	
<i>Cantidad de aceite de ricino</i>	<i>Valor medio (mg/cm²)</i>	<i>Relación peso/ superficie</i>	<i>Desviación</i>
<i>0,50</i>	6,1845		$1,96 \times 10^{-3}$
<i>0,65</i>	6,1962		$1,83 \times 10^{-3}$
<i>0,75</i>	6,2087		$1,54 \times 10^{-3}$
<i>0,85</i>	6,2197		$1,35 \times 10^{-3}$
<i>1,00</i>	6,2221		$1,01 \times 10^{-3}$

Una vez establecida la relación peso/superficie de las membranas de ricino (Tipo I), se estudia la **evolución ponderal** de la membrana en contacto con la solución tampón pH 7.0. Para ello, como se mencionó anteriormente, se utilizan las mismas muestras que se emplean para medir el espesor de las membranas.

El ensayo de la evolución ponderal se hace, por triplicado, de la siguiente manera:

- 1º) Se corta la membrana en tiras de 2 cm de ancho.
- 2º) De la tira del centro, se corta un rectángulo de 6 cm de largo.
- 3º) Este rectángulo (12 cm^2), exactamente pesado, se sumerge en un cristalizador (11,2 cm de diámetro x 6,2 cm de altura) ó en una placas petri (9,2 cm de diámetro x 1,5 cm de altura) que contienen la solución tampón de fosfatos pH de 7.0.
- 4º) El rectángulo se mantiene sumergido 24 horas en el tampón.
- 5º) Cada 8 horas, se saca, se seca al aire, y se pesa. También,
- 6º) Se toman muestras del tampón, se leen en el espectrofotómetro y se comprueba, mediante las lecturas de absorbancias, si se ha producido alguna modificación en la membrana.

La forma de apreciar alguna modificación es: pesando, exactamente, la membrana en una balanza analítica, antes y después de sumergirla en la solución tampón. Esas muestras, después de secas, se pesan a las 8, 16 y 24 horas de sumergidas en el tampón. Los resultados obtenidos, en nuestro caso, se recogen en la tabla 3.3 donde la evolución ponderal de la membrana aparece como la pérdida (-) o ganancia (signo +) de peso, por parte de la membrana, expresada en forma de porcentaje.

Tabla 3.3.- Variación de peso de las distintas Membranas tipo I al permanecer en contacto con el tampón 24 horas

<i>Cantidad de Aceite de Ricino (g)</i>	<i>Pérdida (%)</i>	<i>Desviación n</i>	<i>Absorbancia</i>
<i>0,50</i>	-0,0786	0,00899	0,001
<i>0,65</i>	+0,0608	0,01054	0,001
<i>0,75</i>	+0.1553	0,01179	0,000
<i>0,85</i>	+0,2799	0,01199	0,001
<i>1,00</i>	+0,3105	0,01206	0,000

Otros autores emplean agua (*Thacharodi y Rao, 1993; Corti y col., 1998 e Imanidis y col., 1998*) o una solución de acetona (*Thacharodi y Rao, 1993*), en lugar de solución tampón, para determinar, por un procedimiento parecido a éste, si se produce incremento de peso debido a la captación de agua (imbibición) por las membranas de, respectivamente, chitosan, 2-hidroxietil-acetato o celgard-2500[®], que utilizan esos autores en sus ensayos.

Más recientemente, en la literatura aparecen trabajos (*Días y col., 2001*) en los que la imbibición que puede experimentar la membrana se mide por el incremento de espesor que puede producirse en la membrana al sumergirla, durante un tiempo determinado, en una solución de naturaleza acuosa u orgánica, dependiendo de las características de la membrana.

d) Resistencia a la Ruptura o Fractura

Este ensayo se realiza para conocer las propiedades de flexibilidad de las membranas. Para ello, se emplea el Analizador de Texturas o Tensiómetro TA.XT2i/25 Kg de Stable Micro Systems[®] (*figura 3.1*) que presenta gran versatilidad debido a la enorme cantidad de accesorios que posee.

TA.XT2 i /25 Kg.

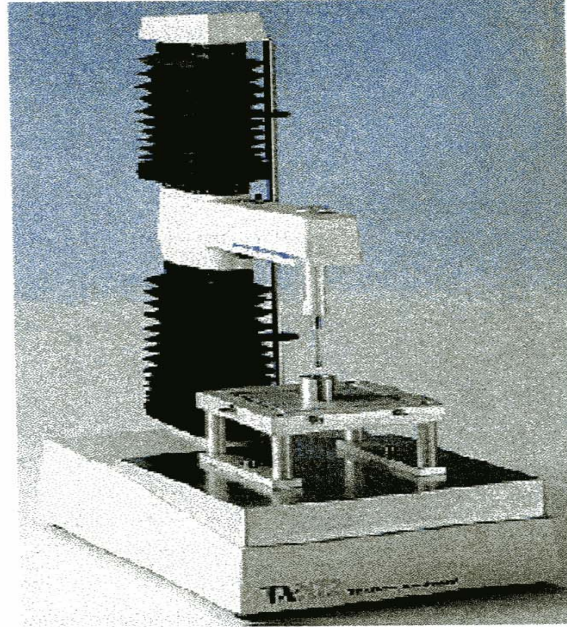


Figura 3.1: Tensiómetro utilizado en los ensayos de ruptura de las membranas

En el presente estudio, para sujetar la membrana a ensayar, se utilizan las pinzas (sonda de tensión A/SPR con célula de carga de 25 kg) y se calcula la fuerza necesaria para producir la fractura o rotura de la membrana. El aparato permite cuantificar fuerzas y distancias, tanto en tensión, como en compresión. En nuestro caso, la medida se realiza en tensión.

La máxima fuerza que se puede desarrollar, en este caso, es de 25 Kg con una resolución de 1,0 g. y una exactitud de 0,025%. El intervalo de velocidades que experimenta oscila entre 0,1-10 mm/s; en el primer intervalo (0,1-5 mm/s) la precisión del aparato es de 0,01% y de 0,1% cuando las velocidades oscilan entre 5-10 mm/s. El brazo del aparato es capaz de recorrer una distancia de 0,1 a 295 mm con una variación de 0,01 mm. También es capaz de realizar ensayos cíclicos.

El aparato está controlado por un ordenador, que graba

valores de velocidad, tiempo, distancia y fuerza, pudiendo cuantificar los resultados tanto en tensión como en compresión. El programa incluye análisis estándar de perfil de textura, adhesión, ciclos de fatiga y relajación.

Los parámetros que se utilizan en la determinación de la resistencia a la ruptura de la membrana, aparecen recogidos en la tabla 3.4.

Tabla 3.4.- Parámetros del analizador de textura para realizar la medida de la Fuerza de Ruptura (Modo: TENSIÓN)

<i>Modo</i>	<i>Medida de la Fuerza en tensión</i>
<i>Opción</i>	Vuelta al inicio
<i>Velocidad ensayo</i>	1,0 mm/s
<i>Umbral de Distancia</i>	30 mm
<i>Umbral de Fuerza</i>	5 g
<i>Distancia entre las pinzas</i>	8 cm
<i>Adquisición de los datos</i>	200 pps

Las muestras, en estos ensayos, son las mismas que se emplean para medir el espesor de la membrana; son tiras de 2 cm de ancho que se colocan en la sonda de tensión (A/SPR) con una distancia de separación entre las pinzas de 8 cm.

El ensayo comienza cuando se alcanza el umbral de fuerza (5g); entonces, el texturómetro recorre, a una velocidad de 1,0 mm/s, la distancia necesaria para conseguir la ruptura de la muestra. Una vez que se produce la fractura, el ensayo termina automáticamente. En total, se realizan cuatro ensayos para cada tipo de membrana.

En la tabla 3.5 se recogen los resultados obtenidos con las distintas membranas tipo I analizadas.

Tabla 3.5.- Fuerza máxima (valores medios) que hay que aplicar para que se rompa la membrana

<i>Cantidad de Aceite de Ricino (g)</i>	<i>Fuerza Máxima Media (Ruptura Kgf)</i>
0,50	2,705210
0,65	4,765307
0,75	3,653253
0,85	3,784786
1,00	4,785328

e) Análisis Morfológico

Se estudia la morfología de las distintas membranas observándolas, por microscopia electrónica de barrido, con un microscopio electrónico JEOL ® JSM-6400.

Se realizan dos series de ensayos:

- uno con las *membranas sin tratar* y
- otro con las *membranas humectadas*, durante 24 horas, con tampón fosfatos de pH 7.0 y después secadas al aire.

En ambos casos, el examen se realiza sobre una pequeña porción de membrana, que se corta de la zona intermedia de las mismas muestras que se utilizan para medir el espesor de cada membrana. Ese círculo se coloca sobre un soporte metálico y se recubre con una finísima capa de oro (15nm de espesor), para poder observarlas por microscopia electrónica.

Las condiciones que se utilizan son: 10 kV (voltaje de aceleración del haz de electrones), valor inferior al que emplean, 15kV, Åkerman y col. (1998) en sus estudios de membranas de ácido poliacrílico, sin tratar (sin humectar) y humectadas, durante 48 horas, con soluciones tampón de pHs 2.0 y 8.6.

3.3. Membranas TIPO II

Estas membranas son las que se usan, como fase dadora, para estudiar la cesión del ácido salicílico desde la propia membrana al líquido receptor (tampón fosfatos pH 7.0) que se recogen en el capítulo 5 de esta memoria.

La composición, elaboración y tipificación de estas membranas se describe a continuación:

3.2.1. - Componentes de la membrana

Las membranas tipo II, que se emplean en los ensayos de cesión de ácido salicílico recogidos en el capítulo 5 de esta memoria, se elaboran a partir de membranas tipo I que llevan 0,85 g de aceite de ricino en su composición. Se elige esa cantidad de plastificante por ser la mínima que le confiere a la membrana las características y propiedades adecuadas de elasticidad y flexibilidad para su manejo.

Por tanto, para elaborar las membranas tipo II, se utilizan los mismos componentes, y en las mismas proporciones, que en la preparación de la membrana tipo I, con 0.85g de aceite de ricino y lo único que se modifica es la cantidad de ácido salicílico que se incorpora, físicamente, a la membrana.

Luego, para obtener las membranas tipo II, se parte de los siguientes componentes y proporciones:

- Piroxilina	2,5 g.
- Eter etílico	37,5 ml.
- Alcohol etílico	12,5 g.
- Aceite de Ricino	0,85 g.
- <i>Acido Salicílico</i>	<i>X %</i>

Donde X , toma el valor de 0.15%, 0.25%, 0.35%, 0.50%, 0.75% ó 1.00% de ácido salicílico (A.S), el resto de los componentes no varía. Se obtienen así seis diferentes membranas tipo II, dependiendo de la cantidad (porcentaje) de ácido salicílico que lleven en su composición.

3.2.2. - Elaboración de las membranas

Como ya se expuso en el epígrafe 3.1.2. la forma de elaborar las membranas es muy importante porque va a influir en las características que presente la membrana al final del proceso. Por ello, a continuación se detalla la forma en que se obtienen estas membranas tipo II.

- Se prepara una “*solución madre*”, como se indica en los seis primeros puntos del apartado 3.1.2., como si se fuese elaborar una membrana tipo I con 0,85 g de aceite de ricino.
- Una alícuota de la solución madre se diluye, como se especifica en el punto 7º de ese apartado y sobre ella,
- se añade la cantidad necesaria de ácido salicílico para obtener la membrana con el porcentaje de principio activo que se quiera tener.
- La mezcla se agita vigorosamente hasta que el ácido salicílico se disuelva
- La solución se deja reposar hasta que no quede ninguna burbuja de aire interpuesta.
- Después se extiende sobre el mercurio, se tapa para que no caiga polvo, de la misma forma que cuando se preparan membranas tipo I.
- Se deja que se evaporen, totalmente, los solventes a temperatura y presión ambiente y después de 24 horas la membrana tipo II ya

está formada.

La técnica de la evaporación de solventes es una técnica que también emplean otros muchos autores para preparar muy diversas membranas: de resinas acrílicas con ácido salicílico (*Liebowitz y col., 1987*), de ácido hialurónico, con diversos principios activos (*Joshi y col., 1992*), de 2-hidroxi-etil-acetato con clonazepan (*Corti y col., 1998*) o de poli-etilen-vinil-acetato (EVA) y poli-4-metil-1-pentano, conteniendo nitroglicerina (*Wang y col., 1998*).

Es muy importante, como ya se ha especificado anteriormente, controlar la temperatura y velocidad de eliminación de los solventes. La evaporación se puede hacer, a temperatura ambiente durante 24 horas, como es nuestro caso y el de otros autores (*Corti y col., 1998*), o bien emplear temperaturas de 50°C y tiempos tan cortos como 30 segundos (*Wang y col., 1998*). Algunos de esos autores, además, aplican vacío para eliminar los solventes más rápidamente y obtener membranas más homogéneas (*Corti y col., 1998*).

En nuestro caso, al final, al evaporarse el alcohol y el éter, las membranas tipo II que se obtienen, están formadas por una cantidad fija de algodón pólvora y aceite de ricino y una proporción variable de ácido salicílico (A.S).

El fármaco se incorpora físicamente en la membrana y ésta constituye, por sí misma, la fase dadora en los estudios de liberación “*in vitro*” que se recogen en el Capítulo 5 de esta memoria.

3.2.3.- Ensayos de Membrana

Como en el caso de las membranas tipo I, para estudiar las características de las membranas tipo II se realizan una serie de ensayos.

a) Caracteres Organolépticos

Una vez separadas del soporte de mercurio, las membranas tipo II se observan

detenidamente. Son películas, suaves al tacto, brillantes, transparentes, de color claro y aspecto semejante al de las membranas tipo I, por lo que a simple vista no se aprecian diferencias, salvo en las membranas que contienen 0,75 ó 1.00% de ácido salicílico que, al observarlas cuidadosamente al trasluz, muestran una serie de puntos blancos de muy pequeño tamaño, que apenas son perceptibles; aún así, estas membranas también son transparentes, aunque ligeramente amarillentas.

Las membranas tipo II se diferencian de las tipo I en que se pueden romper más fácilmente, en que son más frágiles.

b) Determinación del Espesor de la membrana

Esta determinación se realiza del mismo modo que se especifica en el

apartado correspondiente a las membranas tipo I (3.1.3.b), cortando la membrana en tiras del mismo tamaño, que se apilan y se miden, en tres zonas diferentes: superior, media e inferior, con un “Pie de rey”.

Los resultados que se obtienen de las medidas de espesor de las membranas ensayadas, se consignan en la tabla 3.6.

Tabla 3.6.- Espesor de las membranas tipo II en función de su contenido en principio activo: ácido salicílico (A.S.)

<i>Cantidad de P.A. (%)</i>	<i>Espesor Membran a N°1 (μm)</i>	<i>Espesor Membran a N°2 (μm)</i>	<i>Espesor Membran a N°3 (μm)</i>	<i>Valor medio Espesores (μm)</i>	<i>Desviación n Estándar</i>
0,15	48,1	48,3	48,5	48,30	0,2000
0,25	50,5	50,2	50,1	50,27	0,2082
0,35	51,4	51,6	51,2	51,50	0,1414
0,50	52,8	52,7	52,1	52,53	0,3786
0,75	55,6	55,1	55,2	55,30	0,2646
1,00	57,8	57,3	57,0	57,37	0,4041

c) Evolución ponderal de la membrana en contacto con solución tampón de fosfatos de pH 7.0

Con las membranas tipo II no se realiza el ensayo de la evolución ponderal de la membrana en contacto con el tampón, debido a que al estar incorporado físicamente el ácido salicílico a la membrana, al sumergir éstas en el tampón se liberaría el principio activo y lo que determinaríamos por espectrofotometría, sería dicho ácido, no la modificación del peso de la membrana por captación (imbibición) de la solución tampón o por pérdida de algún componente de la misma, distinto del ácido salicílico, lo cual no es el objetivo de este ensayo.

No obstante, sí se realiza la determinación de la *Relación Peso/superficie* de membrana. El ensayo se lleva a cabo siguiendo el procedimiento que aparece recogido en el apartado 3.1.3.c. En total, se realizan 4 determinaciones para cada tipo de membrana.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 3.7, donde aparecen los valores medios, y sus respectivas desviaciones

Componentes y Ensayos

estándar, en función del porcentaje de ácido salicílico que lleve la membrana.

Tabla 3.7.- Relación Peso/Superficie de las membranas tipo II en función de su contenido en principio activo: ácido salicílico (A.S.)

<i>ACIDO SALICILICO</i>	<i>MEMBRANA TIPO II</i>	
<i>Porcentaje de Acido Salicílico (%) A.S.</i>	<i>Relación peso/ superficie Valor medio (mg/cm²)</i>	<i>Desviación Estándar (s)</i>
<i>0,15</i>	6,4868	0,09941
<i>0,25</i>	6,9319	0,08954
<i>0,35</i>	7,1100	0,08522
<i>0,50</i>	7,3771	0,05654
<i>0,75</i>	7,8267	0,02764
<i>1,00</i>	8,2675	0,01873

d) Resistencia a la Rotura y Fractura

Este ensayo se realiza como se especifica en el apartado 3.1.3.d de esta memoria.

Los parámetros que se utilizan para realizar estos ensayos son los mismos que los que se emplean en el análisis de las membranas tipo I que aparecen recogidos en la tabla 3.4. Los resultados que se obtienen al ensayar las membranas tipo II se consignan en la tabla 3.8.

Tabla 3.8.- Valores medios de la Fuerza máxima que hay que aplicar para que se rompan las membranas tipo II en función de su contenido en ácido salicílico (A.S.)

<i>Cantidad de A.S. (%)</i>	<i>Fuerza Máxima Media (Ruptura Kgf)</i>
<i>0,15 % A.S.</i>	1,397934
<i>0,25 % A.S.</i>	3,162329
<i>0,35 % A.S.</i>	2,774485
<i>0,50 % A.S.</i>	3,226505
<i>0,75 % A.S.</i>	2,467656
<i>1,00 % A.S.</i>	2,352000

e) Estudio Morfológico

Las muestras de las membranas tipo II que se utilizan en la determinación del espesor, se usan también, para estudiar su morfología; para ello, se observa cada una de ellas por microscopía electrónica de barrido.

El ensayo se realiza como se expone en el *apartado 3.1.3.e*. Sin embargo aquí el voltaje de aceleración del haz de electrones es de 20 kV de potencia, que es superior al que emplean Åkerman y col. (15 kV) en el estudio de membranas de ácido poliacrílico, humectadas durante 48 horas en soluciones tampón de pHs 2.0 y 8.6 y , sin humectar (Åkerman y col. 1998).

3.3. COMENTARIOS

3.3.1. Membranas tipo I

De los resultados obtenidos en los diferentes ensayos realizados con las membranas tipo I se pueden hacer los siguientes comentarios:

a) Con respecto al Espesor de las membranas.

Las membranas que se obtienen son membranas muy finas, de 40-50 μm de espesor, dependiendo de la cantidad de aceite de ricino que lleve la membrana: a mayor cantidad de ricino, mayor espesor tiene la membrana.

Ese valor de espesor es doble del que tienen las membranas que utilizan otros autores en los ensayos de cesión de diversas sustancias. Así, las membranas de quitosán que se utilizan para estudiar la cesión de nifedipino (*Thacharodi y Rao, 1993*) o las Visking que se emplean en los estudios con sulfato de salbutamol, tienen 20 μm de espesor; las Celgard-3401[®] y Celgard-2400[®] que se usan para ese mismo principio activo (*Rodríguez-Bayón y col., 1993*) o en los ensayos de transferencia de cafeína y ácido benzoico (*Farell y Sirkar, 2001*) 25 μm y las membranas Celgard-2500[®] que Imanidis y col. utilizan para estudiar la cesión de ácido salicílico, tienen espesores comprendidos entre 23-28 μm (*Imanidis y col., 1998*).

Sin embargo, también se encuentran en la literatura trabajos que describen ensayos de cesión, en los que se utilizan membranas de espesores superiores a los de las membranas tipo I. Son, por ejemplo, las membranas de celofán, con casi el doble de espesor (70 μm) (*Pepas y Sundaram, 1995*), o las Celgard-4500 con un espesor de 175 μm (*Rodríguez-Bayón y col., 1993*) o membranas de silicona que pueden tener espesores de: 90 μm (*Pellet y col., 1997b*), 127 μm (*Smith e Irwin, 2000*), 275 μm (*Pellet y col., 1997a*), 400 μm (*Dias y col., 2001*) o incluso 700 μm (*Pellet y col., 1997b*). Esas membranas se emplean en los estudios de cesión de: sulfato de salbutamol (*Rodríguez-Bayón y col., 1993*), 4-cianofenol (*Pellet y col., 1997a y b*), ácido salicílico (*Smith e Irwin, 2000 y Dias y col., 2001*) o ácido benzoico (*Dias y col., 2001*).

 componentes y Ensayos

En nuestro caso, como se puede observar por los resultados de la tabla 3.1 representados en la *figura 3.2* y se expuso al principio, el espesor de la membrana aumenta con el incremento de la cantidad de aceite de ricino que la compone y además, se puede decir que, existe una relación lineal entre ambos parámetros, ya que el valor del coeficiente de correlación de la recta que se obtiene al representar los valores de espesor de membrana frente a cantidad de aceite de ricino en la misma, es mayor de 0.99 ($r = 0.9986$). La ecuación de la recta es (ecuación 3.1):

$$\text{Espesor } (\mu\text{m}) = 29,7396 + 19,50 \text{ Aceite de ricino (g)} \quad (r=0.9986) \quad (\text{Ec. 3.1})$$

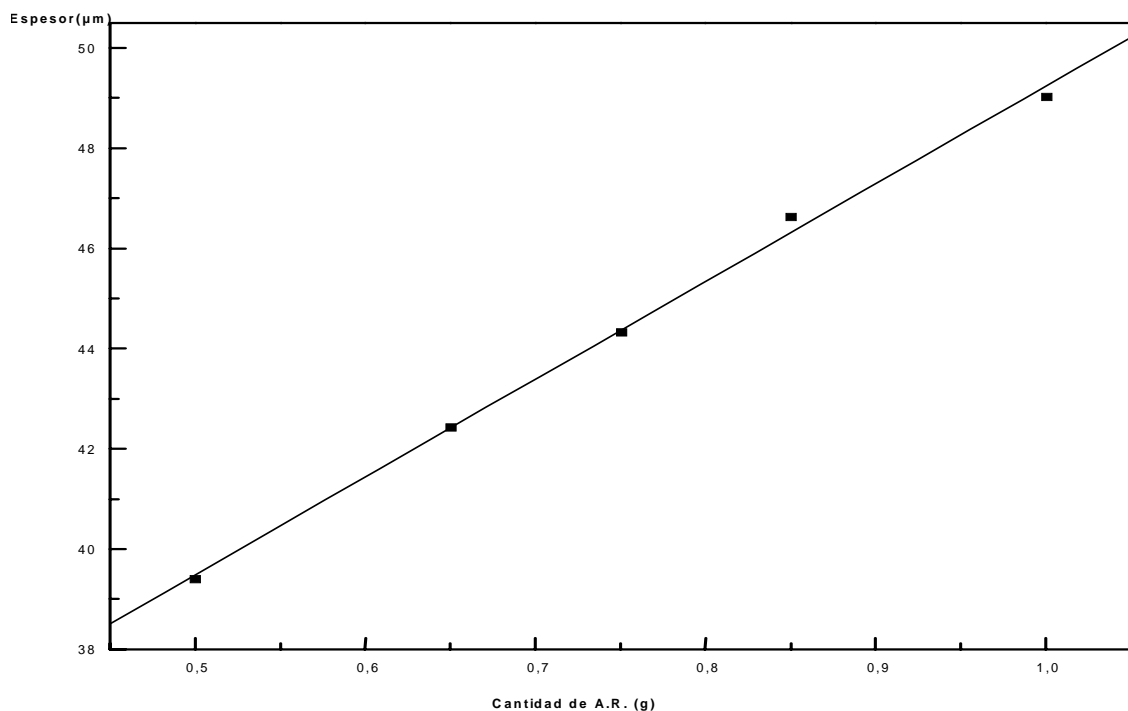


Figura 3.2 Relación entre el espesor de las membranas tipo I y su contenido en aceite de ricino

b) Con respecto a la Relación Peso/superficie

De los datos obtenidos se puede ver que, al incrementar la cantidad de aceite de ricino que forma la membrana, se produce un aumento en los valores de la relación peso/superficie; pero, a diferencia de lo que ocurre con los valores de espesor de membrana, al hacer la representación gráfica de los datos recogidos en la tabla 3.2 (*Figura 3.3*), en lugar de existir una clara relación lineal entre esos parámetros, parece que esa relación sí se da en los primeros puntos, los correspondientes a membranas que contienen hasta 0,85 g de aceite de ricino en su composición, pero a partir de ese valor de

omponentes y Ensayos

plastificante (A.R.) se pueden considerar dos posibles tratamientos de datos:

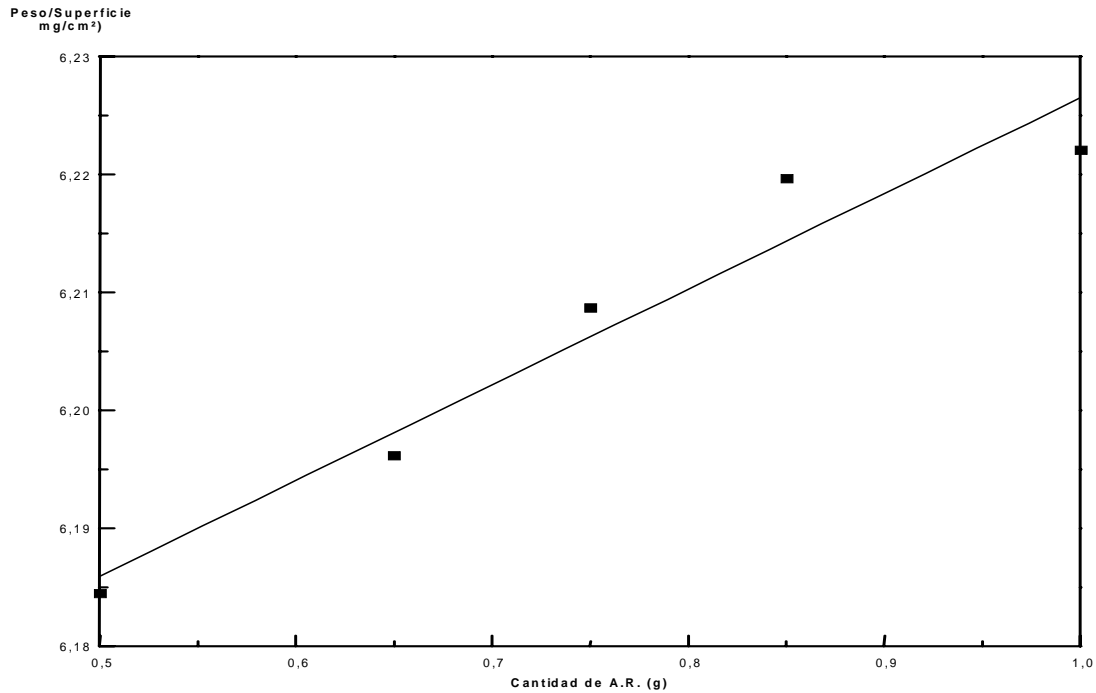


Figura 3.3 Relación entre (peso/superficie) de las membranas tipo I y su contenido en aceite de ricino.

1º) Si consideramos que todos los puntos representados en la figura 3.3 se ajustan a una recta, la ecuación (ecuación 3.2) sería:

$$\text{Peso/superficie (mg/cm}^2\text{)} = 6,1455 + 0,0810 \text{ Aceite de ricino (g) } (r=0,9699) \text{ (Ec.3.2)}$$

donde la cantidad de ricino en membrana es, x = desde 0.50g hasta 1.00g.

2º) Pero, también, podría considerarse que esos puntos describen, inicialmente, un trazado rectilíneo (para valores de x = 0,50g - 0,85g de aceite de ricino), que después se suaviza (para $x > 0,85$ g) y se convierte en una meseta.

Al realizar el tratamiento de datos considerando esta última hipótesis, el tramo rectilíneo estaría formado sólo por los valores correspondientes a las membranas que contienen de 0.50g a 0.85g de ricino. La ecuación que definen esos puntos (ecuación 3.3) es:

$$\text{Peso/superficie (mg/cm}^2\text{)} = 6,1324 + 0,1016 \cdot \text{ Aceite de ricino (g) } (r = 0,9945) \text{ (Ec.3.3)}$$

omponentes y Ensayos

Al comparar los coeficientes de correlación (**r**) y los términos independientes (**b**), de ambas ecuaciones (ecuaciones 3.2 y 3.3), se aprecia que:

1º) **r** (ecuación 3.3) > **r** (ecuación 3.2). Luego, es mejor el ajuste de los puntos a la ec. 3.3
 2º) El valor del término independiente de la ecuación 3.3 (**b**_{teórico}= 6,1324mg/cm²) es prácticamente igual al del límite superior del intervalo de valores experimentales obtenido por Rodríguez-Bayón utilizando membranas de ricino (Intervalo = 5,3977±0,7364 mg/cm², **b experimental** = 6,1341mg/cm²). Sin embargo, el valor del término independiente de la ecuación 3.2. (**b**_{teórico}= 6.1455 mg/cm²) es superior a ese límite y no se encuentra dentro del intervalo de valores experimentales (Rodríguez-Bayón, 1989). Por lo tanto, se considera más correcto el último tratamiento de datos, a partir del que se obtiene la ecuación 3.3.

c) Con respecto a la evolución ponderal de la membrana en contacto con la solución tampón de fosfatos

Se puede decir que con este ensayo se adquiere un dato complementario para explicar el comportamiento de la membrana en los procesos de difusión del ácido salicílico que se estudian en el capítulo 4 de esta memoria. Es importante que la membrana permanezca inalterable en contacto con la solución tampón de fosfatos de pH 7.0, que es la fase receptora que se utiliza en los ensayos de transferencia de principio activo, sin presentar, ni pérdidas de peso, por disolución de algún componente, ni aumento, por incorporación de líquido con el que está en contacto (imbibición).

Las posibles modificaciones que se puedan producir en la membrana se comprueban, como se expuso anteriormente, pesándolas antes y después de sumergirlas en la solución tampón, y contrastando las diferencias de pesada, entre el peso inicial y el final.

Al realizar este ensayo se observa que las membranas que contienen 0,5g de aceite de ricino experimentan un ligerísimo descenso de peso, que no supera, al cabo de 24 horas, el 0,08% de su peso inicial. Las demás membranas estudiadas evolucionan aumentando de peso al ir incrementándose la cantidad de aceite de ricino que contienen. Aunque, parece que en las membranas que contienen más de 0.5 g de aceite de ricino se produce una imbibición, el incremento de peso que sufren en 24 horas es tan insignificante ($\pm 0,012\%$ del peso inicial), que podemos considerar que no se modifican, ya que según datos bibliográficos (Dias y col.,2001), imbibiciones inferiores al 10% no producen modificaciones significativas en la membrana.

El carácter hidrófobo de la membrana es debido a sus componentes (colodión + aceite de ricino) que oponen tal resistencia a la penetración de la solución de fosfatos, que hacen que prácticamente no entre nada de esa solución, de naturaleza acuosa, en la membrana lo que hace que apenas se modifique su peso al ponerla en contacto con ese medio. A conclusiones similares llegan Imanidis y col. al utilizar membranas hidrófobas de polipropileno (*Imanidis y col. 1998*).

Sin embargo, existen otro tipo de membranas de colodión, que llevan trioleilfosfato (TOF) como plastificante, que al ser ésta una molécula más hidrófila que el ricino, cuando se sumergen esas membranas en una solución tampón de fosfatos pH 7.0, sí experimentan pérdidas de peso significativas, porque parte del TOF se disuelve en el tampón. Ello repercute, lógicamente, en una modificación de la porosidad de la membrana y, en consecuencia, en la difusión de la sustancia a ensayar (*Rodríguez-Bayón, 1989*).

No obstante todo lo mencionado anteriormente, aunque en las microfotografías de la estructura de las membranas de ricino, obtenidas por microscopía electrónica de barrido que se comentarán más adelante, no se observan poros, la escasa cantidad de solución acuosa que penetra en la membrana, probablemente, lo hace por capilaridad. Del mismo modo que ocurre en las fibras de polipropileno que utilizan en sus estudios Lopérgolo y col. (*Lopérgolo y col., 2000*). Incluso las dos últimas porciones de la representación gráfica de sus datos es bastante similar a la que obtenemos si representamos los valores de porcentaje de modificación del peso de la membrana, recogidos en la Tabla 3.3, en función de la cantidad de aceite de ricino que lleva la membrana (*figura 3.4*).

Según se ve en esa figura 3.4, parece existir una relación entre la evolución ponderal de la membrana y su contenido en aceite de ricino; además, se puede apreciar que la distribución de los puntos es semejante a la de la figura 3.3, por lo que en el estudio de los resultados se podrían aplicar los mismos tratamientos de datos que en el caso anterior (Relación peso/superficie de membrana). Luego,

1º) Si consideramos que todos los puntos se ajustan a una recta, la ecuación que se obtiene es (ecuación 3.4):

$$\text{Variación de Peso (\%)} = -0,4709 + 0,8219 \text{ Aceite de Ricino (g)} \quad (r= 0,9763) \quad (\text{Ec. 3.4})$$

omponentes y Ensayos

2º) Si, por el contrario, se considera que solo los primeros 4 valores son los que definen un trazado rectilíneo (x = 0.5g -0.85g de aceite de ricino), la ecuación es (ecuación 3.5):

$$\text{Variación de peso (\%)} = -0.5911 + 1,0116 \text{ Aceite de Ricino(g)} \quad (r= 0.9974) \quad (\text{Ec. 3.5})$$

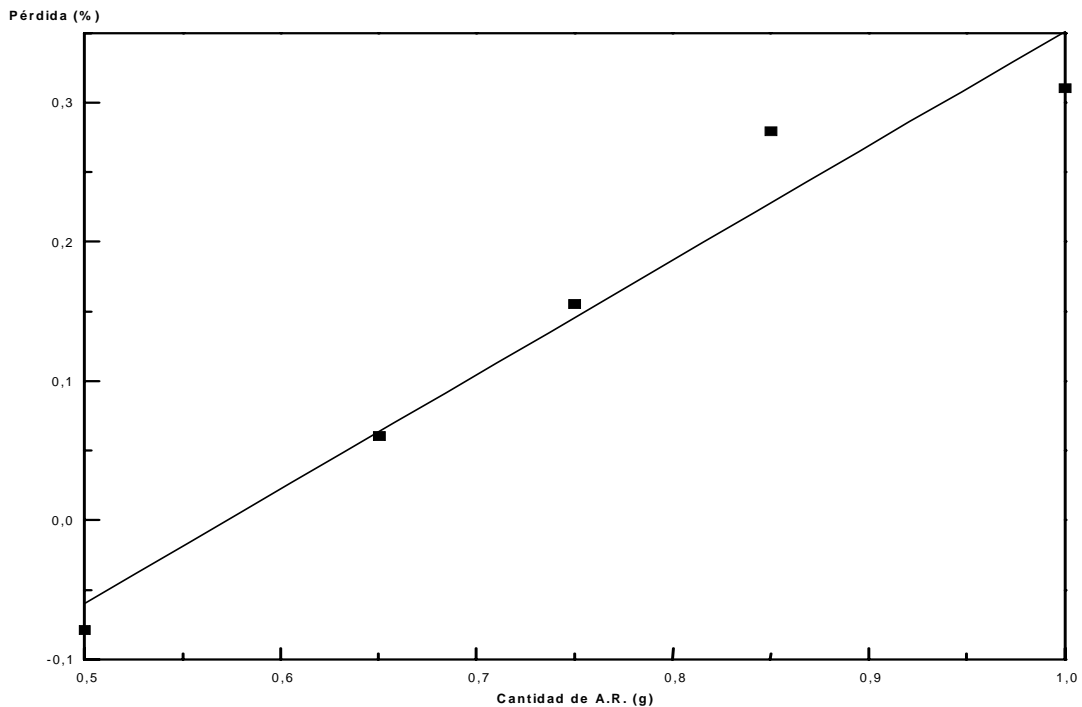


Figura 3.4 Evolución porcentual del peso de la membrana en contacto con solución tampón de pH 7.0 vs cantidad de aceite de ricino contenido en la membrana

Luego, por medio de esos dos ensayos (relación peso/superficie y evolución ponderal de las membranas en contacto con el tampón) se obtienen resultados similares: el mejor ajuste de los datos experimentales se consigue considerando que, a partir de 0.85 g. de ricino, la cantidad de ricino en membrana no influye en la evolución ponderal de la membrana en contacto con el tampón, ni en la relación peso/superficie, puesto que, a partir de ese valor, se alcanza la zona asintótica de la gráfica. Lopérgolo y col.(2000), también obtienen un trazado similar y explican en su trabajo, realizado con fibras de polipropileno, que el incremento en la imbibición de las fibras es debida a la mayor compatibilidad que se produce entre la superficie de las fibras y el agua, que provoca un aumento en la capilaridad y, por tanto, en la imbibición de esas fibras.

d) Con respecto a la resistencia a la ruptura y fractura

En cuanto a los resultados de la determinación de la resistencia a la ruptura o

Componentes y Ensayos

fractura de estas membranas, en la *figura 3.5* se representan las curvas correspondientes a los valores de fuerza que hay que aplicar para conseguir romper cada una de las diferentes membranas de ricino que se utilizan en los estudios de transferencia de ácido salicílico.

Por tanto, en la *figura 3.5* aparecen las curvas de fractura que se obtienen con cada una de las membranas Tipo I, de: 0.50g, 0.65g, 0.75g, 0.85g ó 1.00g de aceite de ricino. En la parte inferior de cada una de esas gráficas, aparece el valor de fuerza de tensión media necesaria para romper cada una de esas membranas.

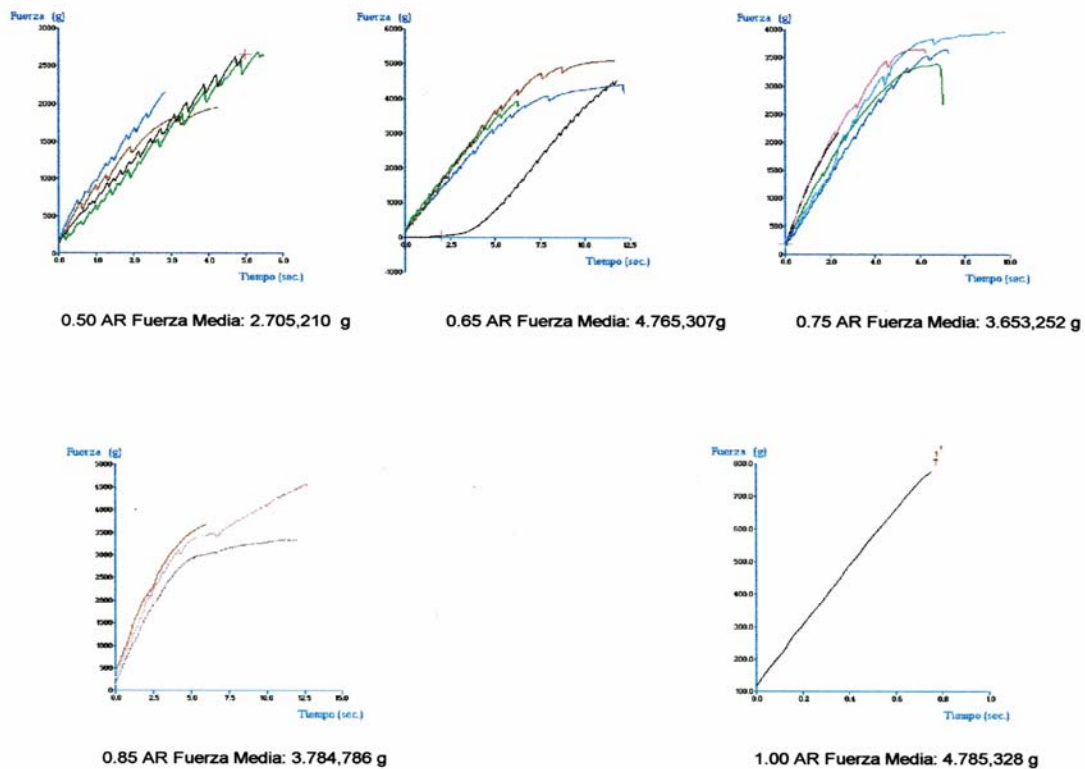


Figura 3.5 Representación gráfica de las fuerzas de tensión aplicadas para romper las distintas membranas Tipo I que contienen: 0.5,0.65,0.75,0.85 ó 1g de aceite de ricino

Para poder ver, más claramente, como influye la cantidad de plastificante (aceite de ricino) en la resistencia a la fractura que ofrece la membrana se realiza la *Figura 3.6*. En la parte *Izquierda* de esa figura se representan las curvas medias correspondientes a cada membrana de aceite de ricino representada en la *figura 3.5* y, en la parte de la

omponentes y Ensayos

Derecha se representa, mediante histogramas, la fuerza media de tensión que tiene que ejercer el aparato para romper esas membranas.

Como se ve, según va aumentando la cantidad de ricino en la membrana, hay que aumentar la fuerza de tensión para romperlas, excepto en el caso de la membrana que contiene 0,65 g de aceite de ricino (barra azul) que, seguramente, debido a alguna anomalía, necesita para su ruptura que se aplique una fuerza de tensión mayor a la que le correspondería por su contenido en aceite de ricino.

Muestras A.R.

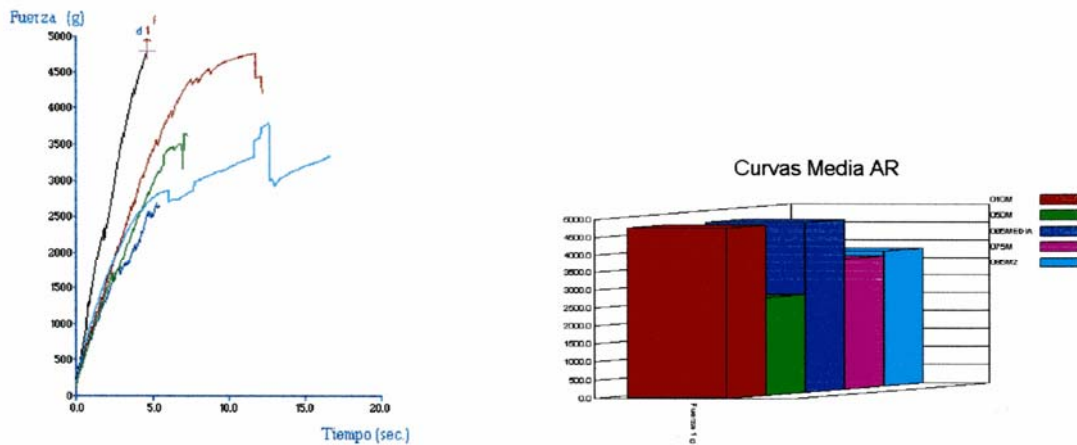


Figura 3.6 A la izquierda: *Curvas medias de las fuerzas aplicadas para romper cada una de las membranas tipo I representadas en la figura 3.5 y a la Derecha:* Diagrama de barras que representa los valores medios de fuerzas de tensión de ruptura que hay que aplicar para romper las distintas membranas que contienen: 0.50g (verde); 0.65g (azul); 0.75g (morada); 0.85g (turquesa) ó 1.00g (marrón) de aceite de ricino (A.R.). (Valores obtenidos de las curvas medias)

Si se representan los valores medios de fuerza de tensión aplicada para romper cada una de las membranas tipo I (Tabla 3.5) frente a la cantidad de aceite de ricino que la compone se obtiene la figura 3.7. Como se puede apreciar, el punto correspondiente a la fuerza que hay que aplicar para romper la membrana que contiene 0,65 g de aceite de ricino es, claramente, aberrante pero el resto de valores describe una recta, lo que nos indica que existe una relación directa entre la cantidad de aceite de ricino que compone la membrana y la fuerza que hay que aplicar para romperla.

 componentes y Ensayos

La ecuación que define esa relación lineal, en cuyo cálculo se ha excluido el valor correspondiente a la membrana de 0,65g de aceite de ricino, es (ecuación 3.6):

$$\text{Fuerza de tensión media aplicada (Kgf)} = 0,6597 + 3,9645 \text{ Aceite de ricino (g)}$$

$$(r = 0,9789) \quad (\text{Ec.3.6})$$

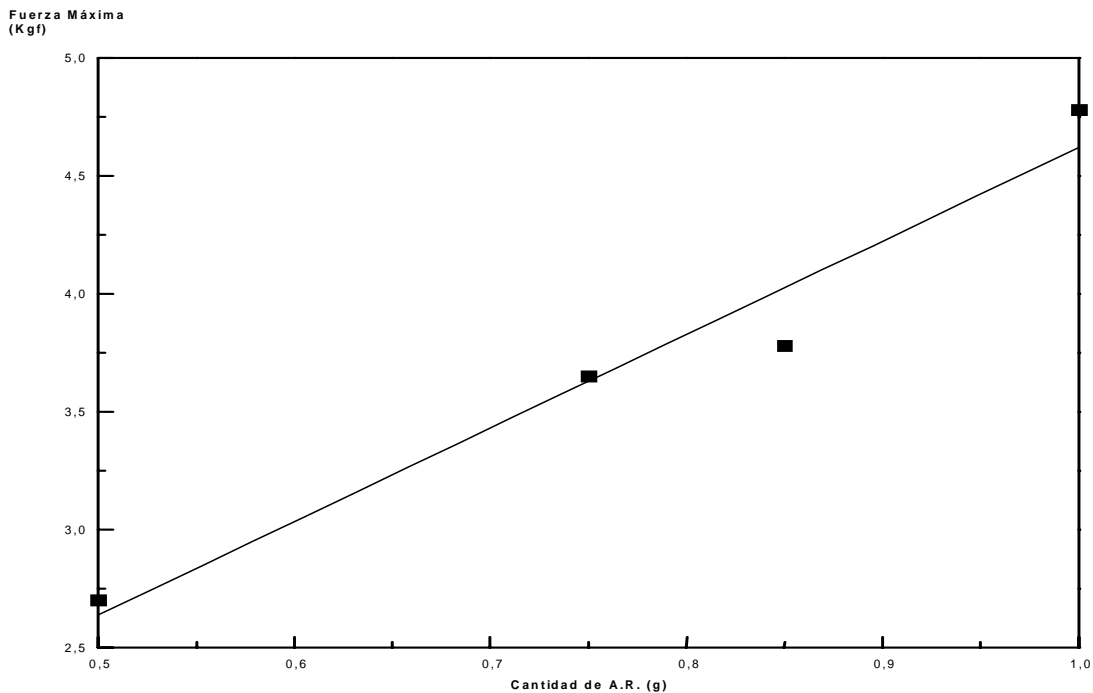


Figura 3.7 Relación entre la fuerza media de tensión aplicada para romper las membranas Tipo I y cantidad de aceite de ricino contenido en ellas

Esa ecuación nos indica que al aumentar la cantidad de plastificante (A.R.) en la membrana, se produce un aumento de elasticidad y una mayor flexibilidad, como ya se ha comentado, por lo que es necesario aplicar fuerzas de tensión cada vez mayores para conseguir la ruptura de las membranas. A la misma conclusión llegan Higa y col. (1999) en sus experimentos con membranas de poli-vinil-1-pirrolidona (PVP): al incrementar la concentración de PVP aumenta la resistencia a la fractura.

En resumen, el aumento de la cantidad de aceite de ricino (plastificante) en la membrana le proporciona a ésta mejores características de manejabilidad. Lo mismo observan Lugão y col. (1999) al utilizar membranas de poli-vinil-pirrolidona (PVP) con poli-etilen-glicol (PEG) como plastificante.

e) Con respecto a la Morfología de las membranas

El estudio morfológico de las membranas se realiza por medio de la observación en el microscopio electrónico de barrido de las muestras preparadas según el protocolo recogido en el apartado 3.1.3e.

Las membranas que se observan al microscopio no presentan poros; la superficie aparece lisa, más o menos homogénea, con una estructura bastante regular semejante a un panal. Todas las membranas, independientemente de la cantidad de aceite de ricino que lleven en su composición, presentan la misma estructura. A modo de ejemplo, la figura 3.8 corresponde a la microfotografía de la membrana que contiene 0,85g de aceite de ricino, obtenida con el microscopio electrónico.

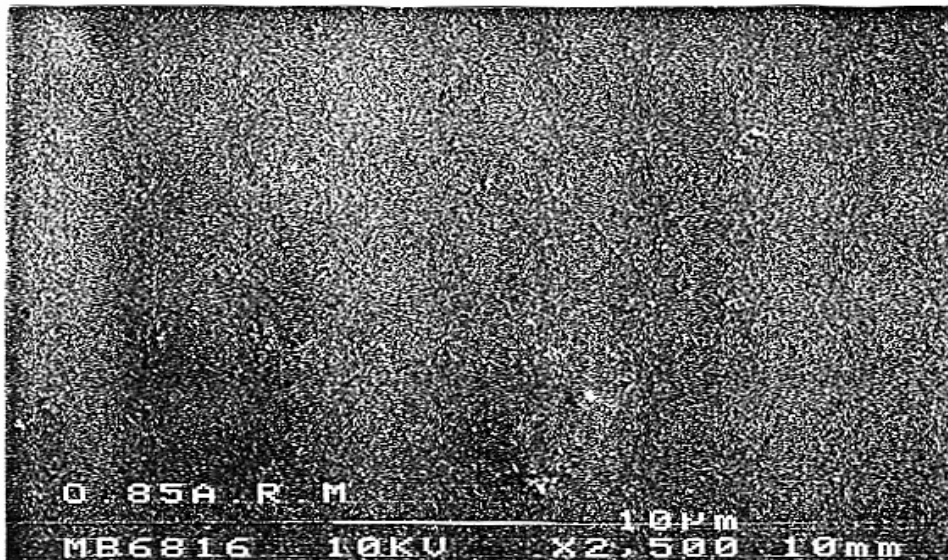


Figura 3.8. Membrana tipo I, con 0,85 g de aceite de ricino, vista por microscopía electrónica de barrido (10 kVx2.500 aumentos)

Es interesante comentar que al intentar observar la estructura de las membranas con más precisión y detalle, a mayor escala (20kVx2.500 aumentos, Figura 3.9; ó 20kVx 6.000 aumentos, Figura 3.10), eso no se puede conseguir porque la membrana bajo ese haz de electrones se desgarra, siendo imposible realizar, correctamente, su observación en esas condiciones experimentales. Además, se ve que las membranas que contienen mayores cantidades de aceite de ricino (0.75, 0.85 ó 1.00g) son las menos frágiles; esas membranas no se rasgan con tanta facilidad, como las que llevan sólo 0,50g de aceite de ricino en su composición. Luego, a mayor cantidad de aceite de ricino, menor fragilidad presenta la membrana, como ya se vio en los ensayos anteriores.

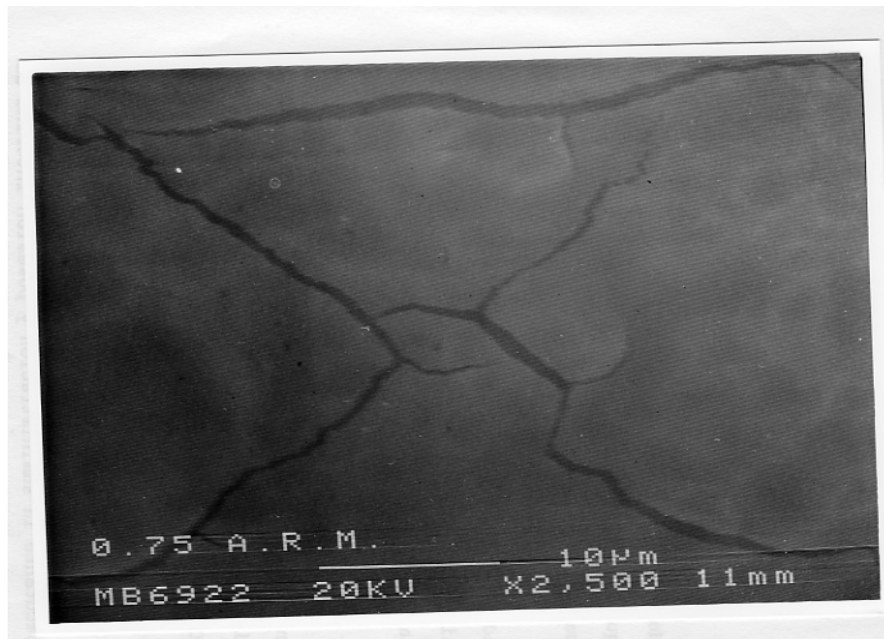


Figura 3.9. Membrana tipo I de 0,75 g de aceite de ricino vista por microscopia electrónica de barrido (20 kVx2.500 aumentos)



Figura 3.10. Membrana tipo I de 0,85 g de aceite de ricino vista por microscopia electrónica de barrido (20 kVx 6.000 aumentos)

También se observan, por microscopia electrónica de barrido, muestras de la zona intermedia de cada una de estas membranas después de sumergirlas, durante 24 horas, en

tampón fosfatos de pH 7.0 y posteriormente secadas al aire; a esas membranas se las denomina membranas humectadas. Estas membranas son más flexibles y manejables que las membranas sin humectar de las que proceden.

Al observar esas **membranas humectadas** por microscopia electrónica de barrido (20kVx2.500 aumentos), se aprecia que tienen una estructura semejante a las membranas sin humectar: presentan superficie lisa y estructura retículo-globular que se puede ver, mucho más claramente, al poder utilizar una mayor resolución microscópica.

En todos los casos ensayados, utilizando idénticas condiciones experimentales, las membranas humectadas presentan menor fragilidad que sus correspondientes membranas sin humectar; incluso la membrana con la mínima cantidad de plastificante (0.50g de aceite de ricino) es más resistente que la membrana sin humectar. Si se observan en condiciones experimentales más adversas (20kV x 2.500 aumentos) (Figura 3.11), lo único que se aprecia son unas pequeñas fisuras en la parte superior de la microfotografía.

Esas fisuras son mucho menores que las que se producen, cuando se observan en las mismas condiciones experimentales, en las membranas sin humectar que llevan mayores cantidades de plastificante (0.75g, 0.85g ó 1.00g de ricino) (ver Figuras 3.9 y 3.10).

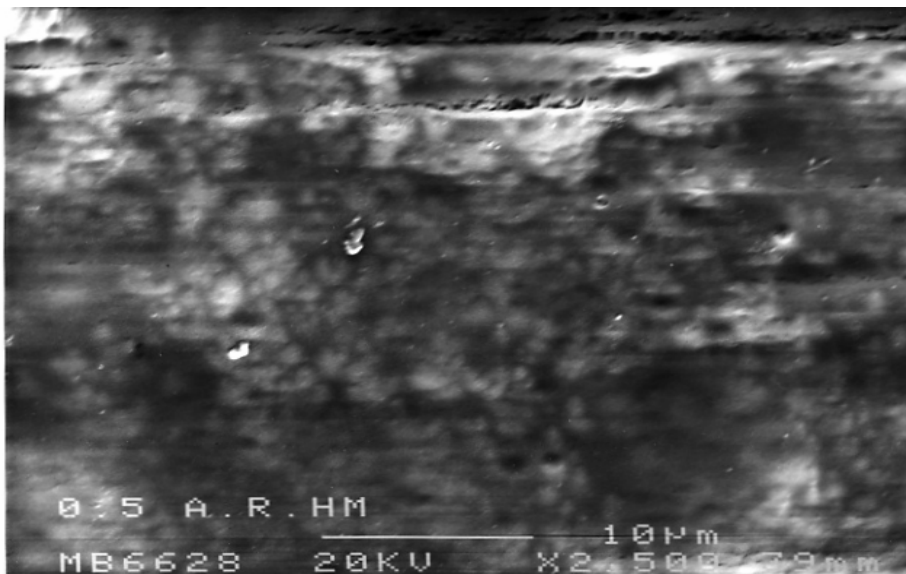


Figura 3.11. Membrana humectada tipo I de 0,50 g de aceite de ricino vista por Microscopia electrónica de barrido(20 kVx2.500 aumentos)

3.3.2. Membranas tipo II

De los resultados obtenidos en los diferentes ensayos realizados con las membranas tipo II, que contienen distintos porcentajes de ácido salicílico, se pueden hacer los siguientes comentarios:

a) Con respecto al Espesor de las membranas.

Las membranas que se obtienen son muy finas. El espesor está comprendido entre, aproximadamente, 48 μm y 58 μm , dependiendo de la cantidad de ácido salicílico (A.S.=0.15%-1.00%) que lleve este tipo de membrana. Al aumentar la cantidad de ácido salicílico en la membrana se produce un aumento proporcional del espesor de ésta. Estas membranas de ácido salicílico son más finas que las de poli-dimetil-siloxano y de Eudragit® NE30D, con un 1% de diazepam, que preparan Schückler y Lee (1993), ya que sus membranas tienen espesores de 50-70 μm .

Si se representan los valores de espesor de las distintas membranas, recogidos en la tabla 3.6, frente al contenido en principio activo que lleva cada una, se obtiene la figura 3.12.

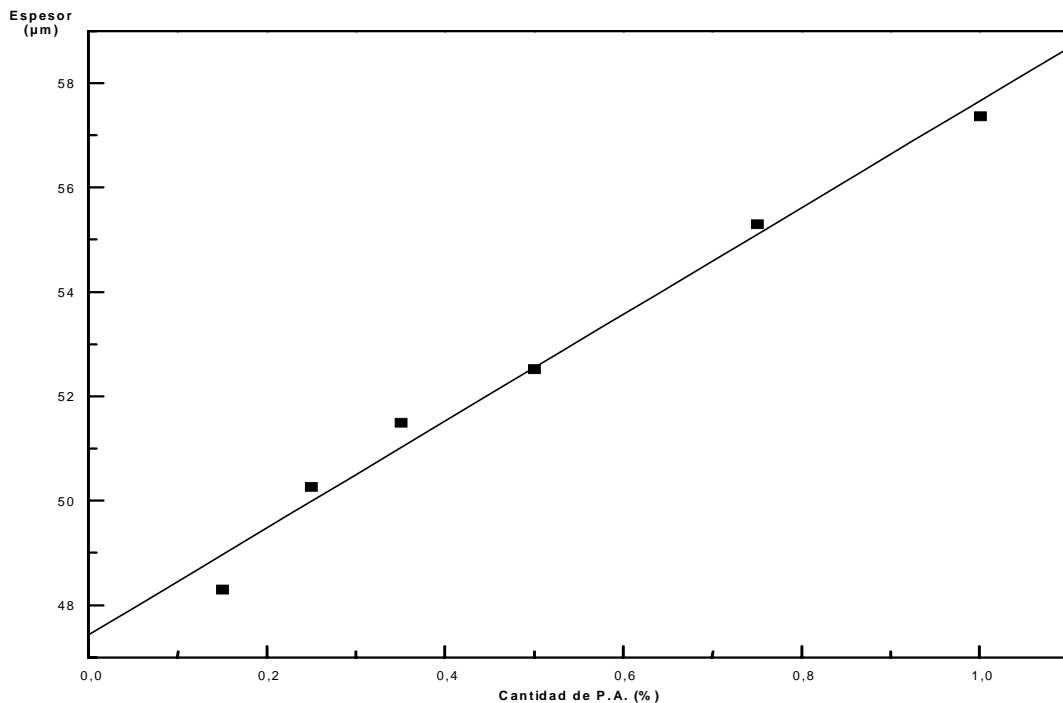


Figura 3.12 Relación entre el espesor de las membranas tipo II y su contenido en ácido salicílico

omponentes y Ensayos

En esa figura se observa que al aumentar la cantidad de principio activo en la membrana se incrementa el espesor de la misma; la relación es lineal ya que el coeficiente de correlación que se obtiene es superior a 0.99. La ecuación que define esa relación es (ecuación 3.7):

$$\text{Espesor } (\mu\text{m}) = 47,4368 + 10,2163 \% \text{ Acido salicílico en membrana } (r=0.9919) \text{ (Ec. 3.7)}$$

b) Con respecto a la Relación Peso/superficie

De los datos obtenidos se puede ver (Tabla 3.7) que, al incrementar la cantidad de ácido salicílico que forma la membrana, se produce un aumento proporcional en la relación peso/superficie. Al hacer la representación gráfica de los valores recogidos en la tabla 3.7, se obtiene la figura 3.13, en donde se representa la relación Peso/superficie en ordenadas y el porcentaje de ácido salicílico que lleva la membrana, en abscisas. Como se observa el trazado es rectilíneo y nos indica que existe una relación lineal entre ambos cuya ecuación (ecuación 3.8) es:

$$\text{Peso/superficie } (\text{mg}/\text{cm}^2) = 6,3523 + 1,9605 \text{ Acido salicílico } (\%) (r=0,9895) \text{ (Ec.3.8)}$$

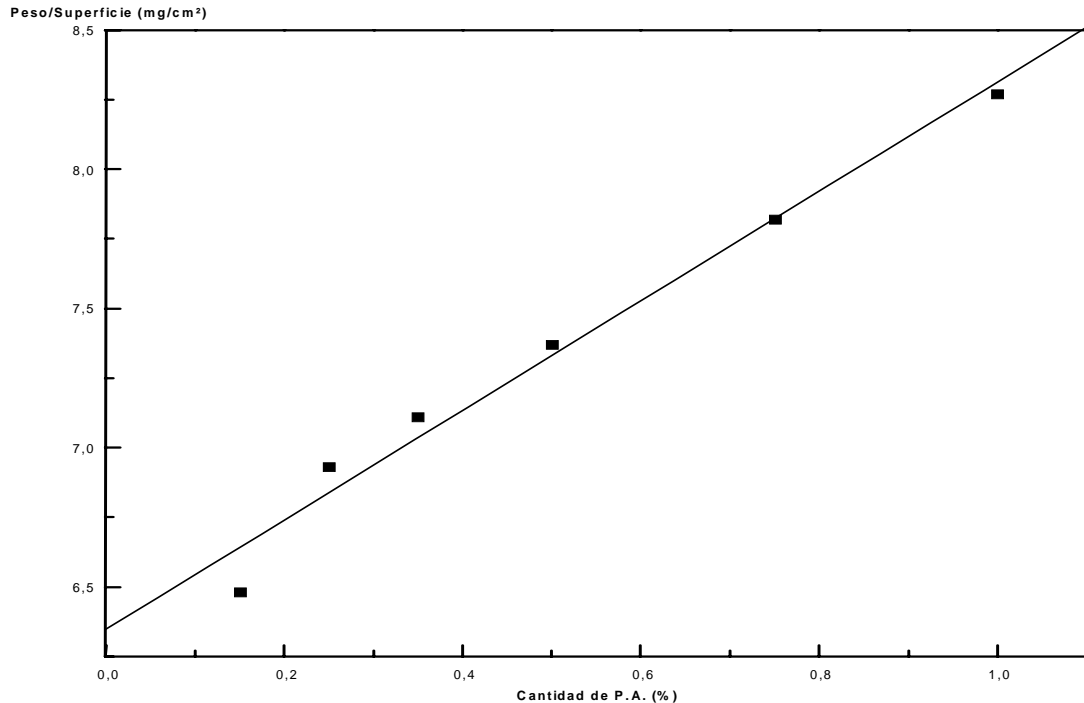


Figura 3.13 Relación entre (peso/superficie) de las membranas tipo II y su contenido en ácido salicílico.

c) Con respecto a la resistencia a la ruptura y fractura

En cuanto a los resultados de la determinación de la resistencia a la fractura de estas membranas, en la figura 3.14 se representan las curvas correspondientes a los valores de fuerza de tensión que hay que aplicar para conseguir romper cada una de las diferentes membranas tipo II que se utilizan en los estudios de cesión de ácido salicílico (capítulo 5). En la parte inferior de cada una de esas gráficas, aparece el valor de fuerza de tensión media necesaria para romper cada una de esas membranas.

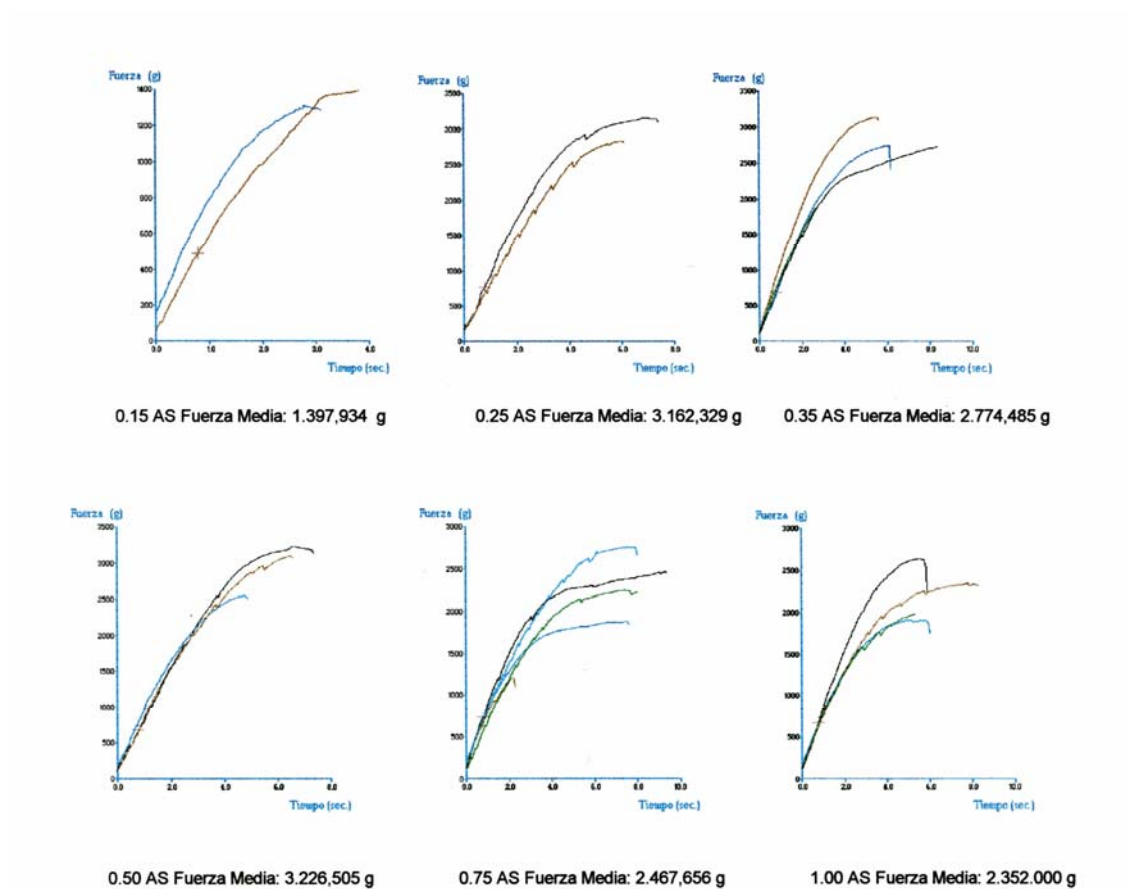


Figura 3.14 Representación gráfica de las fuerzas de tensión aplicadas para romper las distintas membranas Tipo II que contienen: 0.15%, 0.25%, 0.35%, 0.50%, 0.75% ó 1.00% de ácido salicílico

Seabra y De Oliveira (2004) obtienen trazados similares a estos al representar las fuerzas de tensión aplicadas para romper las membranas de polivinilalcohol o, polivinilalcohol con polivinilpirrolidona conteniendo S-nitroso-glutation (GSNO), como principio activo, que son las que utilizan en sus estudios. Sin embargo, la pendiente de sus trazados es mayor, en todos los casos, a los que se obtienen con las membranas tipo II (curvas

Componentes y Ensayos

representadas en la figura 3.14). También son superiores los valores de fuerza de tensión que tienen que aplicar para romper sus membranas si se comparan con los valores obtenidos con las membranas de ácido salicílico (ver Tabla 3.8). En su caso esos valores son: 6,3 MPa para las membranas de PVA/GSNO y 6,9 MPa para las de PVA/PVP/GSNO.

No obstante, aunque las membranas tipo II sean más frágiles que las preparadas por Seabra y De Oliveira, tienen propiedades mecánicas aceptables para su utilización.

Para poder ver, más claramente, si la cantidad de principio activo (ácido salicílico: A.S) influye en la resistencia a la fractura que ofrece la membrana, se realiza la representación de la figura 3.15. En la parte *Izquierda* de esa figura se representan las curvas medias correspondientes a cada membrana de ácido salicílico representada en la figura 3.14 y, en la parte de la *Derecha* se representa, mediante histogramas, la fuerza media de tensión que tiene que ejercer el aparato para romper esas membranas tipo II.

Muestras A.S.

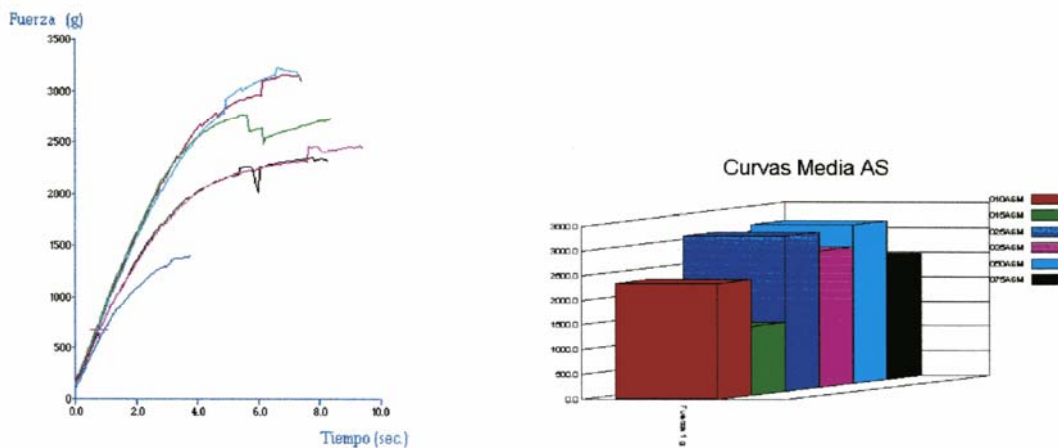


Figura 3.15 A la *izquierda*: *Curvas medias de fuerzas de tensión aplicadas para romper cada una de las membranas tipo II representadas en la figura 3.14* y a la *Derecha*: *Diagrama de barras que representa los valores medios de fuerzas de tensión de ruptura que hay que aplicar para romper las distintas membranas de: 0.15% (verde), 0.25% (azul), 0.35% (morado), 0.50% (turquesa), 0.75% (negro) y 1.00% de ácido salicílico(AS). (Valores obtenidos de las curvas medias)*

 componentes y Ensayos

Al observar el diagrama de barras representado en la parte derecha de la figura 3.15 y la gráfica de la parte izquierda de esa misma figura, parece que existe una relación entre la cantidad de ácido salicílico presente en la membrana y la resistencia que ofrece ésta a su ruptura.

Para dilucidar el tipo de relación que existe entre la cantidad de principio activo que lleva la membrana y la resistencia que opone a su ruptura se representa en la figura 3.16 los valores de ambos parámetros (ver Tabla 3.8).

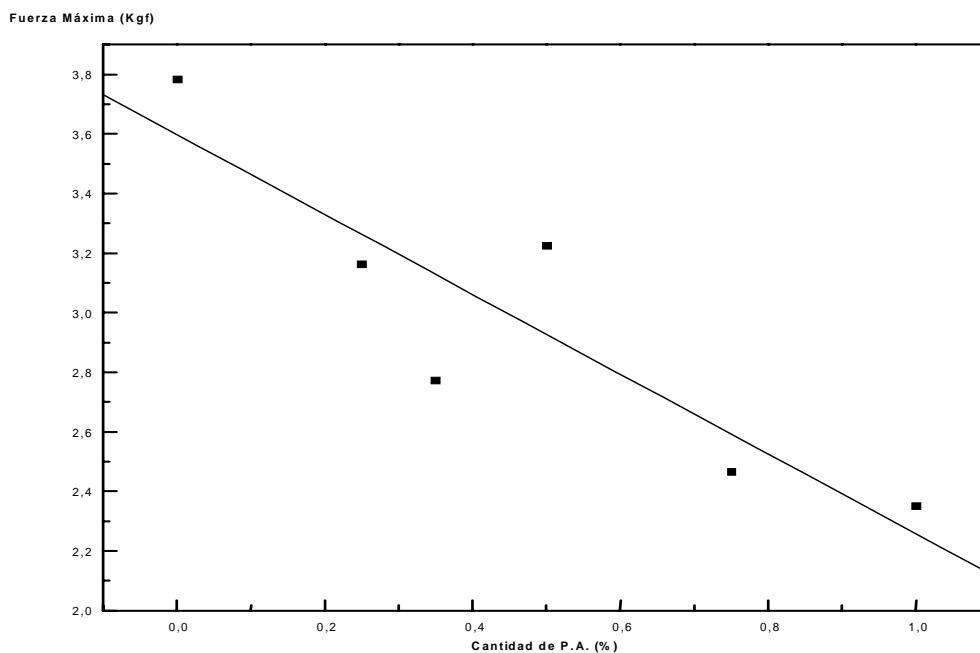


Figura 3.16 Relación entre la fuerza media de tensión aplicada para romper la membrana y cantidad de ácido salicílico que llevan las membranas Tipo II

Al observar la distribución de los puntos de esa figura, se podría pensar que:

- A) describen una parábola cuyo máximo correspondería al punto de coordenadas: $x=0.50\%$ de ácido salicílico, $y= 3.226,505g$ de fuerza de tensión aplicada.
- B) Pero también podría pensarse que el valor de fuerza de tensión que hay que aplicar para romper la membrana de 0.15% de AS ($1,397Kgf$) es aberrante, por ser demasiado bajo y por lo tanto habría que excluirlo. Si se quita ese punto de la gráfica, parece que el resto de valores se ajusta a una recta.

Para dilucidar que trazado de esos dos es el que más se ajusta a la realidad se introduce, para el tratamiento de datos, el valor de fuerza de ruptura correspondiente a la

 componentes y Ensayos

membrana sin principio activo, sin ácido salicílico, que es la membrana tipo I con 0.85g de aceite de ricino de la que se parte para obtener todas las membranas tipo II. El valor de fuerza de tensión necesario para romper esa membrana es 3,784 Kgf. Pues bien, al introducir este valor en el cálculo de la ecuación que describen los puntos representados en la figura 3.16, el resultado es una recta de ecuación (ecuación 3.9):

$$\text{Fuerza de tensión (g)} = 3597,4 - 1339,1 \text{ Acido salicílico (\%)} \quad (r^2 = 0.802) \quad (\text{Ec. 3.9})$$

Aunque el coeficiente de correlación que se obtiene es muy bajo ($r^2 = 0.802$), se puede apreciar que la tendencia de los puntos indica que la fuerza de tensión que hay que aplicar para fracturar la membrana va disminuyendo a medida que aumenta la cantidad de ácido salicílico en la membrana. Es decir, la membrana se hace más frágil al aumentar su contenido en principio activo.

e) Con respecto a la Morfología de las membranas

El último ensayo que se realiza para caracterizar las membranas es observar muestras de las mismas por microscopia electrónica de barrido. Así podemos ver las características de las muestras y la distribución del principio activo en las diferentes membranas tipo II.

En las microfotografías se observa como las membranas tipo II tienen una estructura bastante semejante entre sí. Todas tienen una superficie lisa, homogénea, sin poros, salpicada de puntos blancos brillantes, o incluso cristales, más o menos abundantes dependiendo de la cantidad de ácido salicílico que contenga la membrana.

Así, las membranas con 0,15% de ácido salicílico (A.S.) presenta una serie de puntos blancos, no muy abundantes, dispersos homogéneamente en su superficie (*Figura 3.17*). La misma configuración se observa en las membranas que llevan 0,25%; 0,35% ó 0.50% de AS en su composición (*Figuras 3.18-3.20, respectivamente*): superficie lisa salpicada de puntos blancos que aumentan en número al incrementarse la cantidad de principio activo que contiene la membrana.

Sin embargo, a diferencia de las membranas anteriores, en las que contienen 0,75% de AS ó 1,00% de AS no se ven puntos, sino cristales alargados o prismáticos que, al igual que en el caso anterior, aumentan en cantidad al incrementarse el porcentaje de principio activo que lleva la membrana (*Figuras 3.21 y 3.22*).

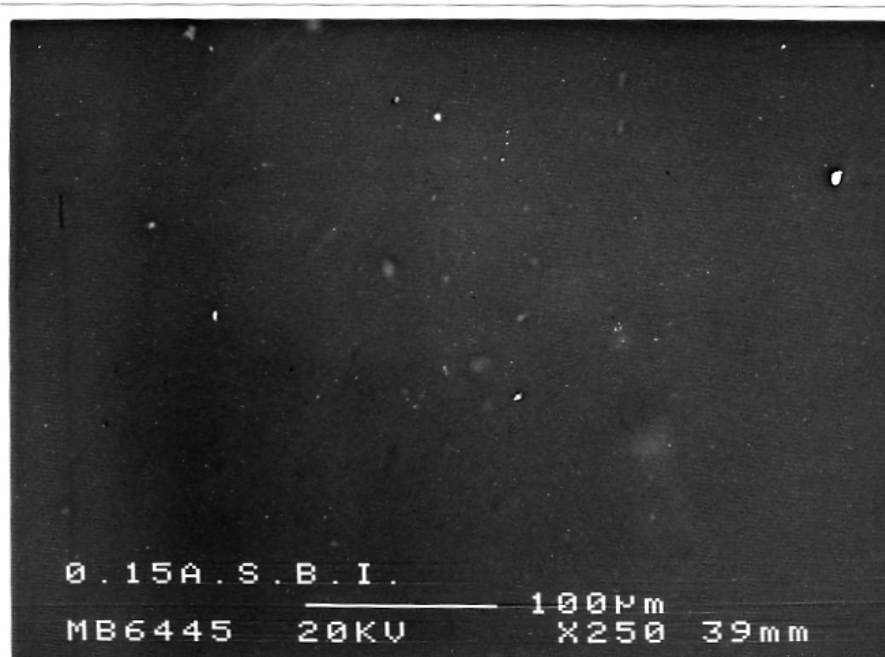


Figura 3.17 Membrana tipo II que contiene 0,15% de ácido salicílico, vista por microscopia electrónica de barrido (20 kVx250 aumentos)



Figura 3.18 Membrana tipo II que contiene 0,25% de ácido salicílico, vista por microscopia electrónica de barrido (20 kVx250 aumentos)

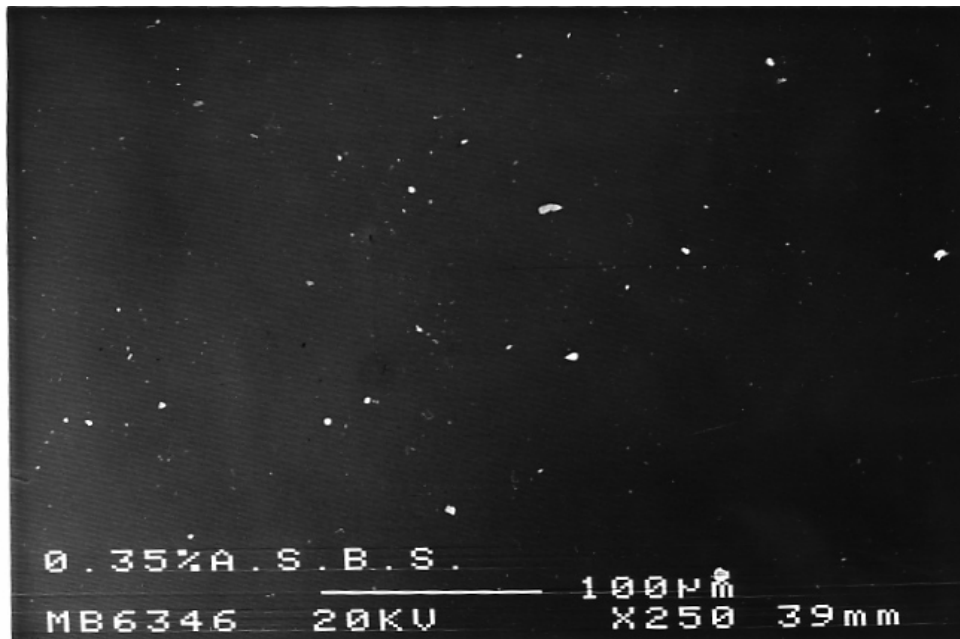


Figura 3.19 Membrana tipo II que contiene 0,35% de ácido salicílico, vista por microscopia electrónica de barrido (20 kVx250 aumentos)



Figura 3.20 Membrana tipo II que contiene 0.50% de ácido salicílico, vista por microscopia electrónica de barrido (20 kVx250 aumentos)



Figura 3.21 Membrana tipo II que contiene 0,75% de ácido salicílico, vista por microscopia electrónica de barrido (20 kVx250 aumentos)



Figura 3.22 Membrana tipo II que contiene 1.00% de ácido salicílico, vista por microscopia electrónica de barrido (20 kVx250 aumentos)

Al intentar observar la estructura de las membranas con más precisión y detalle, a mayor escala (20kVx 6.000 aumentos, Figura 3.23), no se puede conseguir porque la membrana bajo ese haz de electrones, como ocurre con las membranas Tipo I, se

desgarra, por lo que no se pueden observar correctamente en esas condiciones experimentales. Sin embargo, el desgarro que se produce no es tan pronunciado, ni tan rápido, como los que se producen en las membranas tipo I.

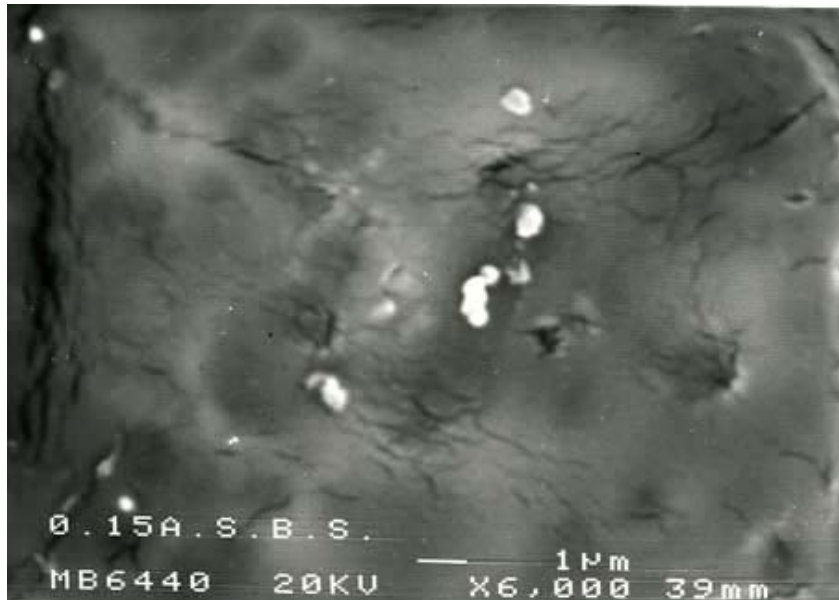


Figura 3.23 Membrana tipo II, que contiene 0,15% de ácido salicílico, vista por microscopia electrónica de barrido (20 kVx6.000 aumentos)

Con las membrana tipo II se realiza, además, otro tipo de observación colocando la membrana en posición vertical, en lugar de horizontal como se hace en el resto de los casos comentados anteriormente; de este modo, se puede ver la sección transversal de la membrana.

Al observar las membranas por microscopia electrónica de barrido, con la membrana situada verticalmente en el soporte, se ve que la estructura interna de estas membranas, en todos los caso e independientemente del contenido en principio activo, es homogénea, densa, fibrosa y bastante regular (Figura 3.24).

Esta estructura parece bastante semejante a la que describen Corti y col. cuando observan por microscopia electrónica membranas de 2-hidroxi-etil-actetato (HEA) que contienen clonazepam como principio activo e isopropilmiristato como agente promotor de la absorción (Corti y col., 1998).



Figura 3.24 Membrana tipo II con 0,25% de ácido salicílico, colocada verticalmente, vista por microscopia electrónica de barrido (5 kV x 1.500 aumentos)

Terminaremos este capítulo comparando los resultados obtenidos con ambas clases de membranas: Tipo I (membranas de colodión + aceite de ricino, como plastificante) y Tipo II (membranas de colodión con 0.85g de aceite de ricino + distintos porcentajes de ácido salicílico como principio activo).

1º) Como es lógico pensar, las membranas tipo II presentan mayor **espesor** que las de tipo I. Esa magnitud es del orden de $10\mu\text{m}$ más, que el espesor de las membranas tipo I

2º) También, como es lógico pensar, es mayor la **relación peso/superficie** de las membranas Tipo II (valores comprendidos entre $6,5\text{-}8,3\text{ mg/cm}^2$) en comparación con las Tipo I, cuyo valor oscila alrededor de $6,2\text{ mg/cm}^2$.

3º) En cuanto a la **resistencia a la fractura** que ofrecen las membranas Tipo II en relación a las membranas Tipo I, en la figura 3.25 se puede observar que las membranas tipo I son más resistentes a la fractura que las tipo II, lo que quiere decir que las membranas tipo I tienen mayor flexibilidad, manejabilidad y mejores características mecánicas que las de tipo II.

Por lo tanto, el ácido salicílico hace que las membranas tipo II sean más frágiles que las de tipo I. Sin embargo, ello no es óbice para que las membranas tipo II no

omponentes y Ensayos

presenten características mecánicas adecuadas para poder ser utilizadas como dispositivos de liberación controlada de ácido salicílico.

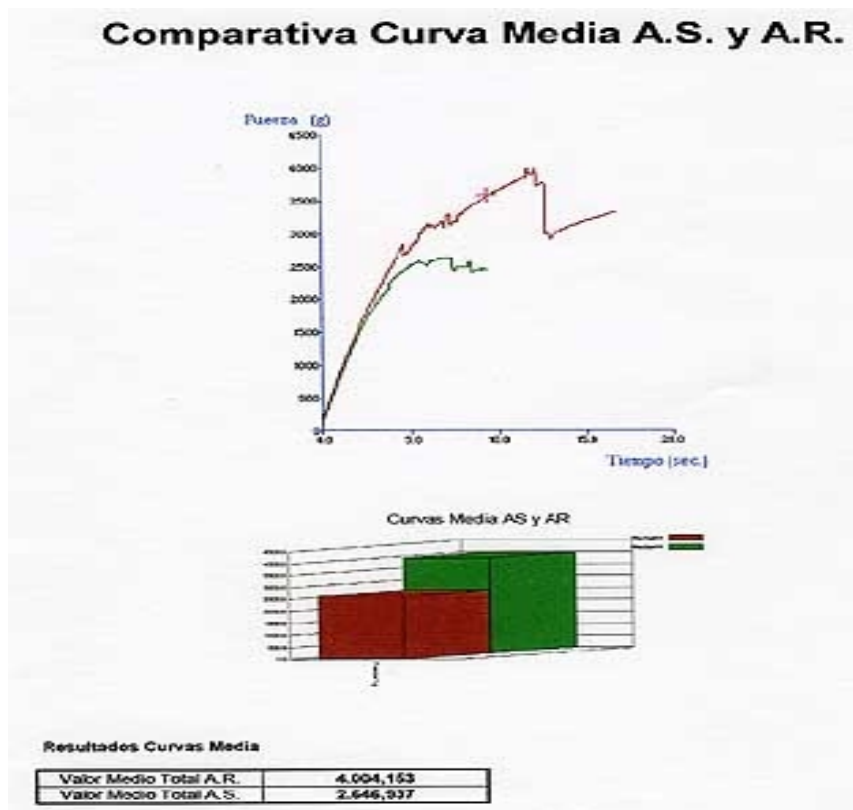


Figura 3.25 En la gráfica de la parte superior aparecen representadas las curvas correspondientes a la media de los valores medios de fuerzas de ruptura ejercida para romper las membranas tipo I, de aceite de ricino (AR) (marrón) y tipo II de ácido salicílico (AS) (verde). En la parte intermedia aparece el Diagrama de barras que representa la media de los Valores medios de fuerzas de tensión que hay que aplicar para romper cada una de las cinco clases de membranas Tipo I (AR) (en verde) y las seis clases diferentes de membranas tipo II (AS) (en marrón). En la parte inferior se recoge la Tabla de los resultados obtenidos con ambos tipos de membranas.

Capítulo 4 ESTUDIOS DE CESIÓN *“In Vitro”* A TRAVÉS DE MEMBRANAS TIPO I

Con el fin de estudiar la cesión de una sustancia activa incorporada a una forma semisólida de uso tópico (emulsión O/A) en función del tipo de membrana que se utilice, se realiza el estudio de la difusión del ácido salicílico (A.S.) a través de distintos tipos de membranas. Para valorar cuantitativamente la cantidad de ácido salicílico cedida, empleamos el método de diálisis. El principio activo difunde a una fase acuosa físicamente separada de la emulsión por la membrana [1].

Las membranas que estudiaremos en este capítulo (TIPO I) son lipídicas, compuestas, no porosas, constituidas por colodión (soporte mecánico inerte), cuya función es mantener la integridad de la membrana y aceite de ricino, lípido fuertemente hidrófobo que actúa como plastificante.

 Membranas Tipo I

El transporte de principios activos a través de esas membranas dependerá de la difusión de la molécula en la superficie de la membrana, su adsorción y solubilidad en los constituyentes de la misma [5]. La elección de la membrana es importante, pues según su naturaleza el fenómeno estudiado puede ser diferente [6].

Para estos estudios se utiliza como fase dadora, una cierta cantidad de emulsión tipo cuyos componentes están descritos en el capítulo 1 de esta parte experimental y cuya elaboración se describe a continuación:

4.1.Método de elaboración de la Emulsión O/A (Fase Dadora)

La formulación tipo utilizada en los ensayos de transferencia de ácido salicílico a través de las membranas tipo I, es una preparación semisólida bifásica (Emulsión O/A), ya que el ácido salicílico se cede más rápidamente desde emulsiones de este tipo (*Whitworth, 1968; Nakano y Patel, 1970*).

La emulsión está compuesta por:

	* Vaselina.....	40
g.		
	* Labrafil M-2130-CS ®.....	10
g.		
	* Tween 80 ®.....	5
g.		
	* Agua destilada c.s.p.....	100
g.		
	* Acido salicílico.....	
1%.		

Se elabora de la forma siguiente (*Rodríguez Bayón, 1989*):

- 1) Se funde la fase oleosa (compuesta por vaselina y labrafil

Membranas Tipo I

M-2130-CS), a baño maría, a temperatura inferior a 70 ° C.

2) Se adiciona y dispersa el ácido salicílico en la fase anterior (1).

3) Se calienta la fase acuosa (formada por Tween 80 disuelto en agua destilada), sin que la temperatura supere los 70°.

4) Se añade la fase acuosa (3) (fase continua o externa), sobre la fase oleosa (1)

(fase discontinua o interna), cuando ambas están a igual temperatura (65-70°C).

5) Se interponen ambas fases, con agitación constante, hasta total enfriamiento.

Una vez obtenida la emulsión, se envasa en frascos de vidrio, bien tapados.

Con la fase dadora así preparada y las membranas tipo I obtenidas, se realizan los estudios de transferencia del ácido salicílico (AS) que es el principio activo que se utiliza como sustancia trazadora en este trabajo.

A continuación se describe como se lleva a cabo el ensayo.

4.2. Ensayos de cesión a través de membranas TIPO I

Para llevar a cabo los ensayos de cesión del AS a través de las membranas tipo I se utiliza el dispositivo que se describe a continuación.

4.2.1.- Dispositivo para realizar el ensayo de cesión.

El dispositivo empleado en estas experiencias y representado en la *figura 4.1.* es un sistema de dos compartimentos constituido por:

a) La fase RECEPTORA, contenida en un cristizador de vidrio. Está constituida por 300 ml. de solución tampón de

Membranas Tipo I

fosfato de pH 7,0. El cristalizador con el medio de difusión, se encuentra sumergido en un baño termostatzado a una temperatura constante de 37 ± 0.1 ° C [23].

b) La fase DADORA, 2.7g de emulsión tipo, con un 1% de ácido salicílico, se deposita en la célula de diálisis, que está formada por la tapa de una placa petri de 58,77 cm² de superficie, en la que se acopla un dispositivo especial, al objeto de obtener una superficie homogénea de emulsión, de 0,5 mm. de espesor.

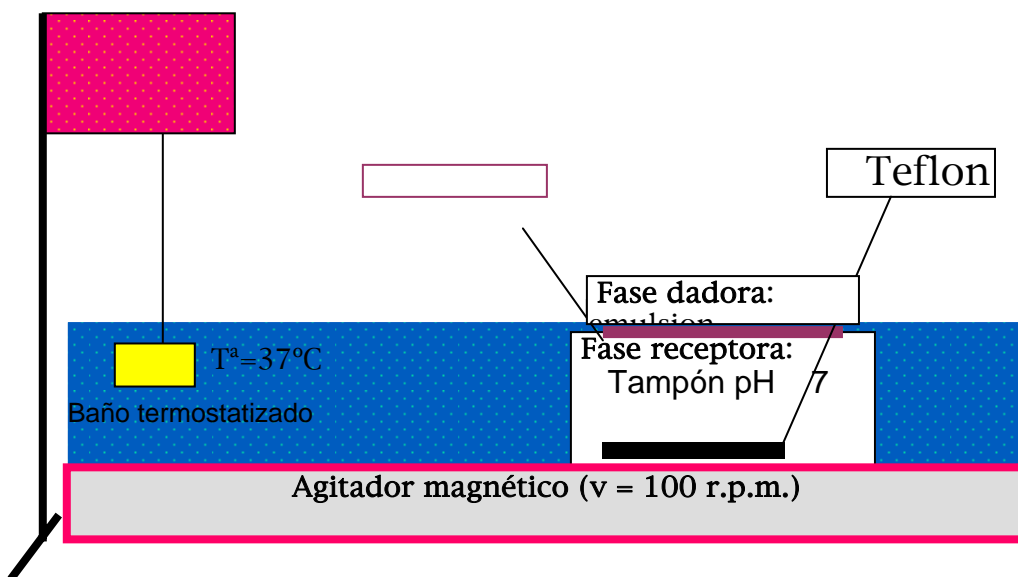


Figura 4.1. Dispositivo para realizar los ensayos de cesión “in vitro” utilizando como célula de difusión una Placa

El elemento que separa ambas fases y a través del cual se realiza la transferencia del componente activo, es la membrana. En todos los casos, se utilizan membranas tipo I, con distintas cantidades de aceite de ricino y en distintas condiciones de humectación, como comentaremos más adelante.

La membrana debe estar colocada lo más tensa posible, sin que presente arrugas (lo que modificaría la superficie de cesión), y se ajusta a la placa mediante gomas elásticas. El sistema formado

por placa y membrana se coloca, invertido, sobre la superficie del líquido receptor procurando que los bordes de la membrana tapen a éste para evitar su evaporación.

Con el fin de mantener homogeneizada la fase receptora se introduce en la misma una barra magnética recubierta de teflón, la cual gira, con ayuda de un agitador magnético, a una velocidad constante y controlada de 100 r.p.m.

La elección de esta velocidad está motivada por el hecho de que la agitación debe ser relativamente intensa para evitar la saturación de la capa de difusión en contacto con la membrana, pero no demasiado violenta para evitar turbulencias que podrían perturbar el fenómeno de diálisis a nivel de la interfaz [5].

4.2.2.- Condiciones experimentales

En todas las experiencias, se mantienen constantes una serie de parámetros que son los que aparecen recogidos en la tabla 4.1 y que se comentan a continuación.

a) La superficie de cesión, porque se usa siempre la misma célula de difusión.

La misma placa.

b) El volumen de muestra de líquido receptor (1ml), que se toma a los diferentes tiempos de ensayo, no se repone. Al final del experimento se mide el volumen residual de fase receptora [25] y se tiene en cuenta al realizar los cálculos.

c) El tiempo de experimentación se empieza a contar en el momento que se pone en contacto el sistema formado por placa y membrana, con el líquido receptor.

d) La duración del ensayo es de 6 horas, aunque hay autores que emplean desde 2 horas [2,26,27] hasta 16 horas [28].

Membranas Tipo I

e) Los intervalos de toma de muestra, han sido en todas las experiencias los mismos, y se eligen en función de la evolución del proceso de cesión [29]:

Tabla 4.1.- Factores que se han mantenido constantes en todas las experiencias

<i>FACTOR</i>	<i>VALOR</i>
<i>-Temperatura Fase receptora.</i>	37 °C
<i>-Volumen Fase receptora.</i>	300 ml
<i>*Composición.</i>	Solución Tampón Fosfato pH 7.0
<i>*Velocidad de agitación.</i>	100 r.p.m.
<i>-Volumen muestra</i>	1 ml
<i>-Dilución muestra</i>	1/5
<i>-Peso Fase dadora (Emulsión)</i>	2,7 g.
<i>-Concentración A.S. en fase dadora</i>	1,0%
<i>-Duración de la experiencia.</i>	360 minutos

Los intervalos de toma de muestra, han sido en todas las experiencias los mismos, y se eligen en función de la evolución del proceso de cesión [29]: cortos en el inicio del ensayo (cada dos minutos durante los 20 minutos iniciales del ensayo) por ser éste en el que la velocidad de difusión es mayor; y más espaciados (cada 10 minutos en el período de tiempo comprendido entre los 20 y los 60 minutos).

Después de la primera hora de ensayo hasta el final del mismo (6 horas en total), las muestras se toman cada 30 minutos, ya que la cesión en este período se atenúa, se hace más lenta. En total se toman 24 muestras a lo largo del ensayo con lo que obtenemos los datos suficientes para definir adecuadamente los tramos que componen la curva de cesión del principio activo.

4.2..3.- Técnica analítica

Para determinar analíticamente la concentración de ácido salicílico presente en las muestras, representativa de la que existe en fase receptora, se recurre a la técnica de espectrofotometría. Se leen las muestras de ácido salicílico disuelto en tampón fosfato pH 7,0 a una longitud de onda de 296 nm que es donde tiene el máximo de absorción el AS [23] (ver *figura 2.1*).

Interpolando los datos de absorbancia (D.O.) en la curva de calibración obtenida y validada (ver capítulo 2) se calcula la concentración de ácido salicílico que existe en cada muestra.

Una vez descrito el ensayo de cesión, a continuación se estudia la posible influencia que puede tener, en la transferencia del AS a través de membranas tipo I, la modificación de:

- a) Las condiciones en que se encuentre la membrana a través de la cual se cede el AS y
- a) La célula de diálisis que se emplea en los ensayos de cesión.

4.3. Influencia de las condiciones en que se encuentra la membrana

Con objeto de estudiar la posible influencia que pueda tener, en el proceso de transferencia del AS, la *modificación de las condiciones* en que se encuentre la membrana tipo I se realiza el estudio de la cesión del AS utilizando como *variable la humectación* que pueda sufrir la membrana.

Por ello, a continuación se realizan los ensayos con:

4.3.1.- las membranas tipo I sin humectar (MSH)

4.3.2.- las membranas tipo I humectadas:

a) Con agua destilada (MH)

b) Con la propia formulación (MC)

A continuación se describen las características de cada una de estas membranas, que denominamos: MSH, M H y MC.

4.3.1. - Membranas sin humectar (MSH)

Las membranas que denominamos MSH son las membranas de aceite de ricino que se utilizan nada más retirarlas del soporte de mercurio y que, por tanto, no sufren ninguna modificación en sus condiciones de humedad.

Las condiciones experimentales que se emplean en la realización de los ensayos de cesión de AS a través de las membranas MSH que contienen 0.65g, 0.75g ó 0.85g de aceite de ricino, se acaban de comentar en el epígrafe 4.2.2. de esta memoria.

4.3.2.- Membranas humectadas

Las membranas tipo I que contienen 0,75g o 0,85g de aceite de ricino una vez retiradas del soporte de mercurio se pueden:

a) colocar en un recipiente adecuado y dejarlas inmersas en *agua destilada* durante doce horas. A esas membranas las denominamos como (MH). O bien,

b) se pueden poner *en contacto con la formulación*, emulsión O/A, que constituye la fase dadora en los ensayos de cesión (MC), durante un período de tiempo que puede ser: doce horas, como en el caso anterior, o más largo (72 horas) transcurren antes de que se sitúe sobre la fase receptora y comience el ensayo de cesión, propiamente dicho.

Luego, cuando se utilizan membranas humectadas, esa humectación puede provenir del agua destilada en la que se sumerge la membrana antes de ser ensayada o bien, el agua de la fase externa de la emulsión O/A que es la formulación que se emplea como fase dadora en el ensayo.

En ambas circunstancias la membrana va a sufrir una modificación que puede influir en la transferencia del AS cuando se utilice en los ensayos de cesión. Todos los ensayos de cesión se realizan como se describe en el apartado 4.2.2. de esta memoria.

Por tanto, en todos los ensayos de cesión del AS a través de membranas tipo I, realizados hasta este momento, se utiliza como célula de difusión, exclusivamente, la tapa de una PLACA petri, que presenta una gran superficie de cesión ($S= 58,77 \text{ cm}^2$).

Pero ya hemos comentado anteriormente, que otra de las posibles variables que pueden influir en el proceso de cesión del AS a través de las distintas membranas tipo I es la celda de difusión que se utilice en los ensayos, más que nada, por la diferencia en la magnitud de superficie de cesión que ofrecen unas y otras. Por ello, a continuación se estudia la posible influencia de la *superficie* en la cesión del principio activo a través de la membrana utilizando como células de difusión :

- a) PLACAS (Superficie de cesión $=58,77 \text{ cm}^2$).
- b) CELDAS de FRANZ modificadas (Superficie de cesión $=1,77 \text{ cm}^2$).

- **Influencia de la célula de diálisis que se emplea en los ensayos de cesión.**

A continuación se estudia la posible influencia de la célula de diálisis, de su superficie, en la cesión del principio activo a través

Membranas Tipo I

de las distintas membranas tipo I ensayadas nada más ser retiradas del soporte de mercurio, sin sufrir ninguna manipulación posterior. Es decir, según lo expuesto en el apartado 4.3, serían membranas de 0.65g, 0.75g ó 0.85g de aceite de ricino, sin modificar.

4.4.1.- Célula de difusión: PLACA

Se utiliza como soporte de la fase dadora, emulsión O/A, la tapa de una placa Petri.

El dispositivo para realizar estos ensayos, y su descripción están recogidos en el apartado 4.2.1.

4.4.2.- Celda de difusión: CELDAS de FRANZ MODIFICADAS

Una vez finalizados los estudios empleando la PLACA como célula de difusión, se comienzan los estudios de difusión del AS a través de las distintas membranas tipo I, utilizando como célula de difusión, celdas de Franz modificadas. El dispositivo que se utiliza en este caso es algo diferente al descrito en el apartado 4.2.1, por ello se comenta a continuación:

a) Dispositivo para realizar el ensayo de cesión utilizando Celdas de Franz

El dispositivo empleado en estas experiencias está representado en la *figura 4.2*

Como en el caso anterior, es un sistema de dos compartimentos constituidos por:

- a) La fase RECEPTORA, contenida en la celda está constituida por 54 ml. de solución tampón de fosfato de pH 7,0. La celda con el medio de difusión, se encuentra sumergido en un baño, termostatzado, a una temperatura constante y controlada de 37 ± 0.1 ° C .
- b) La fase DADORA, está constituida por 200 mg. de emulsión tipo, con un 1% de ácido salicílico. Esta

celda tiene una superficie de cesión de $1,77 \text{ cm}^2$.

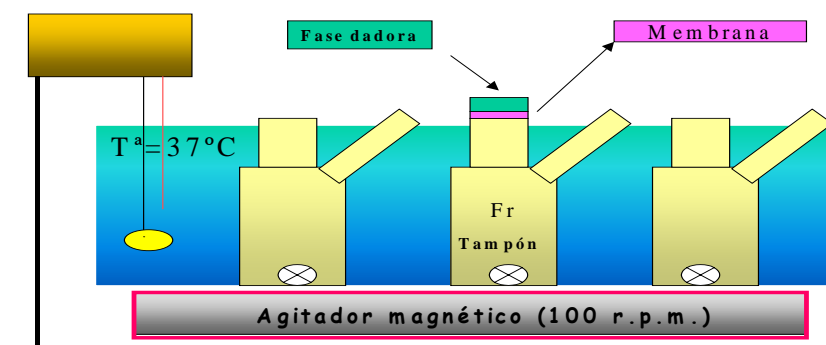


Figura 4.2. Dispositivo para realizar los ensayos de cesión “in vitro” utilizando Celdas de Franz modificadas

b) Condiciones experimentales

En todas los ensayos realizados con las membranas tipo I montadas en las celdas tipo Franz modificadas se han mantenido constantes una serie de condiciones que aparecen reunidas en la tabla 4.2.

- a) El elemento que separa ambas fases y a través del cual se realiza la transferencia del componente activo, es la membrana Tipo I que se coloca, lo más tensa posible sin que presente arrugas, sobre la parte superior de la celda a la que se ajusta mediante parafilm y un anillo de teflón.
- b) Con el fin de mantener homogeneizada la fase receptora, a medida que se va enriqueciendo en principio activo, se introduce en ella una barra magnética en forma de estrella recubierta de teflón,

Membranas Tipo I

la cual gira, con ayuda de un agitador magnético, a una velocidad constante y controlada de 100 r.p.m..

- c) El volumen de las muestras de líquido receptor (1 ml.), que se toman a los diferentes tiempos de ensayo, se repone con el mismo volumen de solución fresca de tampón fosfatos de pH 7,0.

Tabla 4.2.- Factores que se han mantenido constantes en todas las experiencias realizadas con membranas tipo I montadas en celdas de Franz modificadas

<i>FACTOR</i>	<i>VALOR</i>
<i>-Temperatura Fase receptora.</i>	37 °C
<i>-Volumen Fase receptora.</i>	54 ml
<i>*Composición.</i>	Solución Tampón Fosfato pH 7.0
<i>*Velocidad de agitación.</i>	100 r.p.m.
<i>-Volumen muestra</i>	1 ml
<i>-Dilución muestra</i>	1/5
<i>-Peso Fase dadora (Emulsión)</i>	200 mg.
<i>-Concentración A.S. en fase dadora</i>	1,0%
<i>-Duración de la experiencia.</i>	360 minutos

c) Técnica Analítica

La técnica analítica empleada para determinar la cantidad de AS que ha atravesado la membrana y la forma de calcularla es idéntica a la que se expuso anteriormente (4.2.3).

Aquí lo que hay que tener en cuenta es el volumen de líquido receptor que se va extrayendo con cada muestra, porque se repone con nuevo volumen, por lo que éste se mantiene constante a lo largo de todo el tiempo de experimentación (360 minutos).

Una vez realizados los ensayos, según las distintas condiciones y circunstancias comentadas, los resultados obtenidos se exponen a continuación.

4.5. RESULTADOS

Los ensayos se realizan, al menos, por triplicado y los resultados obtenidos se agrupan en tablas en las que aparecen, en las distintas columnas:

- Tiempo de toma de muestra expresado en minutos. Desde 2 a 360 minutos.
- Cantidad de ácido salicílico que atraviesa la membrana y pasa a la fase receptora, expresada como Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
- Valor medio y desviación estándar de esos valores de Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

4.5.1.- Resultados obtenidos en los ensayos descritos en el apartado 4.3

(Influencia de las condiciones en que se encuentra la membrana)

a) Membranas sin humectar (MSH): Tablas 4.3-4.5. *Figuras 4.3-4.5*

b) Membranas humectadas:

A) con agua destilada durante 12 horas (MH):
Tablas 4.6-4.7. *Figuras 4.6-4.7.*

A) B) en contacto con la formulación (MC)
durante 12 horas:

B) Tablas 4.8-4.9. *Figuras 4.8-4.9*

C) C) en contacto con la formulación (MC)
durante 72 horas:

Tablas 4.10-4.11. *Figuras 4.10-4.11*

4.5.2. Resultados obtenidos en los ensayos descritos en el apartado 4.4

(Influencia de la célula de diálisis que se emplea en los ensayos de cesión)

a) Membranas tipo I ensayadas en Célula de diálisis: Placa.
Tablas 4.3-4.5.
Figuras 4.3-4.5

b) Membranas tipo I ensayadas en Celdas de Franz modificadas:
Tablas 4.12-4.15. *Figuras 4.12-4.15*

4.5.3. Tratamiento de datos

Aunque son muchos los esfuerzos, todavía no existe un método oficial que permita evaluar “in vitro” la cesión de fármacos desde formas farmacéuticas de administración cutánea.

Generalmente, para realizar los ensayos de liberación del fármaco a partir de esas formas farmacéuticas, según aparece recogido en múltiples referencias bibliográficas lo que se utilizan son celdas de difusión, de distintas características en las que se ensayan las membranas de distinta naturaleza, por lo que los resultados que se obtienen son muy variables (*Kubota y Maibach, 1994; Wellin-Berger y col., 2001*).

Ante esta circunstancias lo que se hace es realizar el tratamiento de datos experimentales aplicando el análisis estadístico a los mismos. Se utiliza el factor de similitud, f_2 , como análisis de comparación estadística de los perfiles de liberación “in vitro” que se obtienen al ensayar las distintas membranas. Este factor, recomendado por la FDA, se emplea normalmente en la industria farmacéutica para comparar perfiles de disolución (*Shah*

y col., 1995 y 1998), pero sin embargo ya hay autores que lo utilizan también para comparar perfiles de liberación en formas de administración tópica (*García Andréu y Lucero Muñoz, 2003*).

La utilidad de f_2 se centra en la comparación estadística de los perfiles de liberación de p.a. obtenidos en dos células en que se han realizado, bajo las mismas condiciones experimentales, esos ensayos.

Desde un punto de vista teórico f_2 es una medida de la similitud en el porcentaje de liberación existente entre dos curvas, de tal forma que cuando los dos perfiles son idénticos el valor de $f_2 = 100$, mientras que si es totalmente diferente ese valor tendería a cero. Por ello, valores altos indican similitud entre perfiles de liberación, y valores bajos, discrepancias. Sin embargo, si se obtienen diferencias de valores experimentales entre celdas no superiores al 10% de variación, para todos los tiempos de ensayo, se acepta que el perfil es semejante (*Shah y col, 1998*).

Por lo tanto, para un test de perfiles de liberación se considera que son similares si el valor de f_2 es mayor de 50. Por tanto, se desecharán los valores correspondientes a la celda que no cumpla este criterio.

Además de realizar este análisis estadístico, también con los resultados obtenidos, se realiza el análisis estadístico ANOVA y t-Student, cuando es preciso.

Los resultados obtenidos, para cada condición ensayada, se representan en gráficas. En el eje de ordenadas se representan las cantidades acumuladas de fármaco cedido en las distintas

Membranas Tipo I

condiciones de ensayo, expresadas como cantidades de ácido salicílico Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y, en abscisas, los tiempos de toma de muestra expresados en minutos.

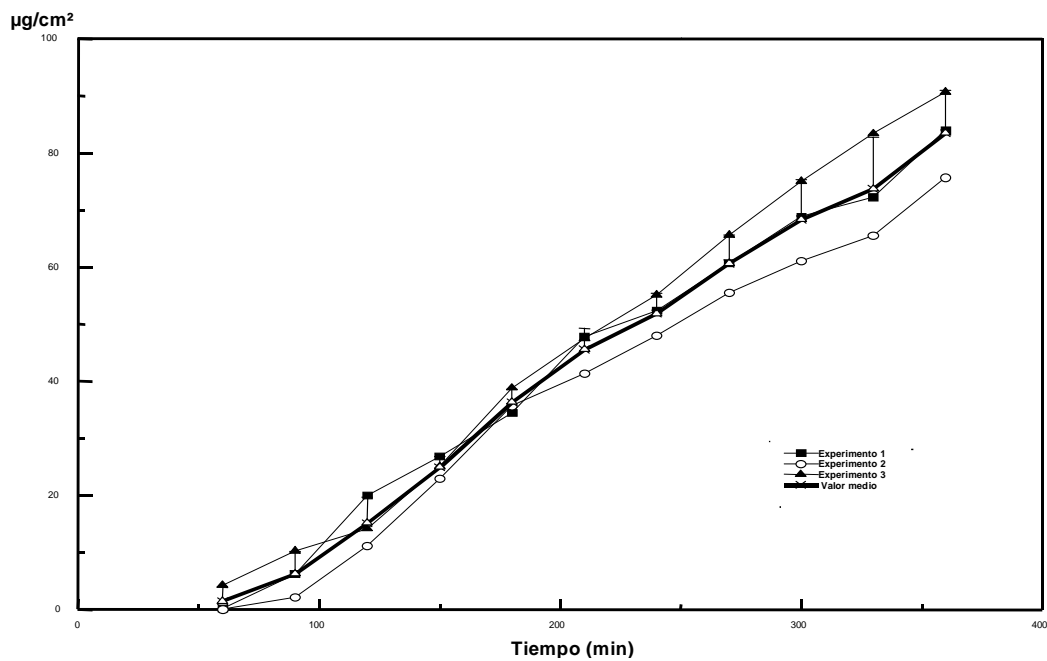
Tabla 4.3.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I sin humectar conteniendo 0.65g de Aceite de Ricino (AR).

<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 1</i>	<i>Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 2</i>	<i>Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 3</i>	<i>Media \pm DE</i>
2	-	-	-	-
4	-	-	-	-
6	-	-	-	-
8	-	-	-	-
10	-	-	-	-
12	-	-	-	-
14	-	-	-	-
16	-	-	-	-
18	-	-	-	-
20	-	-	-	-
30	-	-	-	-
40	-	-	-	-
50	-	-	-	-
60	0,196	0,000	4,224	1,47 \pm 2,38
90	6,178	2,197	10,220	6,20 \pm 4,01
120	20,013	11,147	14,167	15,11 \pm 4,51
150	26,782	22,979	25,034	24,93 \pm 1,90
180	34,443	35,677	38,772	36,30 \pm 2,23
210	47,840	41,380	47,462	45,56 \pm 3,63
240	52,368	47,999	55,093	51,82 \pm 3,58
270	60,674	55,519	65,581	60,59 \pm 5,03
300	68,870	61,027	75,001	68,30 \pm 7,00
330	72,215	65,515	83,365	73,70 \pm 9,02
360	83,986	75,687	90,687	83,45 \pm 7,51

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo I

Figura 4.3 Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo I sin humectar conteniendo 0.65g de Aceite de Ricino (AR).



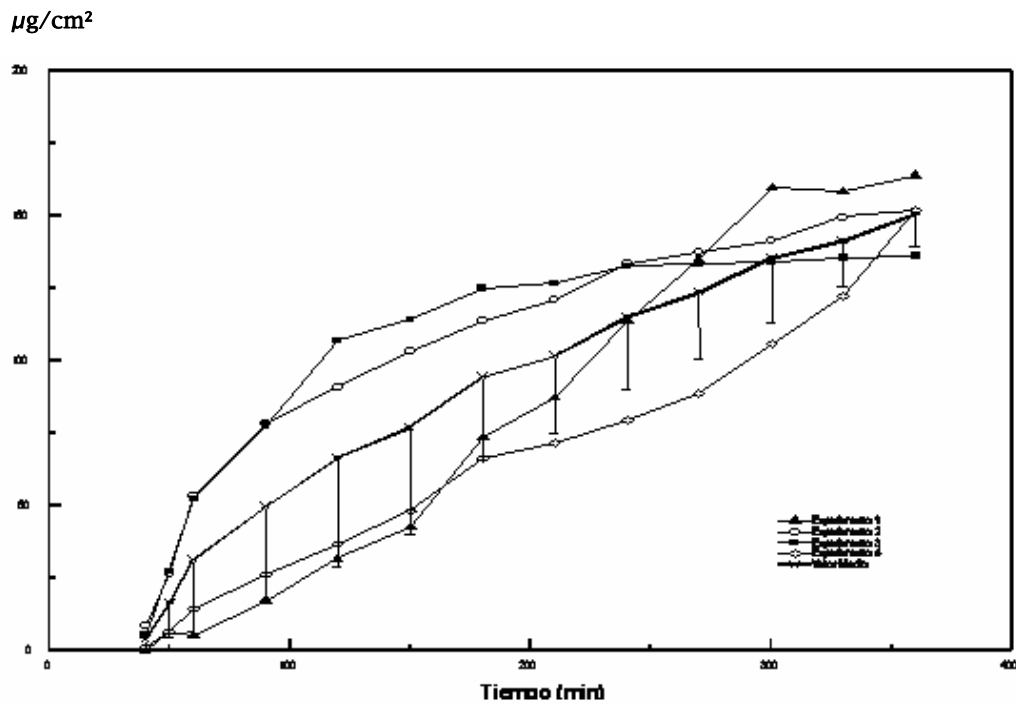
Membranas Tipo I

Tabla 4.4.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I sin humectar conteniendo 0.75g de Aceite de Ricino (AR).

<i>Tiempo</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Media ± DE</i>
<i>(minutos)</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	
2	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
40	0,000	8,311	5,252	1,208	3,69 ± 3,81
50	6,237	26,462	27,365	6,234	16,57 ± 11,94
60	5,206	53,528	52,276	14,217	31,31 ± 25,21
90	17,116	78,316	77,765	26,051	49,81 ± 32,80
120	31,829	90,907	106,836	36,728	66,58 ± 37,91
150	42,411	103,376	113,916	48,230	76,98 ± 36,89
180	73,323	113,748	124,777	66,377	94,56 ± 29,02
210	87,339	121,069	126,771	71,693	101,72 ± 26,52
240	113,654	133,204	132,561	79,803	114,81 ± 25,03
270	134,816	137,430	133,490	88,738	123,62 ± 23,31
300	159,459	141,609	134,392	106,038	135,37 ± 22,22
330	158,322	149,597	135,265	122,132	141,33 ± 15,94
360	163,727	151,745	136,110	151,937	150,88 ± 11,33

DE: Desviación estándar de

Figura 4.4 Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo I sin humectar conteniendo 0.75g de Aceite de Ricino (AR).



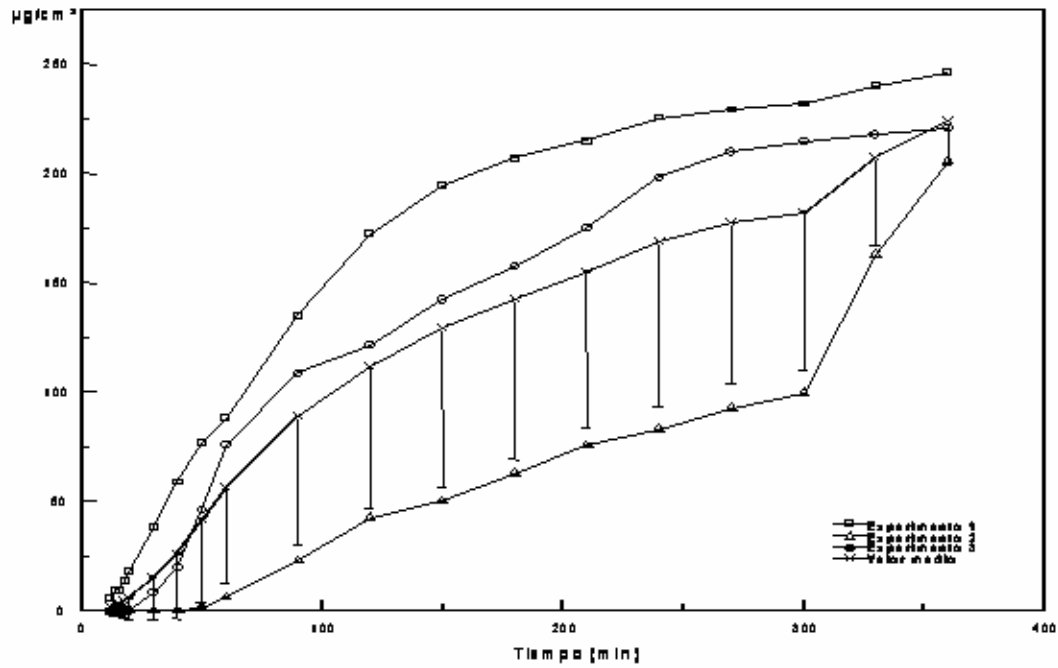
Membranas Tipo I

Tabla 4.5.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I sin humectar conteniendo 0.85g de Aceite de Ricino (AR).

<i>Tiempo</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Media ± DE</i>
	<i>(μg/cm²)</i>	<i>(μg/cm²)</i>	<i>(μg/cm²)</i>	
<i>(minuto</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	
<i>s)</i>				
2	–	–	–	–
4	–	–	–	–
6	–	–	–	–
8	–	–	–	–
10	–	–	–	–
12	5,377	0,000	0,000	1,79 ± 3,10
14	9,481	0,000	0,000	3,16 ± 5,47
16	9,446	0,000	0,000	3,15 ± 5,45
18	13,504	0,000	0,000	4,50 ± 7,80
20	17,532	0,000	0,000	5,84 ± 10,12
30	37,734	0,000	8,297	15,34 ± 19,83
40	58,741	0,197	19,323	26,09 ± 29,85
50	76,522	1,203	46,235	41,32 ± 37,90
60	88,124	6,208	75,820	56,72 ± 44,17
90	134,965	23,088	108,520	88,86 ± 58,47
120	172,171	42,703	121,029	111,97 ± 65,21
150	194,117	50,266	141,929	128,77 ± 72,82
180	206,973	62,597	157,586	142,38 ± 73,38
210	214,791	75,719	174,760	155,09 ± 71,59
240	225,294	82,883	198,056	168,74 ± 75,59
270	228,991	92,804	209,719	177,17 ± 73,70
300	231,657	99,731	214,685	182,02 ± 71,77
330	239,791	163,029	217,681	206,83 ± 39,51
360	245,910	205,781	220,553	224,08 ± 20,30

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Figura 4.5 Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo I sin humectar conteniendo 0.85g de Aceite de Ricino (AR).



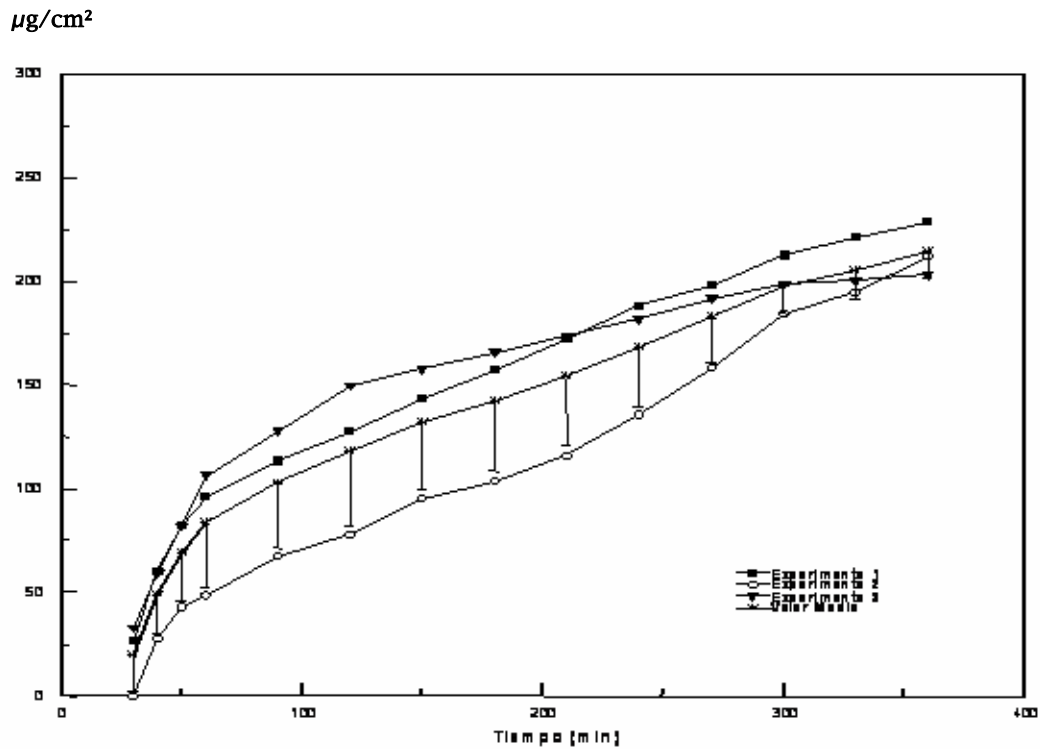
Membranas Tipo I

Tabla 4.6.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I conteniendo 0.75g de Aceite de Ricino (AR) y humectadas con agua destilada durante 12 horas.

<i>Tiempo</i> <i>(minuto</i> <i>s)</i>	<i>Q</i> <i>($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i> <i>1</i>	<i>Q</i> <i>($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i> <i>2</i>	<i>Q</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) <i>3</i>	<i>Media</i> \pm <i>DE</i>
2	-	-	-	-
4	-	-	-	-
6	-	-	-	-
8	-	-	-	-
10	-	-	-	-
12	-	-	-	-
14	-	-	-	-
16	-	-	-	-
18	-	-	-	-
20	-	-	-	-
30	26,667	0,000	32,718	19,79 \pm 17,41
40	60,029	27,557	58,878	48,82 \pm 18,42
50	82,021	42,583	81,782	68,80 \pm 22,70
60	95,790	48,440	106,484	83,57 \pm 30,89
90	113,370	67,181	127,715	102,76 \pm 31,63
120	127,791	77,765	149,652	118,40 \pm 36,85
150	143,062	95,157	157,524	131,91 \pm 32,64
180	157,196	103,503	165,280	141,99 \pm 33,58
210	172,171	115,669	173,890	153,91 \pm 33,13
240	187,974	135,483	181,407	168,29 \pm 28,60
270	197,777	157,980	191,680	182,48 \pm 21,43
300	212,319	184,074	198,944	198,45 \pm 14,13
330	220,928	194,552	200,425	205,30 \pm 13,85
360	228,483	211,568	202,806	214,29 \pm 13,05

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Figura 4.6 Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo I humectadas con agua destiladas durante 12 horas conteniendo 0.75g de Aceite de Ricino (AR).



Membranas Tipo I

Tabla 4.7.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I conteniendo 0.85g de Aceite de Ricino (AR) y humectadas con agua destilada durante 12 horas.

<i>Tiempo</i> <i>(minuto</i> <i>s)</i>	<i>Q</i> <i>($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i> <i>1</i>	<i>Q</i> <i>($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i> <i>2</i>	<i>Q</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) <i>3</i>	<i>Media \pm</i> <i>DE</i>
2	-	-	-	-
4	-	-	-	-
6	-	-	-	-
8	-	-	-	-
10	-	-	-	-
12	-	-	-	-
14	-	-	-	-
16	-	-	-	-
18	2,249	4,293	3,271	3,27 \pm 1,02
20	21,639	36,896	21,614	26,72 \pm 8,82
30	27,645	63,077	45,863	45,53 \pm 17,72
40	46,755	79,907	80,979	69,21 \pm 19,46
50	73,760	100,576	102,684	92,34 \pm 16,12
60	77,451	127,018	117,170	107,21 \pm 26,24
90	99,908	156,627	144,011	133,52 \pm 29,78
120	115,145	173,928	175,329	154,80 \pm 34,35
150	131,170	189,933	193,434	171,51 \pm 34,98
180	148,942	213,346	206,382	189,56 \pm 35,35
210	161,617	225,801	217,172	201,53 \pm 34,83
240	171,220	231,368	226,803	209,80 \pm 33,49
270	191,249	245,249	229,634	222,04 \pm 27,79
300	210,052	247,675	236,131	231,29 \pm 19,27
330	227,649	253,704	239,700	240,35 \pm 13,04
360	253,473	262,319	243,174	252,99 \pm 9,58

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo I

Figura 4.7 Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo I humectadas con agua destiladas durante 12 horas conteniendo 0.85g de Aceite de Ricino (AR).

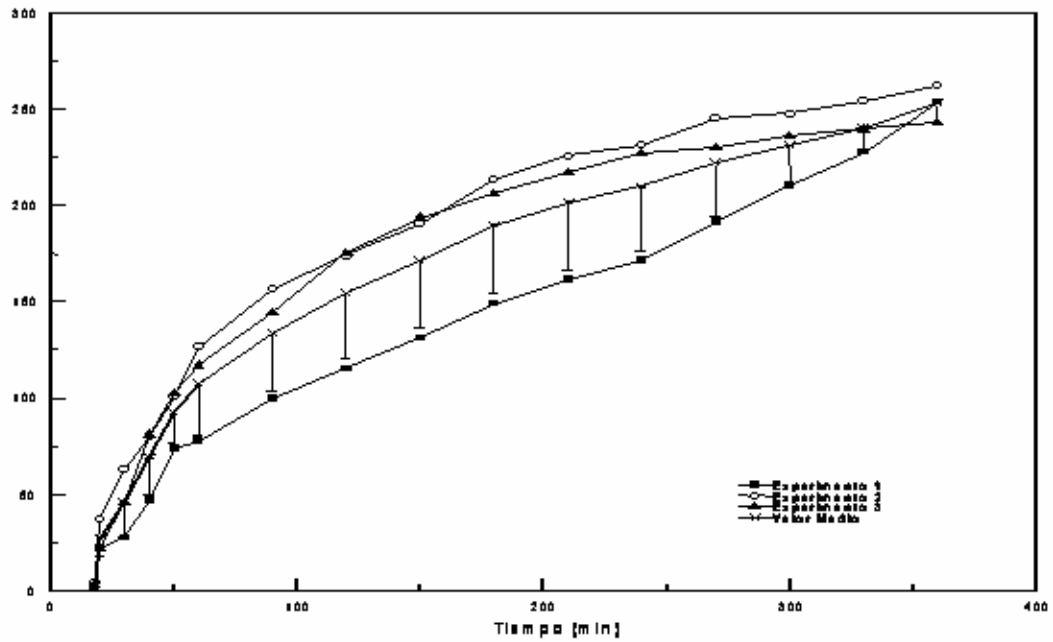
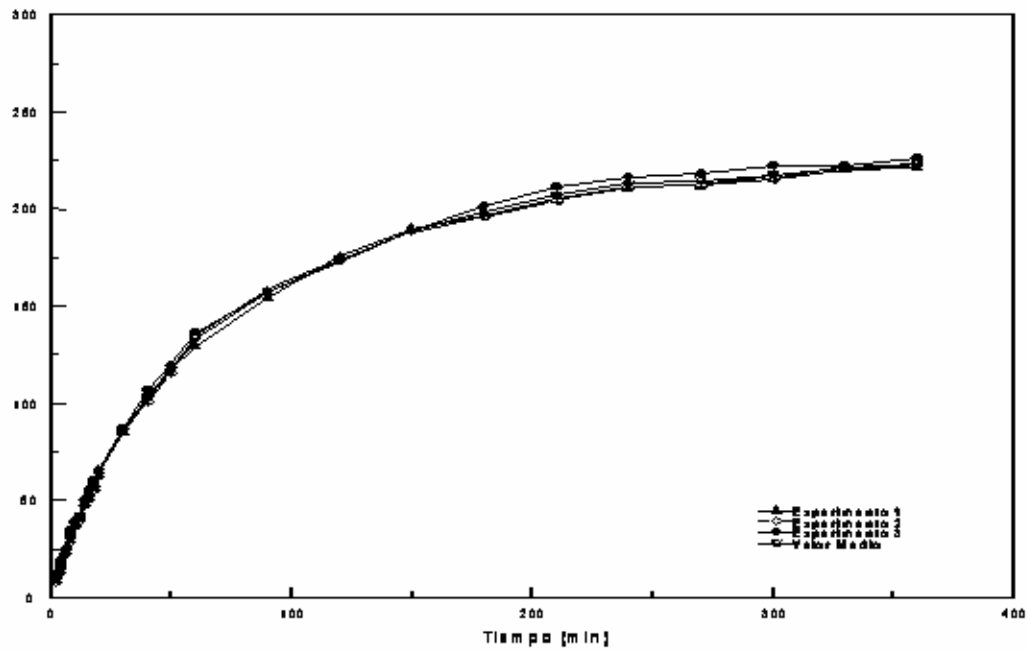
 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 

Tabla 4.8.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I conteniendo 0.75g de Aceite de Ricino (AR) y en contacto con la formulación 12 horas.

<i>Tiempo</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Q (μg/cm²)</i>	<i>Media ± DE</i>
<i>(minuto</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	
<i>s)</i>	<i>(μg/cm²)</i>	<i>(μg/cm²)</i>		
2	10,747	7,586	11,803	10,05 ± 2,19
4	15,961	12,812	19,117	15,96 ± 3,15
6	25,322	22,188	23,238	23,58 ± 1,59
8	31,487	28,369	34,633	31,50 ± 3,13
10	39,684	36,584	36,591	37,62 ± 1,79
12	42,644	39,561	40,606	40,94 ± 1,57
14	50,738	47,676	48,721	49,04 ± 1,56
16	53,634	50,590	55,748	53,32 ± 2,59
18	58,554	55,531	60,675	58,25 ± 2,59
20	65,477	62,477	64,543	64,17 ± 1,54
30	85,038	86,692	87,198	86,31 ± 1,13
40	101,945	100,475	106,769	103,06 ± 3,29
50	116,922	115,084	119,908	117,30 ± 2,43
60	129,188	134,701	136,126	133,34 ± 3,66
90	154,364	158,315	157,121	156,60 ± 2,03
120	175,538	173,612	173,031	174,06 ± 1,31
150	189,816	188,288	188,850	188,98 ± 0,77
180	197,060	195,916	201,532	198,17 ± 2,97
210	205,129	204,405	211,129	206,89 ± 3,69
240	211,136	210,838	216,719	212,90 ± 3,31
270	212,287	212,371	218,368	214,34 ± 3,49
300	215,270	215,776	221,905	217,65 ± 3,69
330	220,040	221,014	222,522	221,19 ± 1,25
360	221,007	222,400	225,963	223,12 ± 2,56

DE: Desviación estándar de los datos

Figura 4.8 Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo I en contacto con la formulación 12 horas conteniendo 0.75g de Aceite de Ricino (AR).
 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$



Membranas Tipo I

Tabla 4.9.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I conteniendo 0.85g de Aceite de Ricino (AR) y en contacto con la formulación 12 horas.

<i>Tiempo</i> <i>(minuto</i> <i>s)</i>	<i>Q</i> <i>($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i> <i>1</i>	<i>Q</i> <i>($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i> <i>2</i>	<i>Q</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) <i>3</i>	<i>Media</i> \pm <i>DE</i>
2	40,271	42,377	37,102	39,92 \pm 2,66
4	63,248	65,340	60,076	62,89 \pm 2,65
6	78,737	86,047	75,557	80,11 \pm 5,38
8	93,073	99,304	89,882	94,09 \pm 4,79
10	107,307	110,385	104,099	107,26 \pm 3,14
12	110,042	112,064	114,070	112,06 \pm 2,01
14	117,918	119,919	115,714	117,85 \pm 2,10
16	120,591	122,574	117,343	120,17 \pm 2,64
18	125,293	127,256	122,028	124,86 \pm 2,64
20	132,002	133,943	128,714	131,55 \pm 2,64
30	149,541	146,371	152,021	149,31 \pm 2,83
40	162,634	168,974	163,691	165,10 \pm 3,40
50	185,329	176,462	162,312	174,70 \pm 11,61
60	187,305	188,453	183,400	186,39 \pm 2,65
90	218,132	219,372	213,538	217,01 \pm 3,07
120	242,142	242,980	236,613	240,58 \pm 3,46
150	256,777	257,224	250,417	254,81 \pm 3,81
180	264,354	264,419	257,188	261,99 \pm 4,16
210	272,820	272,476	264,783	270,03 \pm 4,54
240	279,236	278,477	270,317	276,01 \pm 4,95
270	280,718	279,579	270,994	277,10 \pm 5,32
300	284,102	282,552	273,503	280,05 \pm 5,72
330	289,357	287,358	277,799	284,84 \pm 6,18
360	290,719	288,312	278,293	285,77 \pm 6,59

DE: Desviación estándar de los datos

Figura 4.9 Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo I en contacto con la formulación 12 horas conteniendo 0.85g de Aceite de Ricino (AR).

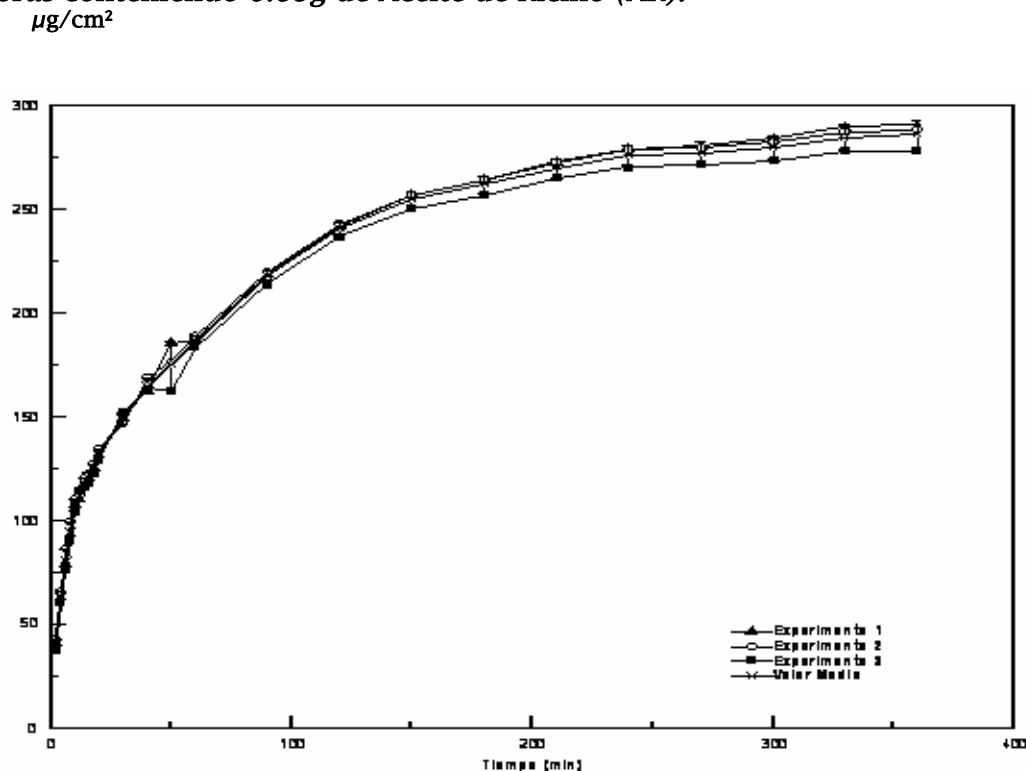


Tabla 4.10.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I conteniendo 0.75g de Aceite de Ricino (AR) y en contacto con la formulación 72 horas.

<i>Tiempo</i> <i>(minuto</i> <i>s)</i>	<i>Q</i> <i>(µg/cm²)</i> <i>1</i>	<i>Q</i> <i>(µg/cm²)</i> <i>2</i>	<i>Q (µg/cm²)</i> <i>3</i>	<i>Media ±</i> <i>DE</i>
2	10,747	31,836	53,966	32,18 ± 21,61
4	20,160	39,082	61,122	40,12 ± 20,50
6	32,642	46,277	68,224	49,05 ± 17,95
8	35,650	58,638	80,485	58,26 ± 22,42
10	37,595	65,713	87,459	63,59 ± 25,00
12	43,664	66,521	88,171	66,12 ± 22,26
14	48,656	72,483	94,030	71,72 ± 22,70
16	52,582	75,316	96,762	74,89 ± 22,09
18	54,431	80,177	101,517	78,71 ± 23,58
20	60,342	91,133	112,352	87,94 ± 26,15
30	78,290	102,987	123,964	101,75 ± 22,86
40	91,006	113,731	134,445	113,06 ± 21,73

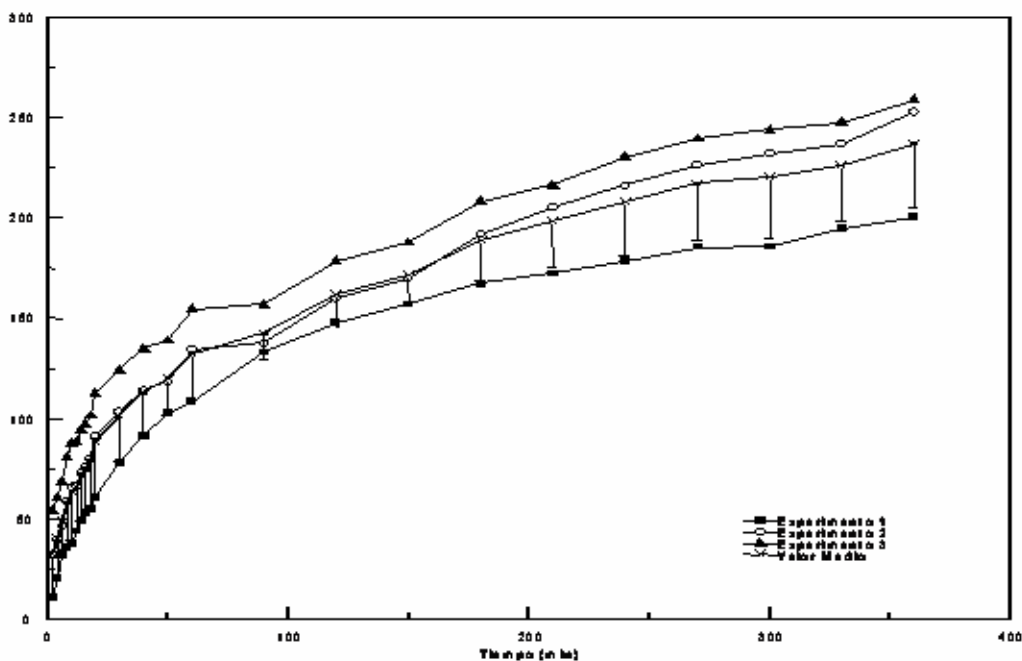
Membranas Tipo I

50	102,583	118,329	138,788	119,90 ± 18,15
60	108,044	133,949	154,071	132,02 ± 23,07
90	132,865	137,286	156,766	142,31 ± 12,72
120	147,426	159,501	178,067	161,66 ± 15,43
150	156,849	169,598	187,296	171,25 ± 15,29
180	167,050	191,414	207,939	188,80 ± 20,57
210	172,266	205,154	215,749	197,72 ± 22,67
240	178,310	215,817	230,043	208,06 ± 26,73
270	185,156	226,360	239,349	216,95 ± 28,29
300	185,337	231,955	243,791	220,36 ± 30,90
330	194,702	236,519	247,192	226,14 ± 27,74
360	200,209	252,491	258,747	237,15 ± 32,14

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Figura 4.10 Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo I en contacto con la formulación 72 horas conteniendo 0.75g de Aceite de Ricino (AR).

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$



Membranas Tipo I

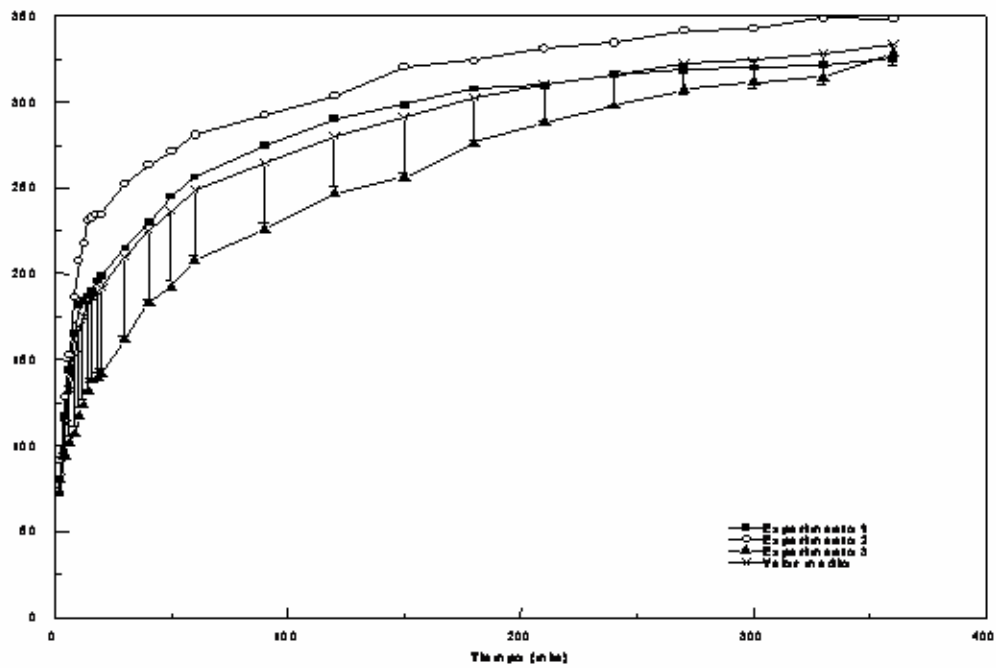
Tabla 4.11.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I conteniendo 0.85g de Aceite de Ricino (AR) y en contacto con la formulación 72 horas.

<i>Tiempo</i> <i>(minuto</i> <i>s)</i>	<i>Q</i> <i>($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i> <i>1</i>	<i>Q</i> <i>($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i> <i>2</i>	<i>Q</i> ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) <i>3</i>	<i>Media \pm</i> <i>DE</i>
2	71,899	90,873	80,324	81,03 \pm 9,51
4	116,826	128,374	93,691	112,96 \pm 17,66
6	143,641	153,046	101,727	132,80 \pm 27,32
8	165,048	186,929	106,574	152,85 \pm 41,54
10	182,142	208,094	117,617	169,28 \pm 46,59
12	184,608	217,710	123,401	175,24 \pm 47,85
14	187,052	231,381	131,202	183,21 \pm 50,20
16	189,474	232,607	137,915	186,67 \pm 47,41
18	195,975	233,819	139,456	189,75 \pm 47,49
20	198,338	235,016	142,001	191,79 \pm 46,85
30	214,811	252,299	161,640	209,58 \pm 45,55
40	230,128	263,350	183,108	225,53 \pm 40,32
50	245,310	271,273	192,296	236,29 \pm 40,25
60	256,340	281,122	207,394	248,29 \pm 37,52
90	274,893	292,356	225,744	264,33 \pm 34,54
120	290,242	303,429	246,758	280,14 \pm 29,65
150	298,488	320,250	255,688	291,48 \pm 32,85
180	307,605	324,115	276,115	302,61 \pm 24,39
210	309,762	330,823	288,491	309,69 \pm 21,17
240	315,759	334,521	297,775	316,02 \pm 18,37
270	318,770	341,986	306,883	322,55 \pm 17,85
300	319,806	342,650	311,104	324,52 \pm 16,29
330	321,762	348,963	314,287	328,34 \pm 18,25
360	325,571	348,574	328,512	334,22 \pm 12,52

DE: Desviación estándar de los datos

Membranas Tipo I

Figura 4.11 Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo I en contacto con la formulación 72 horas conteniendo 0.85g de Aceite de Ricino (AR).
 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$



Membranas Tipo I

Tabla 4.12.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I conteniendo 0.65g de Aceite de Ricino (AR) utilizando Celdas de Franz modificadas.

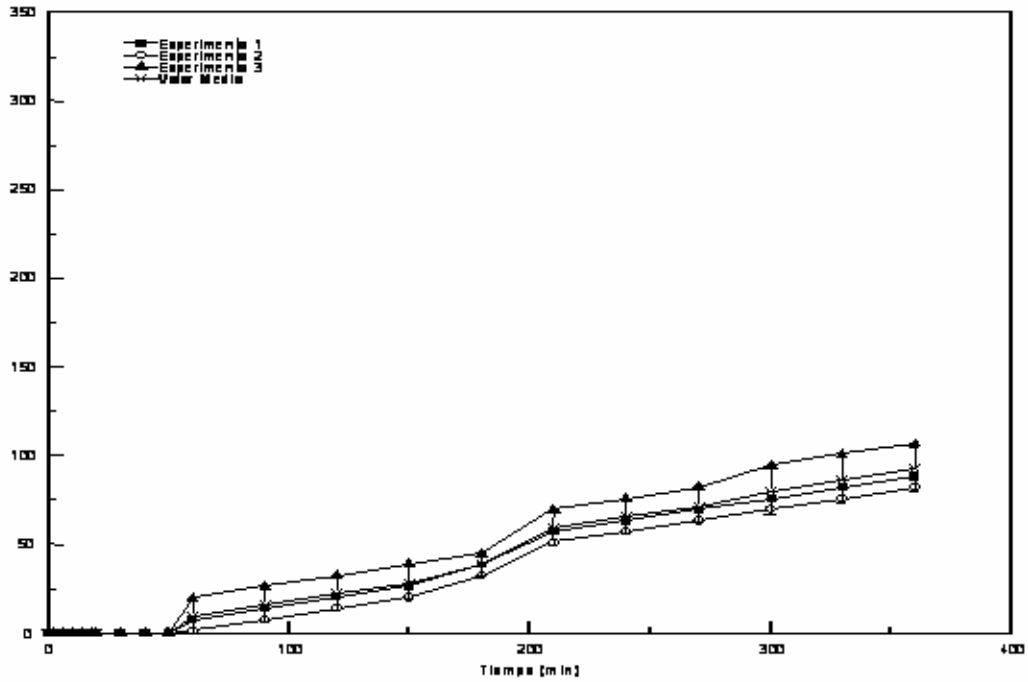
<i>Tiempo</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Media ± DE</i>
	<i>(μg/cm²)</i>	<i>(μg/cm²)</i>	<i>(μg/cm²)</i>	
<i>(minuto</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	
<i>s)</i>				
2	-	-	-	-
6	-	-	-	-
10	-	-	-	-
14	-	-	-	-
18	-	-	-	-
20	-	-	-	-
30	-	-	-	-
40	-	-	-	-
50	-	-	-	-
60	7,417	1,211	19,829	9,49 ± 9,48
90	13,623	7,417	26,035	15,69 ± 9,49
120	19,829	13,623	32,241	21,90 ± 9,47
150	26,035	19,829	38,447	28,10 ± 9,48
180	38,447	32,241	44,653	38,45 ± 6,21
210	57,065	50,859	69,477	59,13 ± 9,46
240	63,271	57,065	75,683	65,34 ± 9,49
270	69,477	63,271	81,889	71,55 ± 9,48
300	75,683	69,477	94,301	79,82 ± 12,91
330	81,889	75,683	100,507	86,03 ± 12,93
360	88,095	81,889	106,713	92,23 ± 12,92

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo I

Figura 4.12 Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesi3n utilizando membranas tipo I conteniendo 0.65g de AR utilizando Celdas de Franz modificadas.

$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$



Membranas Tipo I

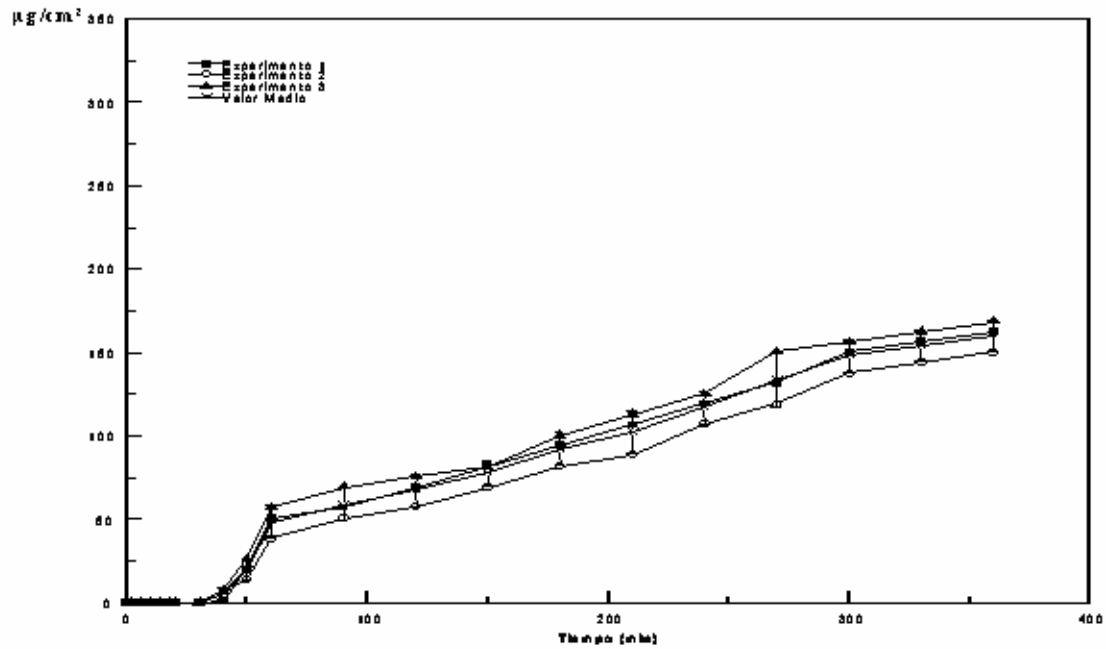
Tabla 4.13.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I conteniendo 0.75g de Aceite de Ricino (AR) utilizando Celdas de Franz modificadas.

<i>Tiempo</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Media ± DE</i>
	<i>(μg/cm²)</i>	<i>(μg/cm²)</i>	<i>(μg/cm²)</i>	
<i>(minutos)</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	
2	–	–	–	–
6	–	–	–	–
10	–	–	–	–
14	–	–	–	–
18	–	–	–	–
20	–	–	–	–
30	–	–	–	–
40	1,211	7,417	7,417	5,35 ± 3,58
50	19,829	13,623	26,035	19,83 ± 6,21
60	50,859	38,447	57,065	48,79 ± 9,48
90	57,065	50,859	69,477	59,13 ± 9,49
120	69,477	57,065	75,683	67,41 ± 9,47
150	81,889	69,477	81,889	77,75 ± 7,17
180	94,301	81,889	100,507	92,23 ± 9,48
210	106,713	88,095	112,919	102,58 ± 12,92
240	119,125	106,713	125,331	117,06 ± 9,48
270	131,537	119,125	150,155	133,61 ± 15,62
300	150,155	137,743	156,361	148,09 ± 9,50
330	156,361	143,949	162,567	154,29 ± 9,48
360	162,567	150,155	168,773	160,50 ± 9,49

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo I

Figura 4.13 Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo I conteniendo 0.75g de AR utilizando Celdas de Franz modificadas.



Membranas Tipo I

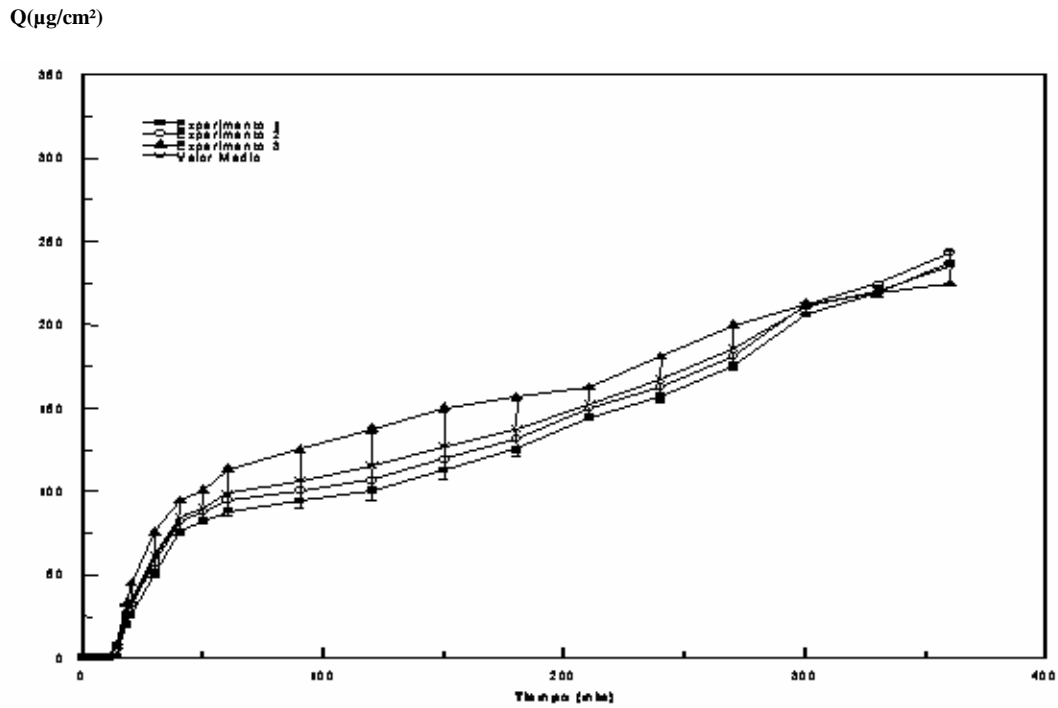
Tabla 4.14.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I conteniendo 0.85g de Aceite de Ricino (AR) utilizando Celdas de Franz modificadas.

<i>Tiempo</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Media ± DE</i>
	<i>(μg/cm²)</i>	<i>(μg/cm²)</i>	<i>(μg/cm²)</i>	
<i>(minuto</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	
<i>s)</i>				
2	–	–	–	–
6	–	–	–	–
10	–	–	–	–
16	1,21	7,42	7,42	5,349 ± 3,58
18	19,83	26,04	32,24	26,035 ± 6,21
20	26,04	32,24	44,65	34,310 ± 9,50
30	50,86	57,07	75,68	61,203 ± 12,92
40	75,68	81,89	94,30	83,958 ± 9,47
50	81,89	88,10	100,51	90,164 ± 9,48
60	88,10	94,30	112,92	98,438 ± 12,92
90	94,30	100,51	125,33	106,713 ± 16,42
120	100,51	106,71	137,74	114,988 ± 19,96
150	112,92	119,13	150,16	127,400 ± 19,95
180	125,33	131,54	156,36	137,743 ± 16,42
210	143,95	150,16	162,57	152,224 ± 9,48
240	156,36	162,57	181,18	166,704 ± 12,92
270	174,98	181,18	199,80	185,322 ± 12,93
300	206,01	212,21	212,21	210,146 ± 3,58
330	218,42	224,63	218,42	220,490 ± 3,57
360	237,04	243,24	224,63	234,970 ± 9,51

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo I

Figura 4.14 Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesi3n utilizando membranas tipo I conteniendo 0.85g de AR utilizando Celdas de Franz modificadas.



Membranas Tipo I

Tabla 4.15.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I conteniendo 1.00g de Aceite de Ricino (AR) utilizando Celdas de Franz modificadas.

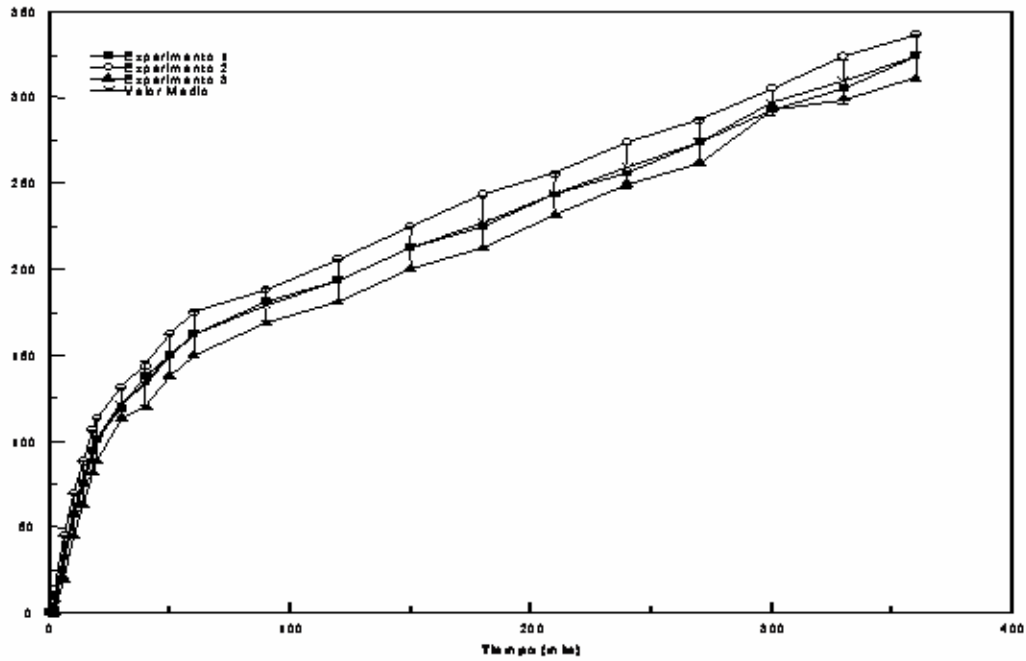
<i>Tiempo</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>Media ± DE</i>
	<i>(μg/cm²)</i>	<i>(μg/cm²)</i>	<i>(μg/cm²)</i>	
<i>(minuto</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	
<i>s)</i>				
2	1,211	13,623	0,000	4,94 ± 7,54
6	32,241	44,653	19,829	32,24 ± 12,42
10	57,065	69,477	44,653	57,07 ± 12,41
14	75,683	88,095	63,271	75,68 ± 12,39
18	94,301	106,713	81,889	94,30 ± 12,41
20	100,507	112,919	88,095	100,51 ± 12,42
30	119,125	131,537	112,919	121,19 ± 9,48
40	137,743	143,949	119,125	133,61 ± 12,92
50	150,155	162,567	137,743	150,16 ± 12,43
60	162,567	174,979	150,155	162,57 ± 12,39
90	181,185	187,391	168,773	179,12 ± 9,48
120	193,597	206,009	181,185	193,60 ± 12,41
150	212,215	224,627	199,803	212,21 ± 12,38
180	224,627	243,245	212,215	226,70 ± 15,62
210	243,245	255,657	230,833	243,24 ± 12,41
240	255,657	274,275	249,451	259,79 ± 12,92
270	274,275	286,687	261,863	274,27 ± 12,43
300	292,893	305,305	292,893	297,03 ± 7,17
330	305,305	323,923	299,099	309,44 ± 12,92
360	323,923	336,335	311,511	323,92 ± 12,41

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo I

Figura 4.15 Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo I conteniendo 1.00g de AR utilizando Celdas de Franz modificadas.

Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)



4.6. COMENTARIOS

A continuación se realizarán los comentarios de los resultados obtenidos, comenzando por aquellos en los que se utiliza como *célula de difusión, la Placa Petri*.

4.6.1.- Influencia de las condiciones en que se encuentra la membrana

4.6.1.1.- Membranas sin humectar (MSH)

Al hacer la representación gráfica de los valores medios de los datos obtenidos al ensayar cada una de estas membranas tipo I sin humectar (tablas 4.3-4.5) expresados en porcentaje de cesión de AS, frente a tiempo de toma de muestra, además de los datos correspondientes a las membranas con 0.50g y 1.00g de AR, obtenidos por *Rodríguez Bayón (1989a)*, se obtiene la *figura 4.16*.

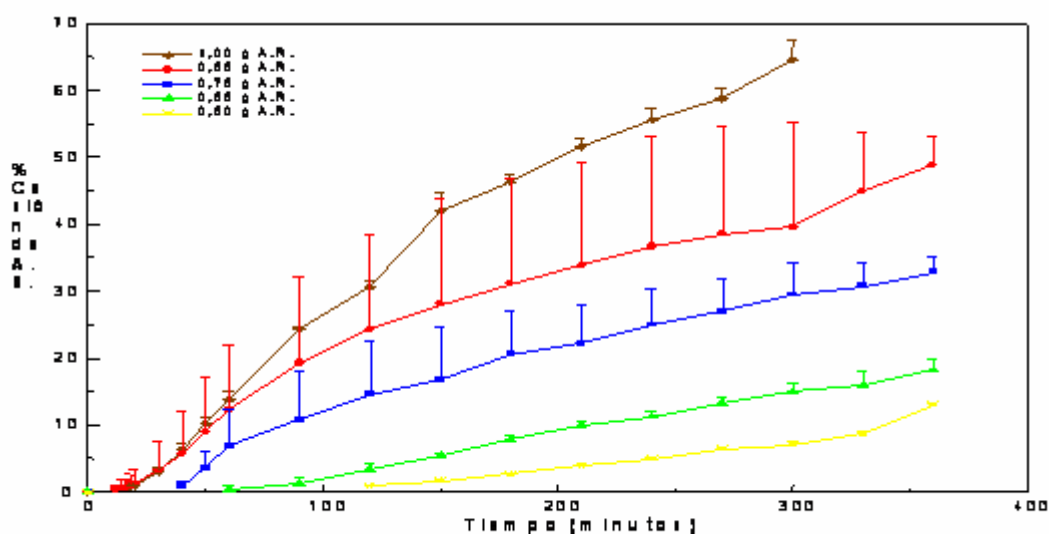


Figura 4.16 Porcentajes de AS cedidos a fase receptora en función de la cantidad de aceite de ricino que forma parte de las membranas tipo I sin humectar (MSH)

Se observa que los perfiles de cesión que se obtienen con las distintas membranas son distintos. Así, cuando la cantidad de aceite de ricino presente en la membrana es menor a 0,75g. se obtienen trazados más o menos lineales,

pero cuando la cantidad de aceite de ricino es igual o mayor a 0,75 g. se obtienen curvas exponenciales.

Asimismo, se aprecia que la cesión de AS es muy lenta en el inicio del ensayo presentando en todos los casos período de latencia, más acusado en las membranas con menor contenido de AR.

Así, por ejemplo, la membrana con 0,50 g. de AR. tiene el mayor período de latencia (90 minutos), valor que desciende hasta 60 minutos cuando se ensayan membranas que contienen 0.65g de AR, ó 40 minutos en el caso de utilizar

membranas de 0.75g de AR; por tanto, los tiempos de latencia más corto, alrededor de 15 minutos, se obtienen cuando se ensayan membranas conteniendo 0.85g ó 1.00g de aceite de ricino. Este mismo hecho se observa en un trabajo anterior al ensayar membranas de colodión con 0,5 g. ó 1,0 g. de A.R. (*Rodríguez Bayón, 1989a*).

También se observa en esa gráfica, que al incrementar la cantidad de AR. que compone la membrana se produce un aumento en el porcentaje de AS. que se transfiere a través de la misma. Es decir, parece que existe una relación entre la cantidad de AR. que compone la membrana y el porcentaje de AS. cedido, lo cual indicaría que la cantidad de AR que entra en la composición de la membrana es un factor influyente en la transferencia del ácido salicílico a través de estas membranas tipo I sin humectar (MSH).

Con el fin de analizar si la cantidad de aceite de ricino que compone la membrana es un factor que influye en la transferencia del ácido salicílico a través de estas membranas (MSH), se realiza el análisis estadístico de los datos de cesión obtenidos, mediante el análisis de varianza de una vía, ANOVA, de los valores de cantidades de AS cedidas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a través de las distintas membranas, a distintos tiempos de ensayo (*Figura 4.17*) obteniéndose como resultado, que existen diferencias estadísticamente significativas en las cantidades cedidas de AS dependiendo de la membrana MSH ensayada.

Por tanto, la cantidad de AR que compone la membrana sí influye en la velocidad de transferencia del AS contenido en la emulsión.

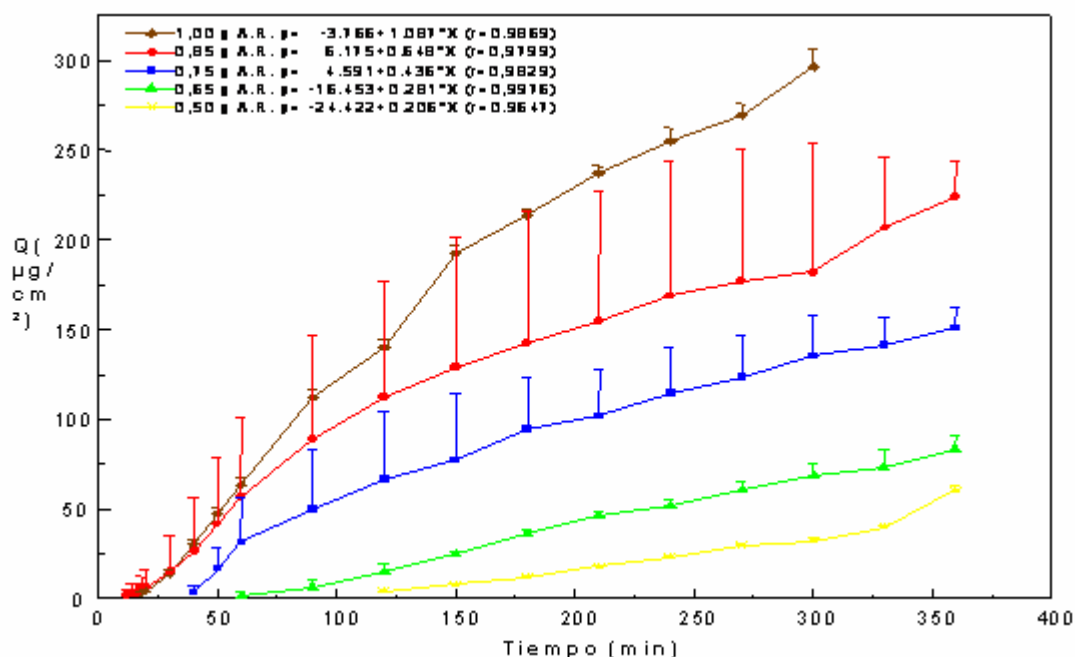


Figura 4.17 *Cantidades de AS cedidas a través de las distintas membranas tipo I sin humectar (MSH)*

La relación existente entre ambos parámetros, obtenida a partir de las ecuaciones de la figura 4.17, viene definida por la siguiente expresión (ecuación 4.1):

$$\text{Velocidad de cesión AS } (\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}) = -1,5989 + 0,2198 \cdot \text{cantidad de AR} \quad (r = 0,9971) \quad (\text{Ec. 4.1})$$

En la obtención de la ecuación 4.1 se emplea, para la membrana de 0,50g de AR la ecuación $y = -2,67 + 0,2225 \cdot x$ ($r = 0,9825$) en lugar de la expresión que aparece en la figura 4.17, ya que el último punto ($t = 360$ minutos) se considera aberrante y se desprecia en el ajuste de los datos a la ecuación de la recta. Luego, a partir de la ecuación 4.1 podríamos preparar membranas con la cantidad de AR

necesaria para obtener la velocidad de transferencia de AS deseada para cada caso.

Por último, en la *figura 4.18*, se representan las cantidades de AS cedidas a través de las distintas membranas tipo I (MSH) frente a la raíz cuadrada del tiempo (Tratamiento cinético de Higuchi).

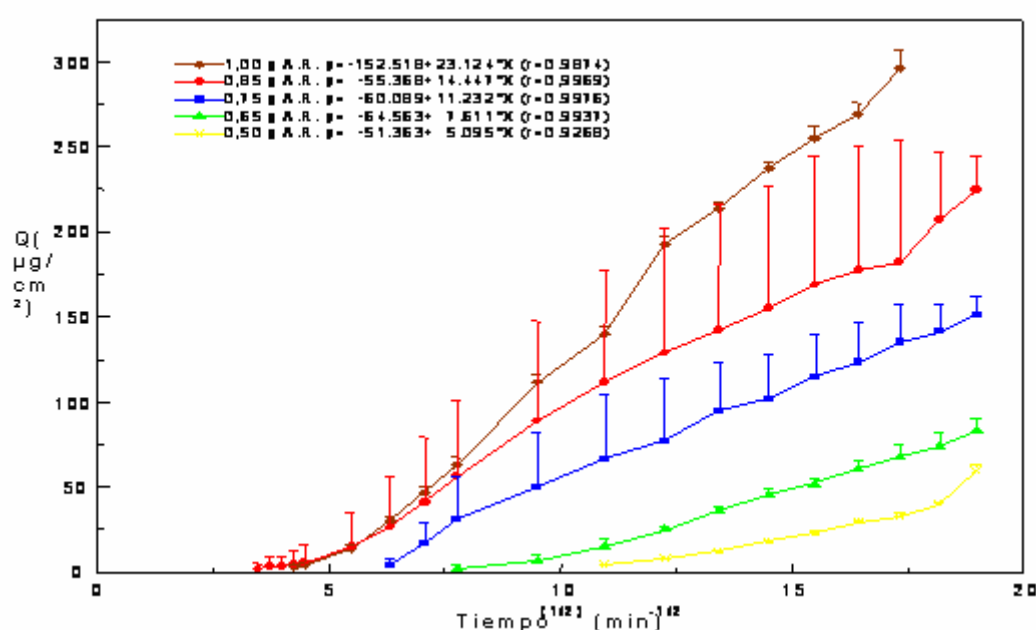


Figura 4.18 Cantidades de AS cedidas a fase receptora $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ versus raíz cuadrada del tiempo (Cinética de Higuchi) en función de la cantidad de aceite de ricino que contienen las membranas tipo I

Se observa que, solamente las membranas con un contenido en aceite de ricino mayor o igual a 0,75g se ajustan mejor a esta cinética, ya que los coeficientes de correlación obtenidos en este caso son mejores que los que se tenían con el tratamiento de datos precedente (*ver figura 4.17*). Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando el contenido en AR de la membrana es inferior a esa cantidad (membranas de 0,50 ó 0,65g de AR) como se puede ver en la *Figura 4.16*.

Este hecho, confirma el comentario realizado anteriormente: los perfiles de cesión del AS a través de membranas tipo I sin humectar (MSH) son distintos en función de la cantidad de AR que lleve esa membrana.

4.6.1.2.- Membranas humectadas

Con objeto de dilucidar si la hidratación de la membrana influye en la cesión del ácido salicílico, se realizan los ensayos de transferencia del componente tipo utilizando membranas que contienen 0,75g ó 0,85g de aceite de ricino humectadas con agua destilada durante 12 horas (MH) o mantenidas en contacto con la formulación 12 ó 72 horas (MC), antes de comenzar el ensayo de cesión.

A) Membranas humectadas con agua destilada durante 12 horas (MH)

En la *figura 4.19* se representan los porcentajes de AS cedidos a través de membranas tipo I, que contienen **0,75 ó 0,85g de AR**, humectadas durante 12 horas con agua destilada (MH). Como se observa los trazados de las curvas son semejantes entre sí y semejantes, también, a los obtenidos con las membranas sin humectar (MSH) con el mismo contenido en plastificante (0,75g ó 0,85g de AR) pero, a diferencia de éstas, los períodos de latencia son menores y los porcentajes de cesión de A.S. son mayores. Así, por ejemplo observamos que las membranas que tienen **0,75 g. de A.R.**, presentan un período de latencia de 20 minutos (MH), frente a 40 minutos (MSH), y que la cesión del A.S. se ve incrementada desde un 32,85% (MSH) hasta un 46,86% de A.S. (MH).

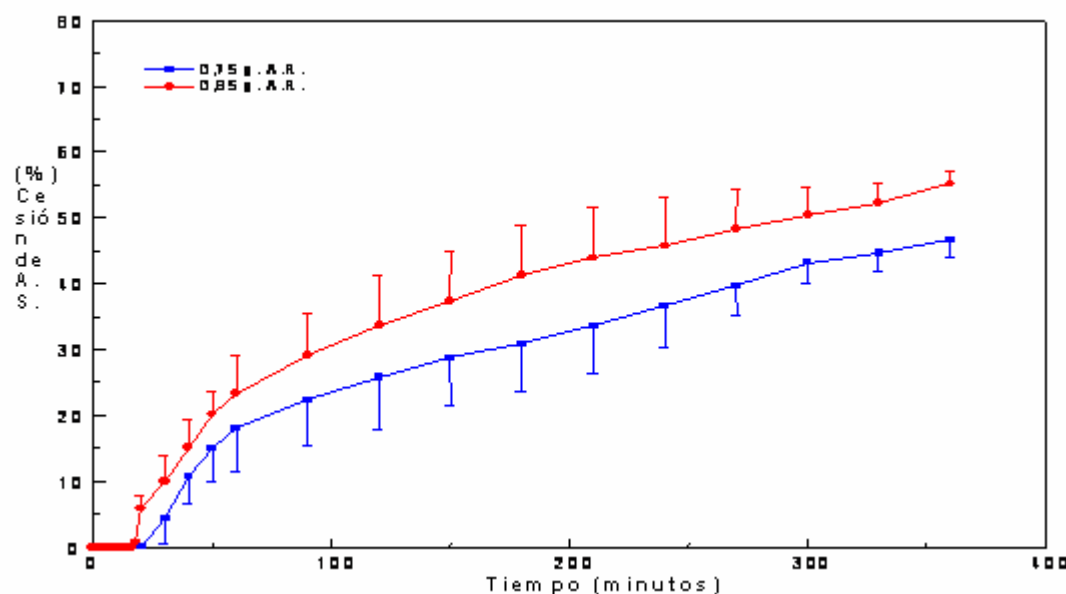


Figura 4.19 Porcentajes de AS cedidos a fase receptora en función de la cantidad de aceite de ricino (0,75g ó 0,85g) que contienen las membranas tipo I que permanecen sumergidas 12 horas en agua destilada (MH)

Sin embargo, al comparar los períodos de latencia de ambas membranas MH (con 0,75g ó 0,85g de AR) se ve que, cuando se aumenta la cantidad de AR en la membrana, el tiempo de latencia disminuye aún más ($t_l < 20$ minutos, para la MH con 0,85g de AR).

Ese tiempo, es semejante al obtenido al usar membranas MSH con 0,85g de AR ($t_l < 20$ minutos). No obstante, los porcentajes de AS transferidos a través de la membrana humectada (MH) son mayores (55% AS cedido) que los que se obtienen con las MSH (48%).

Asimismo, al comparar la cesión del AS a través de esas dos clases de membranas MH (0,75g ó 0,85g de AR), se aprecia

Membranas Tipo I

una mayor cesión de AS a través de la membrana con mayor contenido en AR: 46,64% AS se cede a través de la membrana MH de 0,75g de AR y 55% a través de la de 0,85g de AR.

Luego, al igual que ocurre en las membranas MSH, parece que, cuanto mayor es la cantidad de plastificante (AR) en la membrana MH, mayor es la cesión de AS a través de esas membranas.

Por tanto, para comprobar si la cantidad de plastificante (AR) que contienen las membranas MH influye en la cesión del AS se realiza el análisis de la varianza -ANOVA- de una vía de los valores de cantidad de AS cedido a través de ambas membranas MH (0,75g ó 0,85g de AR).

El valor de p del test F es < 0.05 , lo que indica que sí que hay diferencias, estadísticamente significativas, en la cesión del AS a través de cada una de esas membranas, para un nivel de confianza del 95%.

En función de los resultados de ese ANOVA, se puede decir que, dependiendo de la cantidad de AR que lleve la membrana MH, así será la difusión del AS: a mayor cantidad de AR en membrana MH, mayor cantidad de AS se cede a fase receptora a través de esas membranas. Sin embargo, la influencia del componente lipídico (AR) en la cesión del AS disminuye conforme transcurre el tiempo de ensayo y así, al cabo de la hora y media de experimentación, una vez que se instaure el régimen de cesión, y hasta el final del ensayo, se observa una constancia en la velocidad de transferencia del AS a través de esas membranas MH. Esa velocidad es: $v = 0,43 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ de AS cedidos a través de ambas membranas MH (0,75g ó 0,85g de AR). Luego, a partir de los 90 minutos de ensayo, la cantidad de AR que lleve la membrana no influye en la velocidad de transferencia del AS ya que las pendientes de los tramos finales (rectos) de las curvas de cesión de ambas MH son iguales al ser esos tramos paralelos.

B) Membranas humectadas al mantenerlas en contacto con la Emulsión
durante 12 horas ó 72 horas (MC)

B.1.- Membranas mantenidas en contacto con la emulsión 12 horas
(MC-12)

En la *figura 4.20* se representan las curvas teóricas a las que se ajustan los datos experimentales que se obtienen al ensayar membranas que permanecen en contacto con la formulación 12 horas (MC-12). Se ve que los perfiles de cesión que se obtienen con ambas membranas son muy semejantes entre sí, siendo la cesión de AS mayor a través de la membrana que contiene 0,85g de AR, que a través de la de 0,75g; por tanto, se observa la misma tendencia que en los dos casos precedentes (membranas MSH y MH). A mayor cantidad de AR en la membrana, mayor porcentaje de AS se cede a través de ella.

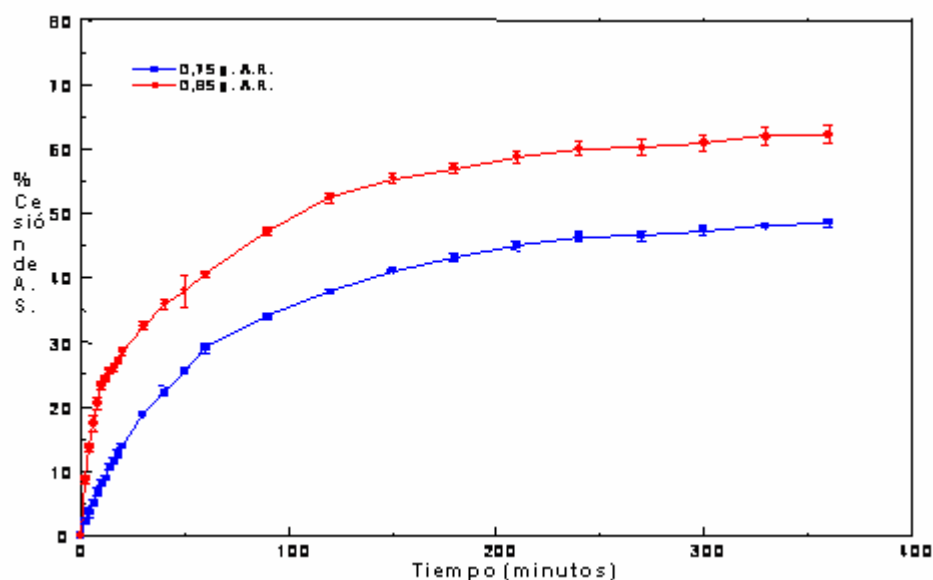


Figura 4.20 Porcentajes de AS cedidos a fase receptora en función de la cantidad de aceite de ricino que contienen las membranas tipo I(MC) que permanecen en contacto 12 horas con la formulación

Como en los dos casos anteriores (MSH y MH), para comprobar si la cantidad de plastificante (AR) que contienen las membranas MC influye en la cesión del AS, se realiza el análisis de la varianza -ANOVA- de una vía de los porcentajes de AS cedidos a través de membranas MC-12 h.

El resultado obtenido, ($p < 0.05$) indica que sí hay diferencias, estadísticamente significativas, entre los valores de AS cedidos a través de cada una de esas membranas MC-12h (0,75g ó 0,85g de AR), para un nivel de confianza del 95%. Luego, a mayor cantidad de AR en membrana MC, mayor porcentaje de AS se cede a su través.

El que se produzca mayor cesión de AS a través de estas MC-12h es debido, no sólo al hecho de que al estar en contacto membrana y formulación, el AS vaya impregnando la membrana sino que, además, la MC se hidrata con el agua constituyente de la fase externa de la emulsión O/A que se emplea como fase dadora en los ensayos de cesión. Por ambos motivos la transferencia del AS es mayor a través de las MC (48,83%) que de las MSH (32,85%); sin embargo, son bastante semejantes a los porcentajes de AS cedidos a través de MH con 0,75g de AR (46,86%) (Tabla 4.16).

Tabla 4.16.-Transferencia de AS a través de membranas tipo I sin humectar

(MSH), humectadas con agua destilada (MH), o mantenidas en contacto con la

formulación (MC) durante 12 horas ó 72 horas.

<i>Tipo de Membrana</i>	<i>Cantidad de Aceite de Ricino</i>	<i>Tiempo de contacto o de humectación</i>	<i>Período de latencia</i>	<i>Cesión de AS a t=360 minutos</i>
(MSH)	0,75 g.	-	40 minutos	32,85%
	0,85 g.	-	30 minutos	49,05%
<i>en contacto con la emulsión (MC)</i>	0,75 g.	12 horas	-	48,83%
		72 horas	-	51,90%
	0,85 g.	12 horas	-	62,41%
		72 horas	-	73,15%
(MH)	0,75 g.	12 horas	30 minutos	46,86%
	0,85 g.	12 horas	18 minutos	55,19%

En la figura 4.20 también se ve que no hay tiempo de latencia: la cesión del AS se produce en el mismo instante en que se ponen en contacto las membranas **MC-12h** (0,75g ó 0,85g AR) con la fase receptora (Inicio del ensayo) y, como es lógico, se cede más AS (%) que a través de las correspondientes membranas **MSH** (ver Tabla 4.16).

Después de 180 minutos de comenzado el ensayo, al igual que ocurre con las membranas **MH**, las porciones finales de ambas curvas **MC-12h** se hacen paralelas; las

velocidades de cesión de AS a través de membranas de **0,75g** ó **0,85g** de AR son iguales ($v=0,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{minutos}$). Luego, a partir de ese momento, la velocidad de cesión de AS es independiente de la cantidad de AR de la membrana.

B.2.- Membranas mantenidas en contacto con la formulación 72 horas (MC-72h)

Con respecto a los datos de cesión de AS obtenidos a través de las membranas, con **0,75g** ó **0,85g** de AR, mantenidas en contacto con la formulación 72 horas (**MC-72horas**) (Figura 4.21), se aprecia, al igual que en casos precedentes (**MSH**, **MH**

Membranas Tipo I

y MC-12 horas), que es mayor la cesión de AS a través de membranas de 0,85g AR, que de 0,75g de AR y al realizar el análisis estadístico (ANOVA de una vía) de los datos de cesión de AS obtenidos para ver si la cantidad de AR (0,75 ó 0,85g) que contiene la membrana MC-72 horas, influye en la cesión del AS, se obtiene que el valor de $p < 0.05$.

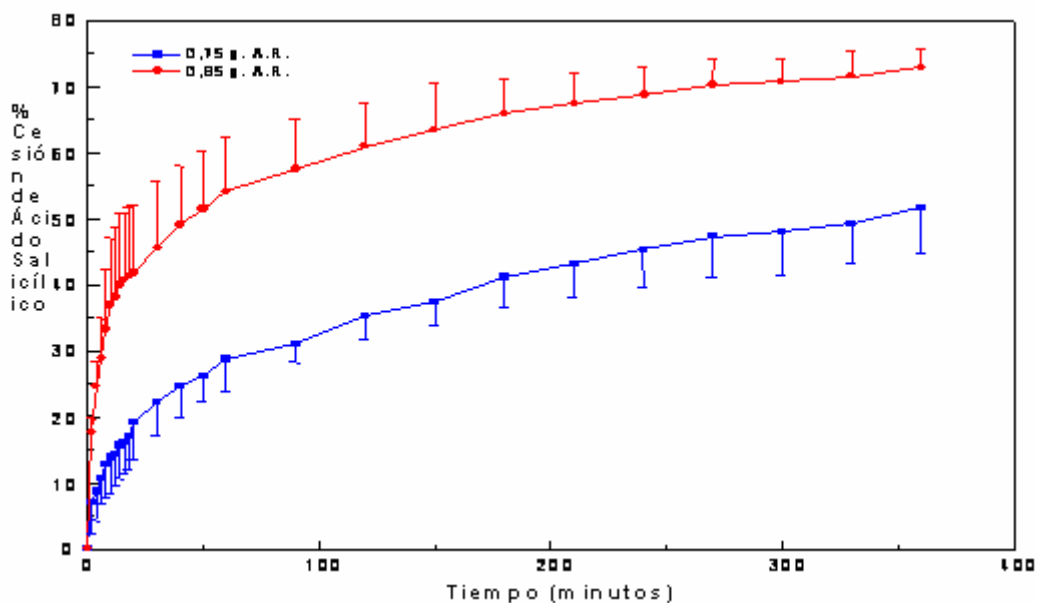


Figura 4.21 Porcentajes de AS cedidos a fase receptora en función de la cantidad de aceite de ricino que contienen las membranas tipo I (MC) que permanecen en contacto 72 horas con la formulación

Al ser el valor de p del test $F < 0.05$, indica que sí que hay diferencias, estadísticamente significativas, entre los valores medios de AS cedido a través de cada una de esas membranas de 0,75g ó 0,85g de AR, para un nivel de confianza del 95%.

Por tanto, en función de la cantidad de AR de la membrana así será la cesión del AS a través de la misma. A mayor cantidad de lípido (AR) en membrana, mayor es el porcentaje de AS cedido.

Con respecto a la velocidad de transferencia del AS a través de esas membranas **MC-72 horas**, a diferencia de los casos precedentes, una vez alcanzado el régimen de cesión, la velocidad de cesión de AS no es la misma para membranas con **0,75g** de AR que con **0,85g** de AR. Aquí, la velocidad de transferencia del AS depende de la cantidad de lípido (AR) que lleve la membrana (**0,75g** ó **0,85g** de AR). Después de los primeros 90 minutos de ensayo, tiempo que tarda en instaurarse el régimen de cesión, la velocidad de transferencia del AS es $v = 0,332 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{minutos}$ para la membrana MC-72h (0,75g de AR). En las mismas circunstancias, para la membrana MC-72h (0,85g de AR), la $v = 0,242 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{minutos}$. Luego, cuando la membrana permanece en contacto 72 horas con la emulsión, sí que influye el contenido en AR en la cesión de AS ya que no coinciden los valores de velocidad de cesión del AS. Pero en general, a partir de los resultados obtenidos hasta aquí, exceptuando este último caso que se acaba de exponer, se puede pensar que una vez que se establece el régimen de cesión, a partir del momento en que el trazado de la curva de cesión se rectifica (última porción de la gráfica), el contenido lipídico de la membrana no influye en la velocidad de transferencia del AS, ya que esas velocidades se igualan en ambos tipos de membranas (con 0,75g ó 0,85g de AR).

Sería interesante resaltar el hecho de que en la cesión del AS a través de membranas impregnadas por lípidos como el AR, por el cual, el fármaco va a tener cierta afinidad, al dejar la emulsión en contacto con la membrana un tiempo tan prolongado, permitiría a ésta impregnarse del p.a. (AS); pero también, debido a esa cierta lipofilia el AS permanecería más tiempo dentro de la membrana, cediéndose más lentamente. *Bottari y col (1974)* observan algo similar al ensayar formulaciones de AS con membranas de silicona.

En las membranas MC-72h, se observa que el porcentaje de cesión del AS es mayor a través de las membranas con mayor contenido en AR (0,85g), pero la velocidad de cesión después de 90 minutos de ensayo es menor en esa membrana (0,242 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{minutos}$) que en las que tienen 0,75g de AR ($v=0,332$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{minutos}$).

- *Para estudiar la posible influencia del tiempo de contacto en la cesión de AS a través de las membranas MC, se comparan los datos de cesión de AS que se obtienen al utilizar las membranas MC (0,75g ó 0,85g de AR) mantenidas en contacto con la formulación 12 horas (MC-12h) ó 72 horas (MC-72h) (Figura 4.22).*

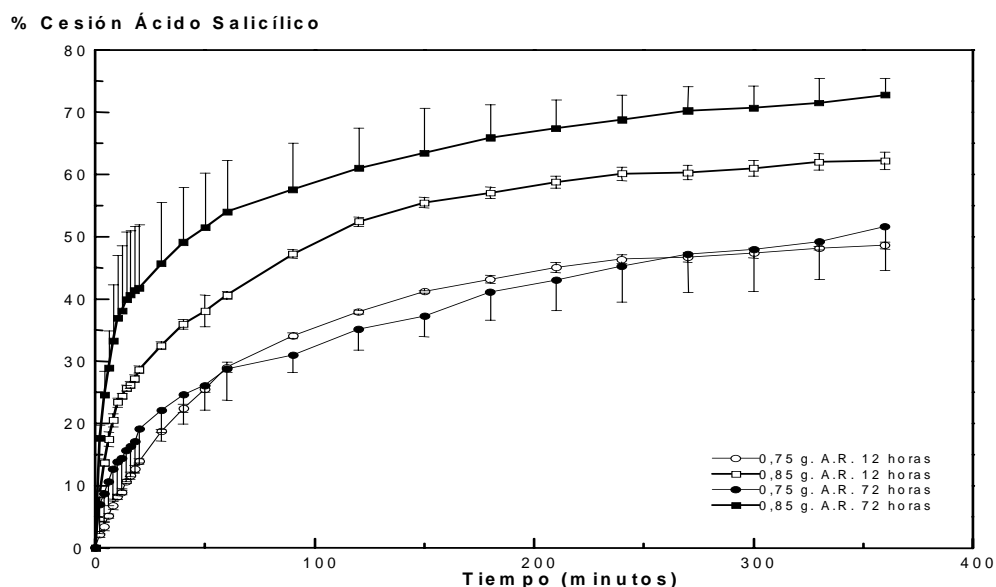


Figura 4.22 Porcentajes de AS cedidos a través de membranas tipo I (MC) conteniendo 0,75g ó 0,85g de aceite de ricino que permanecen en contacto con la formulación 12 horas ó 72 horas

La cesión de AS a través de las membranas MC de 0,75g de AR, parece ser independiente del tiempo de contacto de la membrana con la emulsión, y el resultado del

Membranas Tipo I

análisis estadístico de los datos (ANOVA) ($p > 0,05$), indica que, efectivamente, no hay diferencias, estadísticamente significativas, entre la cesión del AS a través de las membranas **MC-12h** y **MC-72h**. Luego el tiempo de contacto de la membrana con la formulación no influye en la cesión de AS a través de membranas MC con 0,75g de AR.

Sin embargo, *en las membranas MC de 0,85g de AR* sí que influye el tiempo de contacto membrana-emulsión en la cesión de AS, ya que, al realizar el análisis estadístico (ANOVA) de los datos de AS cedidos, el resultado ($p < 0,05$) nos indica que, sí existen diferencias significativas,

estadísticamente, entre los porcentajes de cesión de AS obtenidos al ensayar membranas **MC-12h** o **MC-72 h**. Luego, el tiempo de contacto membrana-emulsión influye en la cesión del AS a través de membranas MC con **0,85g de AR** en su composición; la cesión aumenta al aumentar el tiempo de contacto membrana-emulsión; así la mayor cesión de AS se consigue con la **MC-72h** (ver Tabla 4.16).

Los flujos de transferencia de AS que se establecen, en los veinte minutos iniciales de ensayo, son: 2,993(**MC-12h**) ó 2,861 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{minuto}$ (**MC-72h**) a través de membranas MC con **0,75g de AR** y 4,651 (**MC-12h**) ó 5,759 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{minuto}$ (**MC-72h**) a través de membranas MC de **0,85g de AR**.

-Por último, *para estudiar la posible influencia del tipo de humectación en la cesión del AS*, se comparan los valores de cesión de AS a través de membranas humectadas durante 12 horas con agua destilada (**MH**) o con la emulsión O/A (**MC-12 horas**) (Figura 4.23).

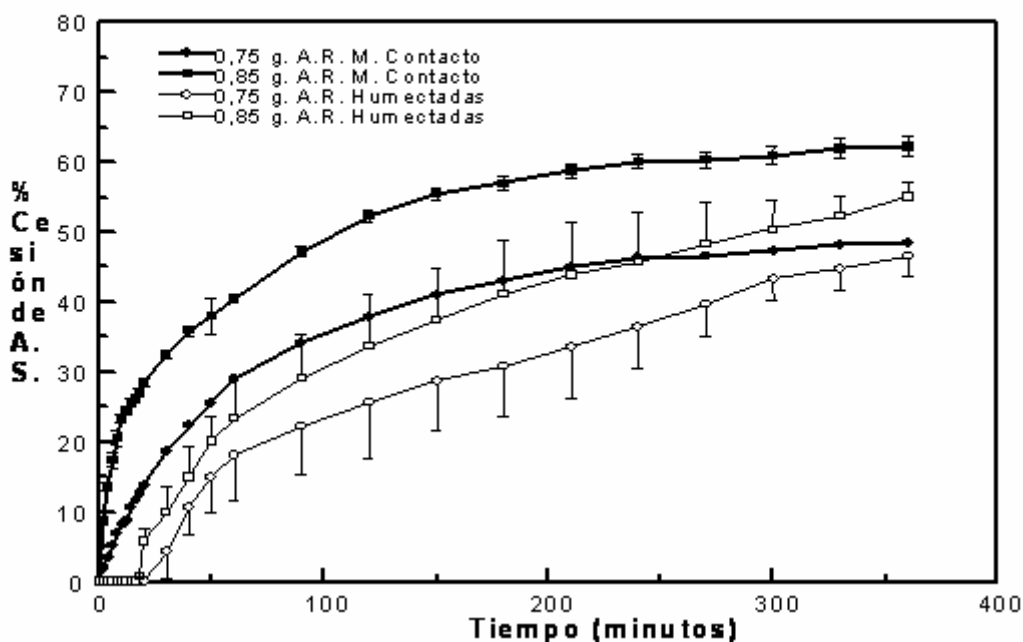


Figura 4.23 Porcentajes de AS cedidos a través de membranas tipo I conteniendo 0,75g ó 0,85g de aceite de ricino, que permanecen 12 horas Humectadas con agua destilada (MH) o en contacto con la emulsión (MC)

Al comparar los valores de cesión de AS obtenidos al utilizar las membranas de 0,75g ó 0,85g de AR humectadas 12 horas, con agua destilada (MH) o con la emulsión (MC-12h), se observa que los valores de cesión obtenidos son mayores, en todos los casos, cuando se ensayan las membranas MC-12h que cuando se emplean las membranas MH.

Los valores son 47 %AS (MH) ó 49 %AS (MC-12h) cuando se utilizan membranas que tienen 0,75g de AR en su composición y 55 %AS (MH) ó 62 %AS MC-12h) cuando la cantidad de ricino en membrana es 0,85g.

Para dilucidar si esas diferencias en los valores de cesión son estadísticamente significativas, se realiza, como en casos precedentes, el análisis estadístico de los datos de cesión. Tras la

realización del ANOVA se obtiene un valor de $p < 0,05$, que indica que sí existen diferencias, estadísticamente significativas.

Luego el tipo de humectación de la membrana, con agua destilada o emulsión O/A, sí que influye, de forma significativa, en la transferencia del AS desde fase dadora a líquido receptor. Cuando la membrana está impregnada con la emulsión, la cesión de AS es mayor que cuando esas membranas están humectadas solo con agua destilada.

Sin embargo, en la primera hora de experimentación, después del periodo de latencia que se aprecia en las membranas MH, no hay diferencias de flujo de AS a través de las membranas MH y MC-12h que contienen 0,75g de AR.; en ambos casos el valor es $2,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{minutos}$.

En la *figura 4.24*, a modo de resumen de todo lo expuesto hasta aquí, se representan, mediante diagrama de barras, los porcentajes de AS cedidos al final del ensayo ($t = 360$ minutos) a través de las distintas membranas MSH (sin humectar), MH (humectadas con agua destilada) ó MC-12h y MC-72h (en contacto con la emulsión, 12 ó 72 horas) que contienen 0,75 ó 0,85 g. de AR (ver Tabla 4.16).

Si se observan los datos de la tabla 4.16 y la figura 4.24, se aprecia que el mayor porcentaje de cesión de AS se obtiene con la membrana que contiene 0,85g de AR y que permanece en contacto con la emulsión 72 horas (MC-72h). En este caso, el mantener la membrana en contacto con la emulsión tipo O/A influye en gran medida en el porcentaje de transferencia de AS a través de esa membrana.

% Cesión de A.S.

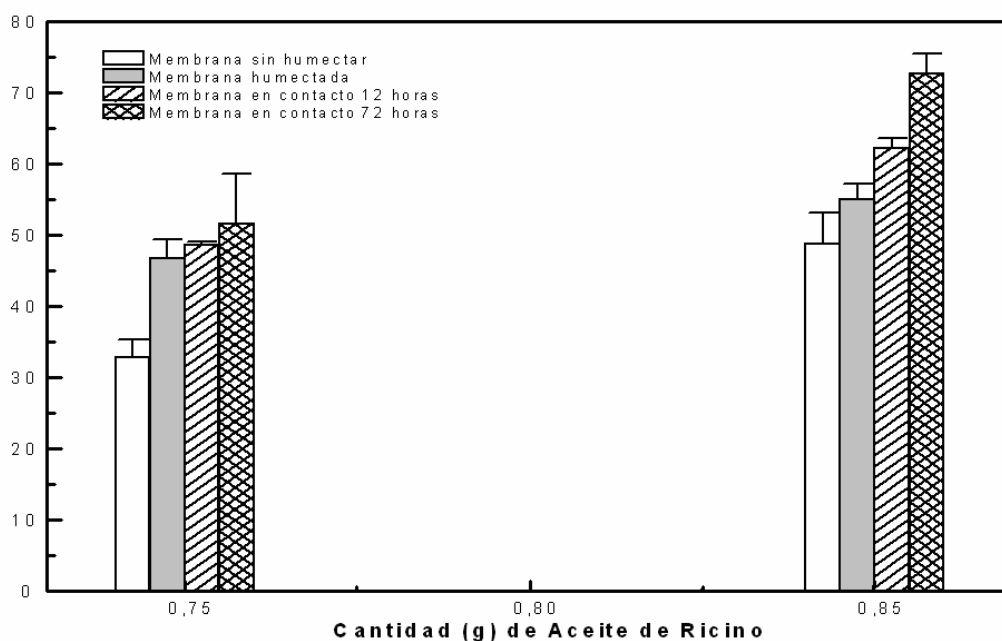


Figura 4.24 Porcentajes de AS cedidos, al cabo de 360 minutos de experimentación, a través de membranas tipo I con 0,75g ó 0,85g de AR. Membranas sin humectar, (barra blanca), humectadas con agua destilada durante 12 horas (barra gris) o en contacto con la formulación 12 horas (barra rayada) ó 72 horas (barra cuadrículada)

También en esa misma figura 4.24 se observa, que los porcentajes más bajos de cesión de AS se obtienen cuando se utilizan membranas, con 0,75g ó 0,85g de AR, recién preparadas y sin humectar. En el resto de los casos (membranas humectadas o en contacto con la emulsión durante 12 horas) se obtendrían valores de cesión de AS intermedios.

Los valores de cesión obtenidos con las distintas membranas sería:

1) *Membranas conteniendo 0,75g de AR:*

MSH (32,85%) < MH (46,16%) < MC-12 horas (48,83%) < MC-72 horas (51,90%)

2) *Membranas conteniendo 0,85g de AR:*

MSH (49,05%) < MH (55,19%) < MC-12 horas (62,41%) < MC-72 horas (73,15%).

4.6.2.- Influencia de la célula de diálisis que se emplea en los ensayos

de difusión del AS a través de membranas MSH

Los valores de cesión de AS obtenidos al utilizar la PLACA Petri como célula de difusión se representan en las *figuras 4.16 y 4.17*. El comentario de los resultados obtenidos al ensayar las membranas en este dispositivo de cesión (ver Figura 4.1) se realiza en el epígrafe 4.6.1.1 de esta memoria, por lo tanto a continuación se comentan únicamente los resultados obtenidos al utilizar como células de diálisis en los ensayos de cesión de AS a través de membranas MSH, CELDAS de FRANZ modificadas.

En la *figura 4.25* se representan los resultados de porcentajes de AS cedidos a través de las distintas membranas MSH, conteniendo 0,65g-0,75g-0,85g ó 1,00g de AR.

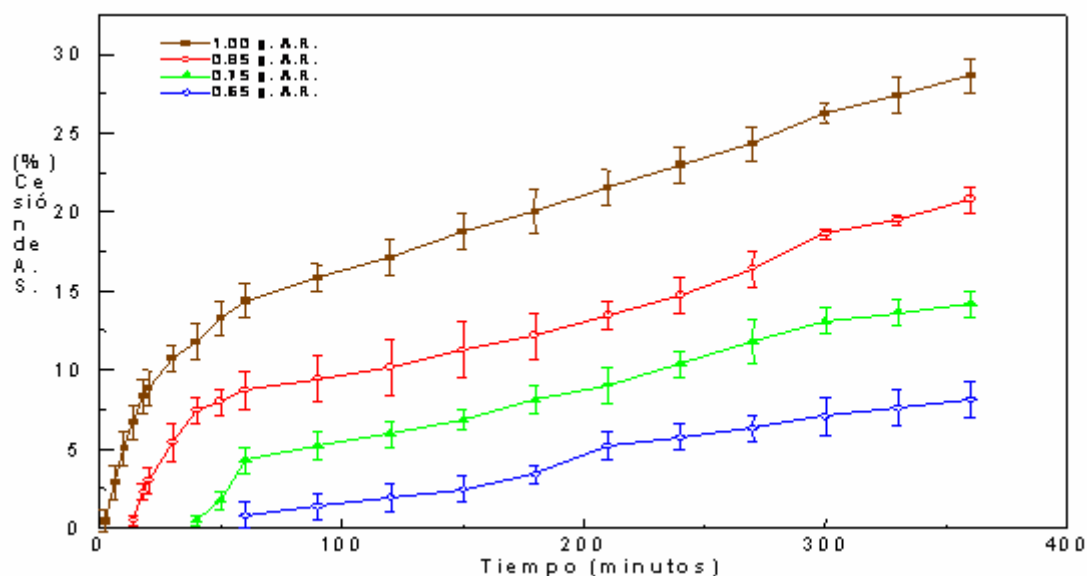


Figura 4.25 *Porcentajes de AS cedidos a fase receptora en función de la cantidad de aceite de ricino que forma parte de las membranas tipo I (MSH) al utilizar celdas de Franz modificadas como dispositivo de difusión*

Como se puede apreciar en la figura los perfiles de cesión de AS que se obtienen con esas membranas son distintos dependiendo de la cantidad de AR que lleve la membrana. Así, cuando la cantidad de AR es 0,65g el trazado es lineal, al igual que ocurre cuando se utiliza en el ensayo de cesión de AS la Placa como celda de difusión y membranas con el mismo contenido lipídico (0,65gAR), pero cuando la cantidad de AR en la membrana es mayor o igual a 0,75g de AR se obtienen trazados más o menos curvilíneos, dependiendo del contenido en AR de la membrana. Esos trazados, a diferencia de lo que ocurre al utilizar la placa, no son sigmoideos, sino que son semejantes a ramas de parábolas.

También se observa, que el tiempo de latencia que muestran estas membranas es función de su contenido en AR; el tiempo de

latencia más largo (60 minutos) lo muestra la membrana que tiene menor contenido en AR (0,65g). Ese tiempo va disminuyendo al ir incrementándose la cantidad de AR en membrana, hasta llegar a desaparecer cuando se utiliza en las **Celdas de Franz** modificadas membranas que llevan 1,00g de AR, en que la cesión de AS se produce desde el inicio del ensayo. Los restantes valores de tiempo de latencia que se necesitan para que comience a detectarse AS en la fase receptora son: 40 y 16 minutos, para membranas que contienen 0,75g ó 0,85g de AR, respectivamente.

Si se comparan esos tiempos de latencia con los que se obtienen al utilizar la **Placa** como celda de difusión se ve que son exactamente los mismos en el caso de utilizar las membranas con menor contenido en AR ($t_l = 60$ ó 40 minutos, para membranas con 0,65g ó 0,75g de AR, respectivamente); pero esos tiempos son mayores a los obtenidos con las Celdas de Franz cuando se aumenta el contenido de AR en la membrana. Así, el tiempo de latencia necesario para que se detecte AS en el líquido receptor contenido en el cristizador es casi el doble (30 minutos) cuando se usa la membrana de 0,85g de AR en la placa, ó 16 minutos cuando se emplea la membrana de 1,00g de AR, cuando con esta misma membrana no se observa periodo de latencia al utilizar las celdas de Franz.

También se observa en esa gráfica, que al incrementar la cantidad de AR. que compone la membrana se produce un aumento en el porcentaje de AS que se transfiere a través de la misma. Es decir, parece que existe una relación entre la cantidad de AR. que compone la membrana y el porcentaje de AS cedido, lo cual indicaría que la cantidad de AR que entra en la composición de la membrana es un factor influyente en

la transferencia del ácido salicílico a través de estas membranas tipo I , como ocurre en el caso de utilizar la Placa como celda de difusión.

Para determinar si la cantidad de AR influye en la cesión del AS a través de las distintas membranas MSH se realiza el análisis estadísticos (ANOVA) de los valores de cantidades de AS cedidas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a través de las cuatro membranas distintas de AR (*Figura 4.26*). De los resultados obtenidos ($p < 0,05$) se concluye que el contenido de AR de la membrana influye, de forma estadísticamente significativa, en la transferencia del AS a través de la membrana y así, a mayor cantidad de AR en la membrana mayor cesión de AS se produce. Idéntico comportamiento se observa cuando se emplea la placa en este tipo de ensayos de difusión. Por tanto, la cantidad de AR que compone la membrana sí influye en la velocidad de transferencia del AS contenido en la emulsión, independientemente del tipo de célula de difusión que se utilice..

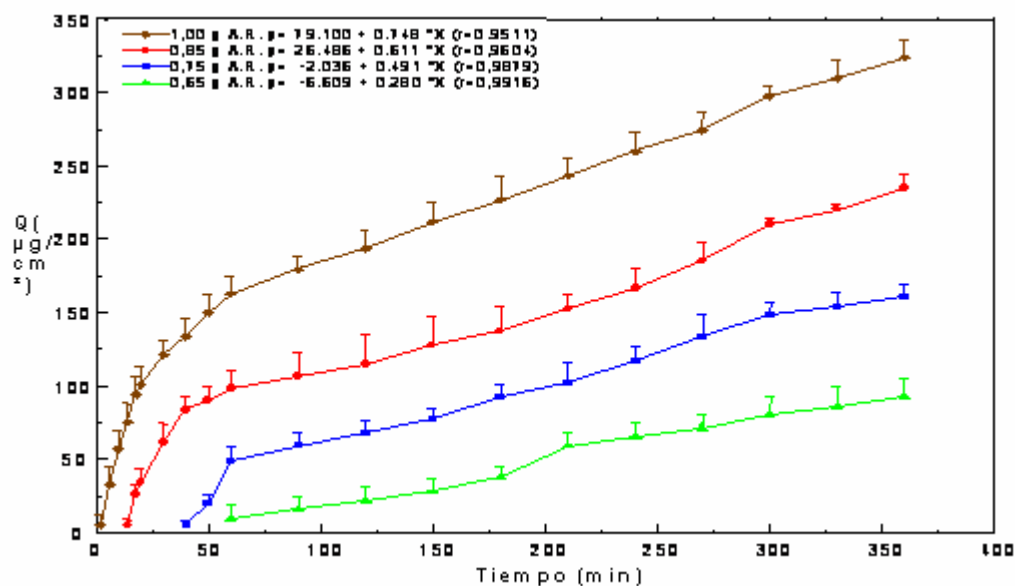


Figura 4.26 Cantidades ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS cedidas a través de las distintas membranas tipo I (MSH) de aceite de ricino utilizando en el dispositivo de ensayo celdas de Franz modificadas

Con objeto de dilucidar si el **dispositivo** utilizado en los ensayos de difusión de AS, *su superficie*, influye en la cesión del AS a través de las MSH se realiza el análisis estadístico de los datos de cantidades de AS, normalizadas por la superficie ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$),

que se obtienen al utilizar en los ensayos de cesión la placa o las celdas de Franz modificadas.

Al realizar en ANOVA correspondiente, se obtiene como resultado que $p > 0,05$, lo que indica que no existen diferencias, estadísticamente significativas, en las cantidades de AS que se transfieren a través de las membranas de AR tipo I (MSH). Por lo tanto, el tipo de dispositivo de difusión que se utilice para realizar los ensayos de cesión de AS a través de estas membranas (**Placa o celda de Franz**) no influye en los resultados de cesión que se obtienen.

Por último, en la *figura 4.27*, se representan las cantidades de AS cedidas través de las distintas membranas tipo I (MSH) frente a la raíz cuadrada del tiempo (Tratamiento cinético de Higuchi).

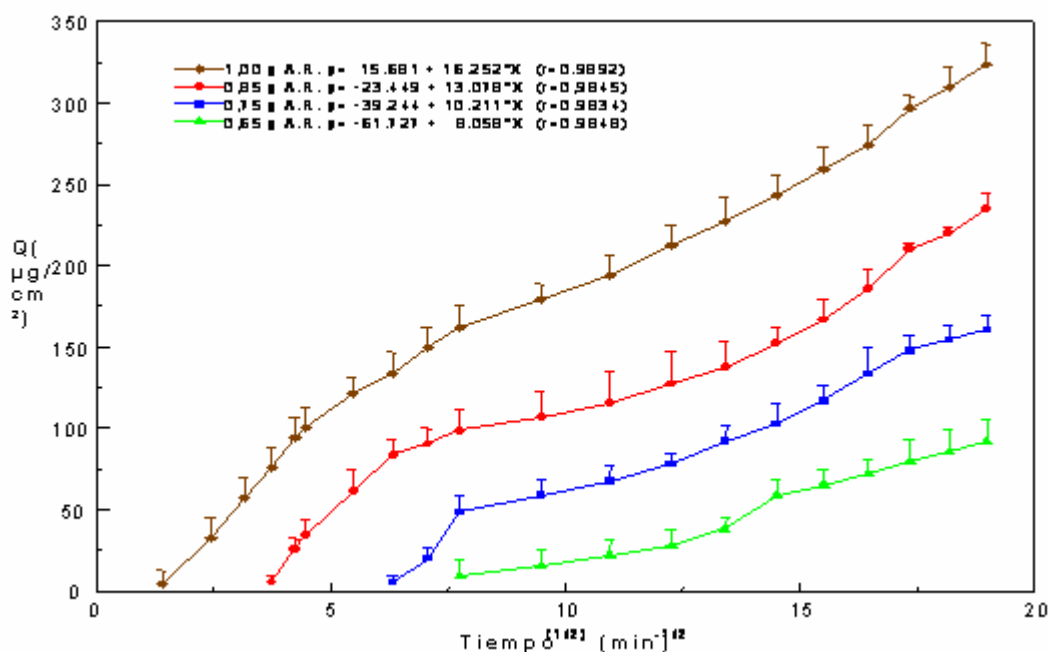


Figura 4.27 Cantidades de AS cedidos a fase receptora $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ versus raíz cuadrada del tiempo (Cinética de Higuchi) en función de la cantidad de aceite de ricino que contienen las membranas tipo I que se utilizan en los ensayos de cesión con celdas de Franz modificadas

Al comparar las ecuaciones que aparecen en las figuras 4.26 y 4.27, que corresponden a los ajustes de los datos experimentales a trazados rectilíneos, se observa que solamente las membranas con un contenido en aceite de ricino mayor a 0,75g de AR

se ajustan mejor a la cinética de Higuchi, ya que los coeficientes de correlación obtenidos en este caso son mejores que los que se tenían con el tratamiento de datos precedente (*ver figura 4.26*). Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando el contenido en AR de la membrana es inferior a esa cantidad (membranas de 0,65 ó 0,75g

de AR) ya que los coeficientes de correlación que se obtienen son mejores en el caso precedente, como se puede ver en las ecuaciones que aparecen en la *Figura 4.26*.

Sin embargo, a partir de las expresiones matemáticas que aparecen recogidas en la *Figura 4.27* se podría tratar de establecer una relación entre el flujo de cesión y la cantidad de AR que contiene la membrana. Esa relación es (ecuación 4.2):

$$\text{Flujo } (\mu\text{g}/\text{cm}^2)/\text{min}^{1/2} = - 0,2365 + 15,15 \text{ cantidad de AR } (r = 0,9903) \text{ (Ec. 4.2)}$$

Bottari y col.(1974), en sus estudios de cesión de AS a través de membranas de silicona utilizan celdas de 5 cm de diámetro e investigan el efecto de la concentración de AS (0,5-5,0 % p/v) en la liberación *in vitro* desde una serie de formulaciones de AS, entre las cuales hay emulsiones A/O y O/A elaboradas con lanolina y derivados. La liberación de AS se produce de tal forma que establecen una relación lineal entre la velocidad de liberación de AS y la concentración de fármaco en las formulaciones cuando el fármaco esta completamente disuelto en los vehículos. Además, obtienen trazados lineales para la cantidad de AS liberado desde la fase acuosa vs la raíz cuadrada del tiempo.

Los trazados que obtienen muestran un período de latencia de 20 minutos. En nuestro caso nuestros períodos de latencia están comprendidos entre 16 y 60 minutos, dependiendo del tipo de membrana. La baja difusión del AS en la membrana es debida a la amplia rigidez de las unidades poliméricas que están formando la capa de silicona y a la adsorción del AS en la silicona de la membrana. Estos autores encuentran que, la liberación es más rápida desde las emulsiones si se comparan con la bases anhidras.

Takahashi y col.,(1991) realizan experimentos con diclofenaco sódico en diferentes vehículos utilizando celdas de Franz de área =1,77 cm², y membranas de celofán para separar la

Membranas Tipo I

fase dadora de la aceptora (tampón pH 7,2). Al representar los datos obtenidos de cantidad de diclofenaco cedido después de 12 horas de ensayo versus tiempo, se obtienen perfiles similares a los nuestros, también para obtener los valores de

flujos de diclofenaco (1,3-112,6 nmol/cm²/h) utilizan tratamientos similares a los recogidos en esta memoria. En sus estudios obtienen períodos de latencia (2,5-4,9 h) dependiendo del tipo de vehículo; entre ellos, utilizan parafina líquida.

Rolland y col. (1992) en sus investigaciones emplean membranas de silicona no porosa Silastic® (130 μm de espesor) y un derivado del ácido naftoico, el CD27, como p.a. Ensayan distintas formulaciones del p.a., entre ellas, emulsiones aniónicas y no iónicas O/A. Cuando representan cantidad de fármaco liberada μg/cm² versus tiempo encuentran que la relación es lineal ($r^2=0,997$, pero también encuentran una buena relación entre esas cantidades y la raíz cuadrada del tiempo); los períodos de latencia que obtienen están comprendidos entre 6,35 y 11,07 min^{0,5}.

Capítulo 5 ESTUDIOS DE CESION “*in Vitro*” A TRAVES DE MEMBRANAS TIPO II

Las membranas que se utilizan en este capítulo para estudiar la transferencia del ácido salicílico en los ensayos de cesión “*in vitro*” son las que denominamos TIPO II.

Como ya se vio en el capítulo 3, estas membranas se obtienen a partir de las membranas tipo I añadiéndoles distintos porcentajes de ácido salicílico (AS), de tal forma que al final tenemos seis membranas distintas tipo II que contienen: 0.15%, 0.25%, 0.35%, 0.50%, 0.75% ó 1% de AS en su composición.

5.1. Ensayos de cesión a través de membranas TIPO II

Para llevar a cabo los ensayos de cesión del AS a través de las membranas tipo II se utiliza el dispositivo descrito en el apartado 4.2.1 y representado en la *figura 4.1* cuando la célula de difusión empleada en el ensayo es la tapa de la PLACA petri.

Cuando para hacer los ensayos de cesión se utilizan celdas de Franz modificadas el dispositivo que se emplea es el que se describe en el apartado 4.4.2 que está representado en la *figura 4.2*.

Membranas Tipo II

Cuando se utiliza la PLACA como celda de diálisis y 300 ml de solución tampón de fosfatos de pH 7,0 en la fase receptora, las condiciones experimentales que se emplean en el ensayo, son idénticas a las recogidas en el epígrafe 4.2.2, la única diferencia es la fase dadora que ahora, en lugar de ser la emulsión O/A, es la propia membrana tipo II.

Por lo tanto en todos los ensayos donde se empleen membranas tipo II, independientemente de la celda de difusión utilizada, y del volumen de fase receptora empleado, es la propia membrana, con la concentración en AS característica de cada una de ellas, la que sirve como fase dadora en esos ensayos de transferencia del AS a partir de estas membranas.

Cuando en el dispositivo de ensayo, en lugar de utilizar la placa, empleamos las celdas de Franz modificadas las condiciones experimentales que se mantienen constantes son las que aparecen descritas en el apartado 4.4.2

Por último, la técnica analítica empleada es la consignada en el apartado 4.2.3.

Una vez expuestas las condiciones experimentales que se utilizan en los ensayos de transferencia del AS a partir de membranas tipo II se estudia. como se veía en el apartado 4.4 del capítulo anterior (Capítulo 4: membranas tipo I), la posible influencia que pueda tener en la transferencia del AS, a partir de esas membranas tipo II, la modificación de:

- a) La célula de diálisis (la superficie) que se emplea en los ensayos de cesión del AS y
- b) El volumen de solución tampón de pH 7,0 que constituye la fase receptora

5.2. Influencia de la célula de diálisis que se emplea en los ensayos de cesión del AS a partir de las membranas tipo II

A continuación, al igual que se hace en los estudio de cesión de AS empleando membranas tipo I (Capítulo 4), se investiga en este capítulo si la célula de diálisis, concretamente, la superficie que presente esta celda, influye en la cesión del AS contenido en las membranas tipo II.

Membranas Tipo II

Por ello, a continuación se estudia la posible influencia de la superficie de la celda de difusión en la cesión del AS contenido en las distintas membranas tipo II.

Las celdas de difusión empleadas son las mismas que se utilizaban en los ensayos de cesión a través de membranas tipo I (ver apartado 4.4). Es decir:

- a) PLACA: con superficie de cesión = $58,77 \text{ cm}^2$
- b) CELDAS de FRANZ modificadas con superficies de cesión = $1,77 \text{ cm}^2$

Las membranas tipo II que se utilizan en estos ensayos se colocan, en la placa o en las celdas de Franz modificadas, siguiendo el mismo protocolo que se utiliza al ensayar las denominadas membranas **MSH** (membranas tipo I); es decir, se utilizan recién preparadas y retiradas del **soporte** de mercurio, sin hacerles ningún tratamiento.

Sin embargo, hay que destacar que cuando se utiliza la placa como celda de difusión, al tener una superficie tan grande, para no introducir variables incontrolables, es muy importante que la zona central de la membrana sea la que se ponga en contacto con el líquido de la fase receptora, por ser esa zona la de mayor homogeneidad en contenido de AS, como se ha podido constatar en las observaciones realizadas por microscopia electrónica de barrido, donde se ve que los bordes de la membrana no son adecuados para estos ensayos, ya que no tienen una distribución homogénea en AS. Por lo tanto, se eliminan estos bordes antes de comenzar el ensayo.

Cuando se utilizan las celdas de Franz modificadas esta variabilidad no es tan importante, porque al tener una superficie de cesión tan pequeña, la homogeneidad de las muestras ensayadas es mayor que en el caso anterior.

5.3. Influencia del volumen de la fase receptora en los ensayos de cesión de AS a partir de membranas tipo II

Otro de los posibles factores que pueden influir en la cesión del AS a partir de las membranas tipo II es el volumen de fase receptora, que puede ser un factor crucial cuando en el dispositivo de ensayo se utiliza como celda de difusión la placa, dada la

Membranas Tipo II

gran superficie de contacto que tiene, en este caso, la membrana con el líquido receptor.

Para llevar a cabo el estudio de la influencia del volumen de líquido receptor en la cesión del AS a partir de membranas tipo II, se emplea el dispositivo descrito en el apartado 4.2.1 y representado en la *figura 4.1*.

Las condiciones experimentales para estos ensayos son:

- 1.- Célula de difusión: PLACA
- 2.- Superficie de cesión constante ($S = 58,77 \text{ cm}^2$)
- 3.- Fase dadora: Los distintos tipos de membranas tipo II
- 4.- Fase receptora: Solución tampón de fosfatos de pH 7,0.
 - A) VOLUMEN = 300ml
 - B) VOLUMEN = 600 ml

Los parámetros 1,2 y 3 se mantienen constante a lo largo de todas las experiencias, siendo la variable el volumen de fase receptora que se puede utilizar en cada caso.

5.4. RESULTADOS

Los ensayos se realizan, al menos, por triplicado y los resultados obtenidos se agrupan en tablas en las que aparecen, en las distintas columnas:

- Tiempo de toma de muestra expresado en minutos. ($t=$ desde 2 a 360 minutos).
- Cantidad de ácido salicílico que atraviesa la membrana y pasa a la fase receptora, expresada como Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
- Valor medio y desviación estándar de esos valores de Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). O bien,
- Tiempo de toma de muestra, expresado en minutos.
- Porcentaje de AS (%) cedido desde las membranas tipo II
- Valor medio y desviación estándar (D.E.) del valor medio

5.4.1. Resultados obtenidos en los ensayos descritos en el apartado 5.2 (Influencia de la célula de diálisis que se emplea en los ensayos de cesión)

- a) Membranas tipo II ensayadas en Célula de diálisis: **Placa**. Tablas 5.1-5.6
Figuras 5.1-5.6. (Resultados expresados en cantidades: $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$)
- b) Membranas tipo II ensayadas en Célula de diálisis: **Placa**. Tablas 5.7-5.12

Membranas Tipo II

Figuras 5.7-5.12 (Resultados expresados en porcentajes cedidos de AS(%))

- c) Membranas tipo II ensayadas en **Celdas de Franz** modificadas:
Tablas 5.13-5.18 *Figuras 5.13-5.18*

5.4.2. Resultados obtenidos en los ensayos descritos en el apartado 5.3 **(Influencia del volumen de la Fase receptora en la cesión del AS)**

- a) Membranas tipo II ensayadas en Célula de diálisis: **Placa** y con un volumen de **Fase receptora, V = 300 ml**. Tablas 5.1-5.6 *Figuras 5.1-5.6*
- b) Membranas tipo II ensayadas en Célula de diálisis: **Placa** y con un volumen de **Fase receptora, V = 600 ml**. Tablas 5.19 -5.22. *Figuras 5.19-5.22*

5.4.3. TRATAMIENTO DE DATOS

El tratamiento de los datos experimentales de cesión de AS desde las membranas tipo II, se realiza del mismo modo que se hace en el capítulo 4 con los obtenidos al utilizar las membranas Tipo I en los ensayos de cesión correspondientes, aplicando el análisis estadístico a los mismos.

Por tanto, como se recoge en el capítulo 4, se utiliza el factor de similitud, f_2 , como análisis de comparación estadística de los perfiles de liberación “in vitro” que se obtienen al ensayar las distintas membranas Tipo II de AS, para determinar si los datos son homogéneos o no. Además de realizar este análisis estadístico de los porcentajes de cesión de AS, también se realiza con los resultados obtenidos, el análisis estadístico ANOVA y t- Student cuando se necesita.

Los resultados obtenidos, para cada condición ensayada, se representan en gráficas; en el eje de ordenadas, se representan las cantidades acumuladas de fármaco cedido (AS) en las distintas condiciones de ensayo, expresadas en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, y en abscisas, los tiempos de toma de muestra expresados en minutos.

 Membranas Tipo II

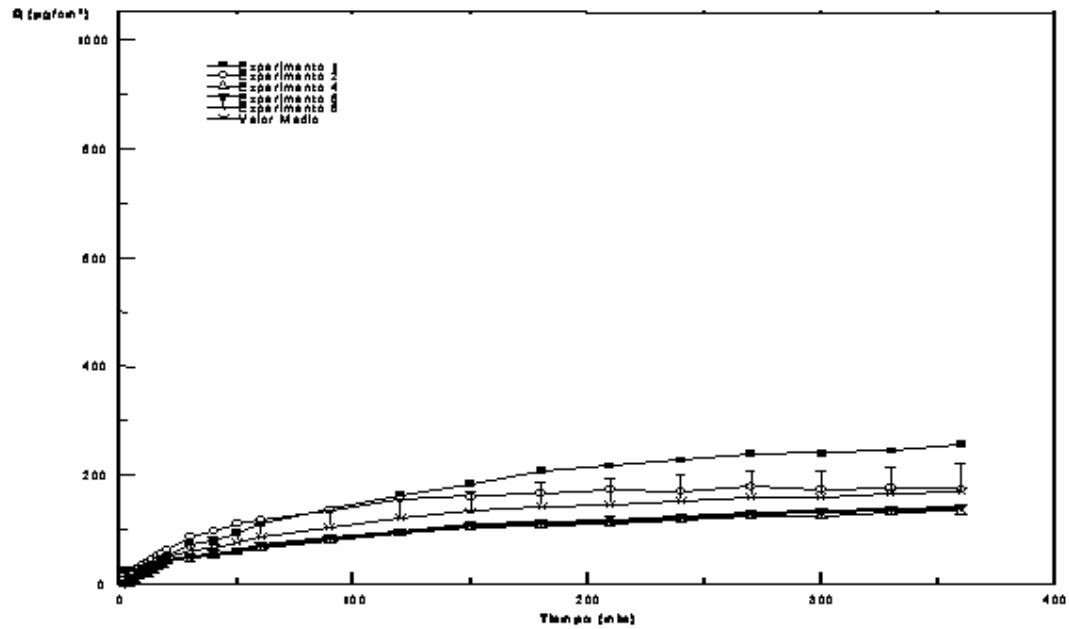
Tabla 5.1.- Cantidades de AS cedidas al compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.15% de AS.

<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>Q (µg/cm²) 1</i>	<i>Q (µg/cm²) 2</i>	<i>Q (µg/cm²) 4</i>	<i>Q (µg/cm²) 5</i>	<i>Q (µg/cm²) 6</i>	<i>Media ± DE</i>	
2	23,40	0,21	0	1,26	0,00	4,97	± 10,31
4	24,36	12,81	0	3,36	1,26	8,36	± 10,26
6	26,36	22,18	6,48	10,67	8,58	14,85	± 8,85
8	27,31	28,35	13,76	17,94	15,85	20,64	± 6,74
10	33,43	35,52	15,78	19,95	17,87	24,51	± 9,25
12	39,52	38,49	17,79	21,95	19,87	27,53	± 10,59
14	40,40	45,57	24,94	29,10	27,02	33,40	± 9,05
16	45,38	52,59	28,95	33,11	31,03	38,21	± 10,26
18	47,25	54,44	34,98	39,14	37,06	42,57	± 8,10
20	52,17	61,37	40,97	45,12	43,04	48,53	± 8,32
30	74,19	84,40	46,84	51,03	48,92	61,07	± 17,08
40	76,82	96,09	51,64	55,86	53,74	66,83	± 19,23
50	93,46	110,67	57,38	61,67	59,51	76,54	± 24,13
60	109,91	117,10	66,06	70,43	68,22	86,34	± 24,97
90	137,57	135,96	80,32	84,95	82,59	104,28	± 29,71
120	162,74	154,48	92,35	97,31	94,76	120,33	± 35,11
150	183,54	160,98	104,15	109,50	106,73	132,98	± 36,78
180	207,76	166,39	108,02	113,71	110,75	141,33	± 44,30
210	217,21	171,68	111,80	117,86	114,69	146,65	± 46,56
240	227,39	169,25	117,38	123,87	120,46	151,67	± 47,34
270	238,27	178,15	123,77	130,76	127,07	159,60	± 49,26
300	239,64	172,85	125,39	132,78	128,86	159,91	± 48,52
330	245,52	175,96	129,71	137,61	133,40	164,44	± 48,98
360	257,57	174,39	133,02	141,42	136,93	168,67	± 52,34

DE: Desviación Estándar

Membranas Tipo II

Figura 5.1.-Cantidades cedidas $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ de AS a Fase receptora ($V=300\text{ml}$) utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.15% de AS



 Membranas Tipo II

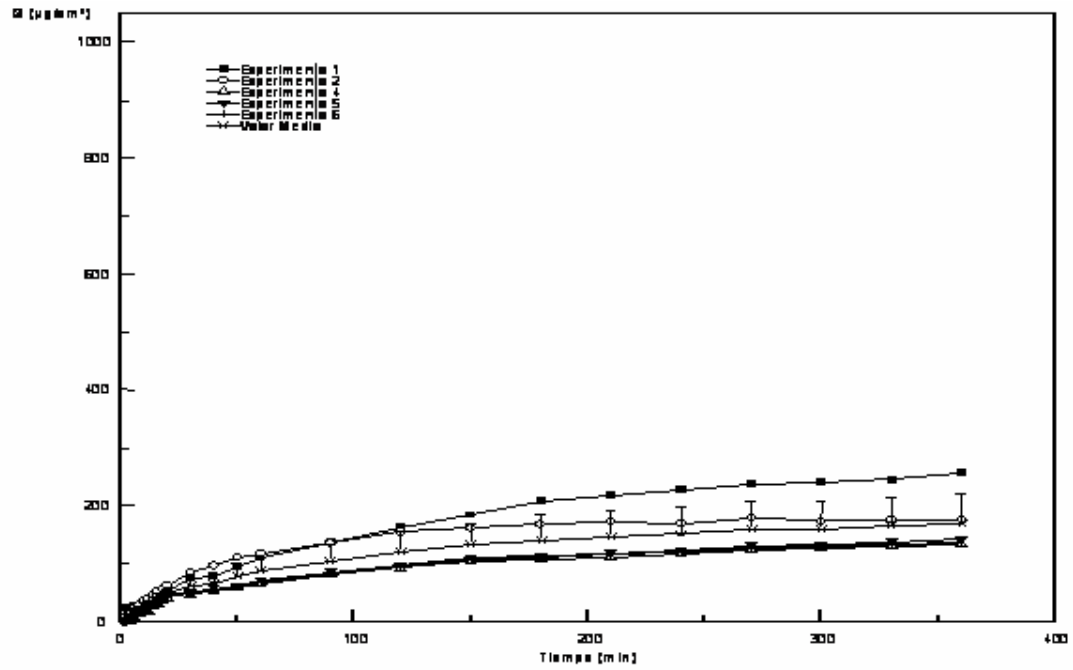
Tabla 5.2.- Cantidades de AS cedidas al compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.25% de AS.

<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>Q (µg/cm²) 1</i>	<i>Q (µg/cm²) 2</i>	<i>Q (µg/cm²) 3</i>	<i>Q (µg/cm²) 4</i>	<i>Media ± DE</i>
2	9,69	0,00	0,00	8,64	4,58 ± 5,31
4	15,96	0,00	6,51	21,22	10,92 ± 9,49
6	25,33	4,39	24,29	30,58	31,51 ± 11,47
8	37,76	16,90	28,38	43,00	31,51 ± 11,47
10	55,30	34,51	43,88	52,22	46,48 ± 9,32
12	59,25	38,53	55,13	56,18	52,27 ± 9,33
14	74,53	53,88	68,36	64,26	65,26 ± 8,68
16	83,52	62,95	79,44	68,15	73,52 ± 9,59
18	97,57	77,07	92,50	73,05	85,05 ± 11,83
20	110,50	90,08	100,35	77,91	94,71 ± 13,96
30	116,15	96,83	109,13	101,07	105,79 ± 8,59
40	131,88	111,62	123,92	122,03	122,36 ± 8,34
50	138,39	118,21	125,46	138,79	130,21 ± 10,12
60	146,85	126,76	139,06	152,41	141,27 ± 11,11
90	162,02	142,04	168,46	178,94	162,86 ± 15,54
120	181,97	162,10	185,61	195,27	181,24 ± 13,93
150	189,84	170,08	200,61	201,50	190,51 ± 14,61
180	199,57	179,93	197,68	209,66	196,71 ± 12,36
210	203,32	183,78	202,64	216,76	201,63 ± 13,56
240	209,92	190,50	205,58	213,96	204,99 ± 10,25
270	216,44	197,13	211,40	228,83	213,45 ± 13,11
300	219,98	200,79	213,29	217,18	212,81 ± 8,47
330	230,16	211,07	216,11	221,20	219,63 ± 8,14
360	230,71	211,73	216,97	219,37	219,69 ± 8,00

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.2.-Cantidades cedidas $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ de AS a Fase receptora ($V=300\text{ml}$) utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.25% de AS



 Membranas Tipo II

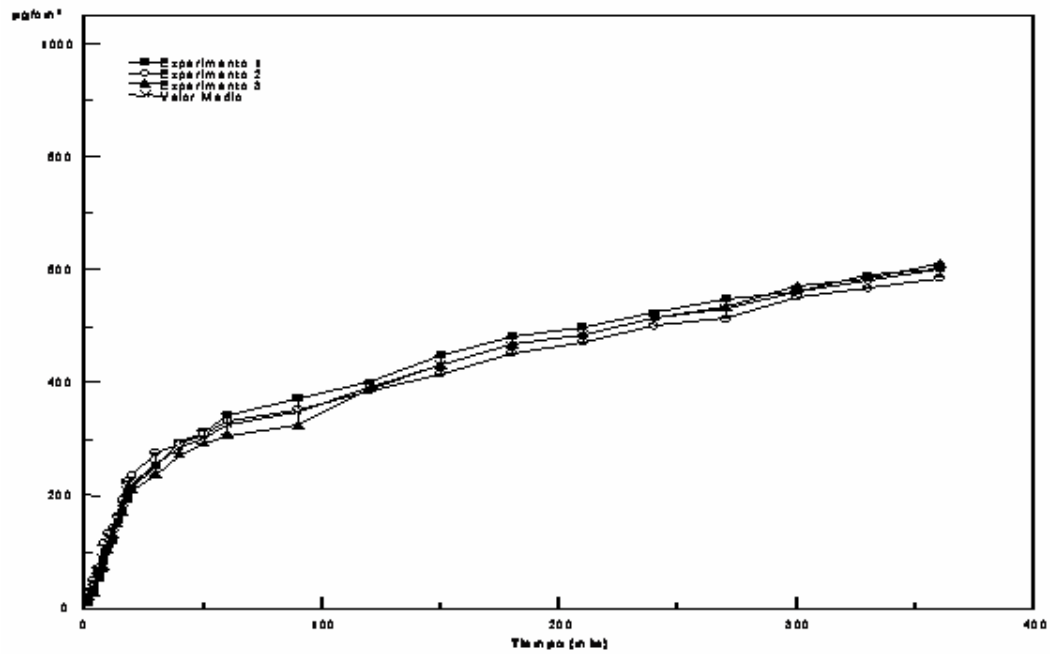
Tabla 5.3.- Cantidades cedidas en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.35% de AS.

<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>Q (µg/cm²) 1</i>	<i>Q (µg/cm²) 2</i>	<i>Q (µg/cm²) 3</i>	<i>Media ± DE</i>
2	8,31	30,92	20,53	19,92 ± 11,32
4	32,76	50,76	25,15	36,22 ± 13,15
6	53,76	71,06	66,45	63,75 ± 8,96
8	82,13	114,90	71,06	89,36 ± 22,79
10	112,59	132,43	103,13	116,05 ± 14,95
12	120,89	142,58	130,58	131,35 ± 10,86
14	156,65	164,27	149,62	156,85 ± 7,33
16	169,80	191,03	169,46	176,76 ± 12,36
18	193,57	225,18	203,95	207,57 ± 16,11
20	212,49	233,94	208,56	218,33 ± 13,66
30	252,63	275,01	236,02	254,55 ± 19,57
40	294,39	290,70	272,70	285,93 ± 11,60
50	311,46	308,92	291,16	303,85 ± 11,06
60	342,38	331,07	305,00	326,15 ± 19,17
90	372,83	351,37	323,46	349,22 ± 24,76
120	400,52	385,75	387,83	391,37 ± 7,99
150	448,74	414,36	429,36	430,82 ± 17,23
180	481,04	451,74	466,27	466,35 ± 14,65
210	496,49	472,04	484,50	484,34 ± 12,23
240	523,26	501,11	514,72	513,03 ± 11,17
270	547,02	513,57	533,18	531,25 ± 16,81
300	560,17	551,86	569,40	560,48 ± 8,77
330	590,39	566,17	585,09	580,55 ± 12,73
360	602,39	585,32	610,23	599,31 ± 12,74

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.3.-Cantidades cedidas $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ de AS a Fase receptora ($V=300\text{ml}$) utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.35% de AS



 Membranas Tipo II

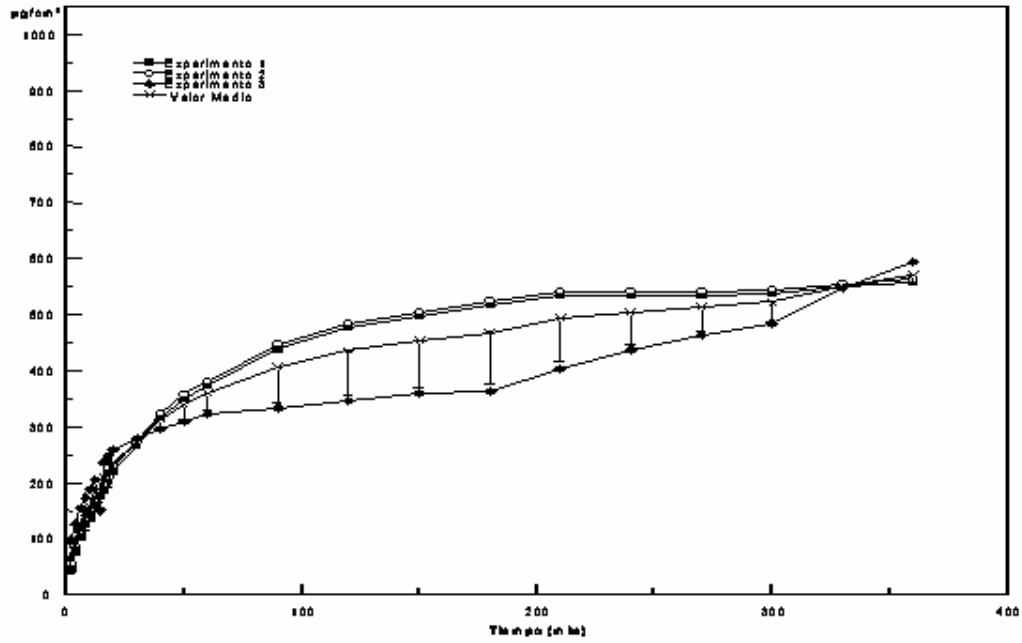
Tabla 5.4.- Cantidades de AS cedidas al compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.50% de AS.

<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>Q (µg/cm²) 1</i>	<i>Q (µg/cm²) 2</i>	<i>Q (µg/cm²) 3</i>	<i>Media ± DE</i>
2	45,46	53,98	95,09	64,84 ± 26,54
4	78,09	86,36	127,32	97,25 ± 26,36
6	104,83	113,28	154,08	124,06 ± 26,34
8	124,35	132,70	173,36	143,47 ± 26,22
10	140,66	148,87	189,37	159,63 ± 26,07
12	156,71	164,92	205,26	175,63 ± 25,99
14	174,62	182,92	149,62	169,05 ± 17,34
16	188,53	196,68	236,68	207,3 ± 25,78
18	201,10	209,30	248,12	219,51 ± 25,12
20	220,89	228,98	259,47	236,44 ± 20,35
30	265,81	273,80	278,65	272,75 ± 6,48
40	315,28	323,32	296,64	311,74 ± 13,69
50	349,51	357,28	310,42	339,07 ± 25,11
60	373,04	380,90	324,07	359,34 ± 30,79
90	438,03	445,70	333,94	405,89 ± 62,43
120	476,53	483,94	345,63	435,37 ± 77,8
150	495,79	502,95	359,11	452,61 ± 81,06
180	517,72	524,66	363,58	468,65 ± 91,06
210	533,49	540,23	403,87	492,53 ± 76,86
240	534,56	541,03	437,81	504,47 ± 57,82
270	534,56	540,81	463,60	512,99 ± 42,89
300	537,50	543,44	484,24	521,73 ± 32,6
330	548,74	554,59	548,01	550,45 ± 3,61
360	558,10	563,68	593,98	571,92 ± 19,31

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.4.-Cantidades cedidas $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ de AS a Fase receptora ($V=300\text{ml}$) utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.50% de AS



 Membranas Tipo II

Tabla 5.5.- Cantidades de AS cedidas al compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.75% de AS.

<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>Q (µg/cm²) 1</i>	<i>Q (µg/cm²) 2</i>	<i>Q (µg/cm²) 3</i>	<i>Media ± DE</i>
2	3,61	1,20	2,31	2,38 ± 1,20
4	4,81	3,61	10,83	6,42 ± 3,87
6	43,72	14,86	24,50	27,69 ± 14,69
8	73,81	44,93	54,55	57,76 ± 14,71
10	95,47	66,62	76,21	79,43 ± 14,69
12	144,81	115,92	125,55	128,76 ± 14,71
14	168,87	140,00	150,00	152,96 ± 14,66
16	186,50	157,64	167,32	170,49 ± 14,69
18	209,39	180,51	190,13	193,34 ± 14,71
20	222,60	193,75	203,40	206,58 ± 14,69
30	250,30	221,42	231,05	234,26 ± 14,71
40	275,00	245,90	255,52	258,81 ± 14,83
50	312,47	283,59	293,22	296,43 ± 14,71
60	377,56	348,60	358,20	361,45 ± 14,75
90	472,52	443,64	453,27	456,48 ± 14,71
120	557,00	528,00	538,01	541,00 ± 14,73
150	576,81	547,90	557,56	560,76 ± 14,72
180	624,95	596,07	605,70	608,90 ± 14,71
210	706,00	677,10	686,52	689,87 ± 14,74
240	719,21	690,33	699,96	703,17 ± 14,71
270	760,21	731,30	740,87	744,13 ± 14,73
300	776,57	747,69	757,32	760,53 ± 14,71
330	830,31	801,50	811,10	814,30 ± 14,67
360	863,62	834,74	844,36	847,57 ± 14,71

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

 Membranas Tipo II

Figura 5.5.-Cantidades cedidas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS a Fase receptora ($V=300\text{ml}$) utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.75% de AS

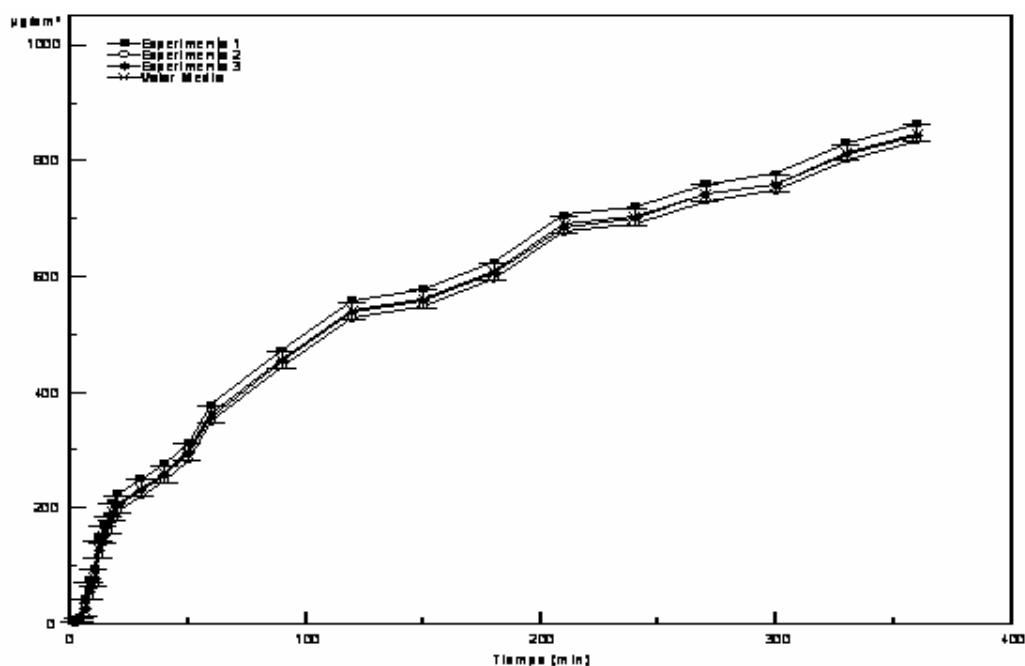


Tabla 5.6.- Cantidades cedidas en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 1.00% de AS.

<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 1</i>	<i>Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 2</i>	<i>Media \pm DE</i>
2	226,91	223,73	225,32 \pm 2,25
4	260,82	257,63	259,23 \pm 2,26
6	309,17	305,96	307,56 \pm 2,27
8	341,52	338,29	339,91 \pm 2,29
10	367,41	364,15	365,78 \pm 2,30
12	388,96	392,93	390,95 \pm 2,81
14	419,66	415,31	417,48 \pm 3,08
16	432,63	434,43	433,53 \pm 1,27
18	455,77	461,61	458,69 \pm 4,13
20	475,67	459,98	467,82 \pm 11,09
30	550,40	559,94	555,17 \pm 6,75
40	611,38	644,91	628,15 \pm 23,70
50	706,32	690,82	698,57 \pm 10,96
60	748,14	768,52	758,33 \pm 14,41
90	859,78	853,76	856,77 \pm 4,26
120	920,54	913,22	916,88 \pm 5,17
150	966,85	958,17	962,51 \pm 6,13
180	992,92	982,91	987,92 \pm 7,08
210	1002,95	991,66	997,30 \pm 7,98
240	1001,04	988,56	994,80 \pm 8,83
270	1036,41	1000,97	1018,69 \pm 25,06
300	1020,65	1001,61	1011,13 \pm 13,46
330	1014,71	1003,15	1008,93 \pm 8,17
360	1001,03	1015,14	1008,08 \pm 9,98

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

 Membranas Tipo II

Figura 5.6.-Cantidades cedidas $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ de AS a Fase receptora ($V=300\text{ml}$) utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 1,00% de AS

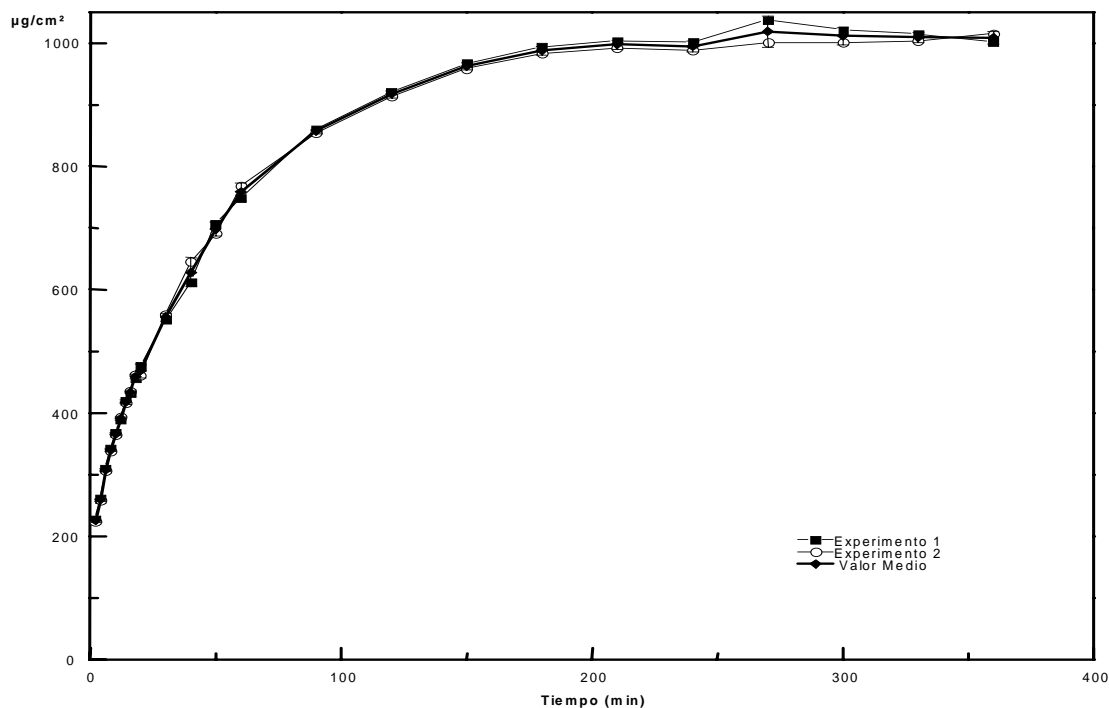


Tabla 5.7 Porcentajes de AS cedidos al compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.15% de AS.

<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>Porcentaje Cedido 1</i>	<i>Porcentaje Cedido 2</i>	<i>Porcentaje Cedido 4</i>	<i>Porcentaje Cedido 5</i>	<i>Porcentaje Cedido 6</i>	<i>Media ± DE</i>
2	2,92	0,03	0,00	0,27	0,00	0,64 ± 1,28
4	3,04	1,60	0,00	0,73	0,27	1,13 ± 1,23
6	3,29	2,76	1,41	2,32	1,87	2,33 ± 0,74
8	3,40	3,53	2,99	3,90	3,45	3,46 ± 0,33
10	4,17	4,43	3,43	4,34	3,89	4,05 ± 0,40
12	4,93	4,80	3,87	4,78	4,32	4,54 ± 0,44
14	5,04	5,68	5,43	6,33	5,88	5,67 ± 0,49
16	5,66	6,56	6,30	7,20	6,75	6,49 ± 0,57
18	5,89	6,79	7,61	8,52	8,06	7,37 ± 1,05
20	6,50	7,65	8,91	9,82	9,36	8,45 ± 1,36
30	9,25	10,52	10,19	11,10	10,64	10,34 ± 0,69
40	9,58	11,98	11,24	12,16	11,69	11,33 ± 1,04
50	11,65	13,79	12,49	13,42	12,95	12,86 ± 0,84
60	13,70	14,60	14,37	15,32	14,84	14,57 ± 0,60
90	17,15	16,95	17,48	18,48	17,97	17,60 ± 0,63
120	20,28	19,26	20,09	21,17	20,62	20,29 ± 0,71
150	22,88	20,07	22,66	23,83	23,22	22,53 ± 1,45
180	25,90	20,74	23,50	24,74	24,10	23,80 ± 1,93
210	27,07	21,40	24,33	25,64	24,95	24,68 ± 2,10
240	28,34	21,10	25,54	26,95	26,21	25,63 ± 2,74
270	29,70	22,20	26,93	28,45	27,65	26,99 ± 2,86
300	29,87	21,55	27,28	28,89	28,04	27,13 ± 3,27
330	30,60	21,93	28,22	29,94	29,03	27,95 ± 3,48
360	32,11	21,74	28,94	30,77	29,79	28,67 ± 4,05

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.7.-Porcentajes cedidos (%) de AS a Fase receptora (V=300ml) utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,15% de AS

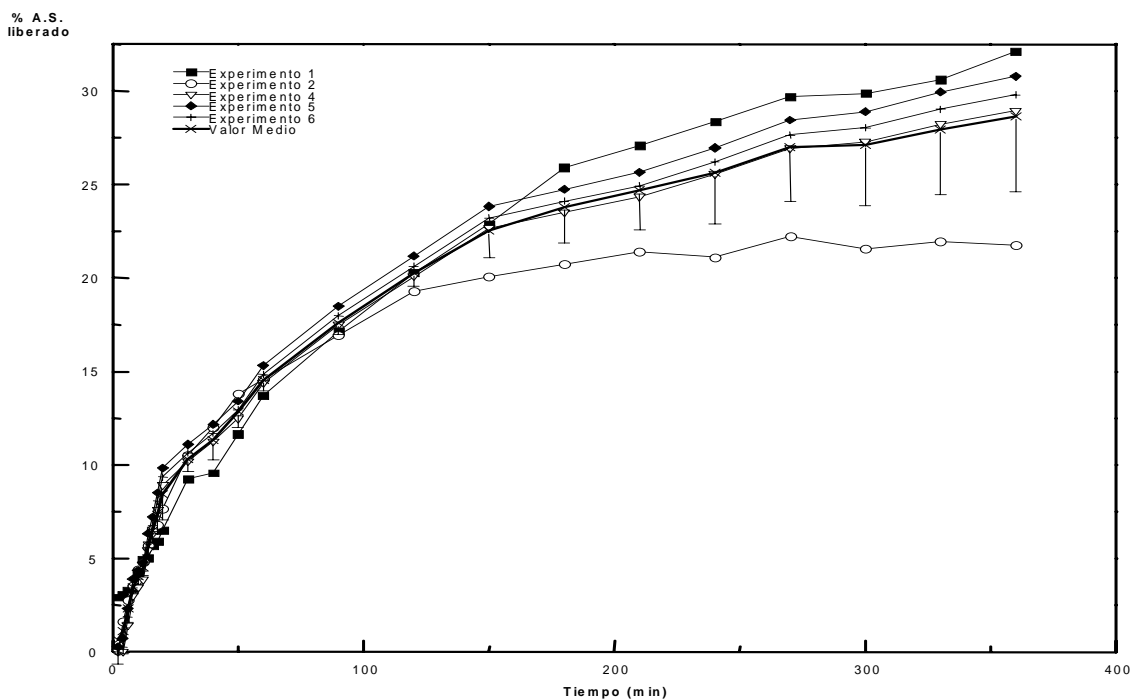


Tabla 5.8 Porcentajes de AS cedidos al compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.25% de AS.

Tiempo (minutos)	Porcentaje Cedido 1	Porcentaje Cedido 2	Porcentaje Cedido 3	Porcentaje Cedido 4	Media \pm DE
2	1,21	0,00	0,00	1,08	0,30 \pm 0,70
4	1,99	0,00	0,81	2,65	0,70 \pm 1,00
6	3,16	0,55	3,03	3,81	1,68 \pm 1,47
8	4,71	2,11	3,54	5,36	2,59 \pm 1,30
10	6,89	4,30	5,47	6,51	4,17 \pm 1,30
12	7,39	4,80	6,87	7,00	4,77 \pm 1,37
14	9,29	6,72	8,52	8,01	6,13 \pm 1,32
16	10,41	7,85	9,90	8,50	7,04 \pm 1,36
18	12,16	9,61	11,53	9,11	8,32 \pm 1,33
20	13,77	11,23	12,51	9,71	9,38 \pm 1,27
30	14,48	12,07	13,60	12,60	10,04 \pm 1,22
40	16,44	13,91	15,45	15,21	11,45 \pm 1,27
50	17,25	14,73	15,64	17,30	11,91 \pm 1,27
60	18,30	15,80	17,33	19,00	12,86 \pm 1,26
90	20,19	17,70	21,00	22,30	14,72 \pm 1,72
120	22,68	20,21	23,13	24,34	16,51 \pm 1,58
150	23,66	21,20	25,00	25,12	17,47 \pm 1,93
180	24,88	22,43	24,64	26,13	17,99 \pm 1,35
210	25,34	22,91	25,26	27,02	18,38 \pm 1,38
240	26,17	23,75	25,62	26,67	18,88 \pm 1,27
270	26,98	24,57	26,35	28,52	19,47 \pm 1,25
300	27,42	25,03	26,59	27,07	19,76 \pm 1,21
330	28,69	26,31	26,94	27,57	20,48 \pm 1,23
360	28,76	26,39	27,04	27,34	20,55 \pm 1,22

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.8.-Porcentajes cedidos (%) de AS a Fase receptora (V=300ml) utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,25% de AS

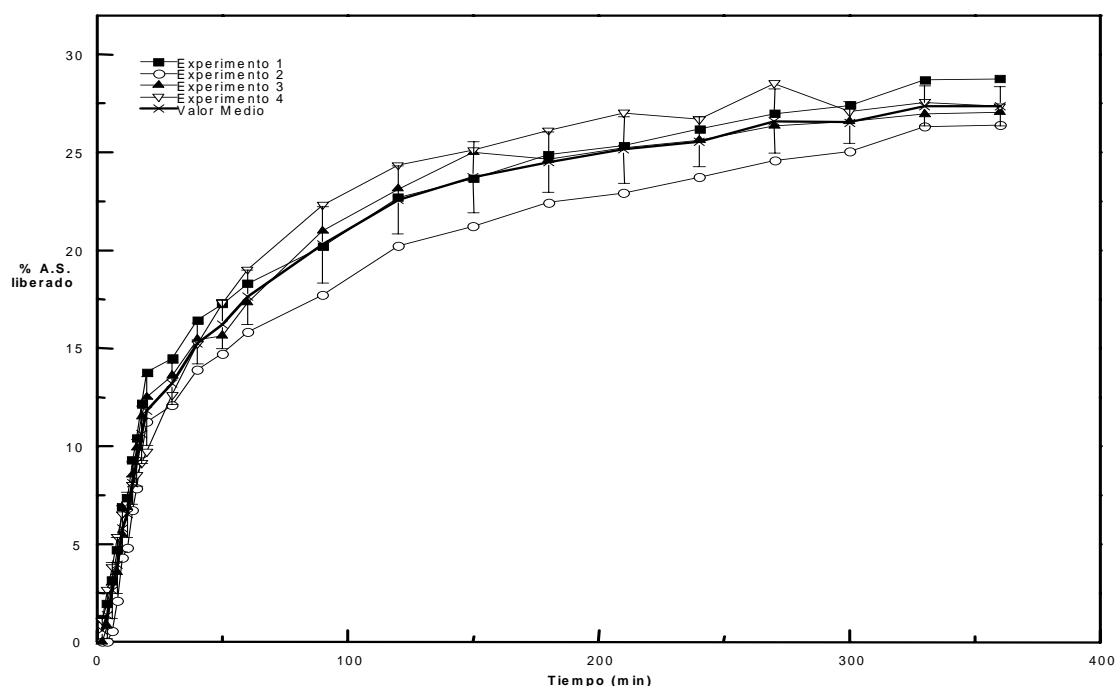


Tabla 5.9.- Porcentajes de AS cedidos al compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.35% de AS.

Tiempo (minutos)	Porcentaje Cedido 1	Porcentaje Cedido 2	Porcentaje Cedido 3	Media ± DE		
2	0,36	1,34	0,89	0,86	±	0,49
4	1,42	2,20	1,09	1,57	±	0,57
6	2,33	3,08	2,88	2,76	±	0,39
8	3,56	4,98	3,08	3,87	±	0,99
10	4,88	5,74	4,47	5,03	±	0,65
12	5,24	6,18	5,66	5,69	±	0,47
14	6,79	7,12	6,49	6,80	±	0,32
16	7,36	8,28	7,35	7,66	±	0,54
18	8,39	9,76	8,84	9,00	±	0,70
20	9,21	10,14	9,04	9,46	±	0,59
30	10,95	11,92	10,23	11,03	±	0,85
40	12,76	12,60	11,82	12,39	±	0,50
50	13,50	13,39	12,62	13,17	±	0,48
60	14,84	14,35	13,22	14,14	±	0,83
90	16,16	15,23	14,02	15,14	±	1,07
120	17,36	16,72	16,81	16,96	±	0,35
150	19,45	17,96	18,61	18,67	±	0,75
180	20,85	19,58	20,21	20,21	±	0,64
210	21,52	20,46	21,00	20,99	±	0,53
240	22,68	21,72	22,31	22,24	±	0,48
270	23,71	22,26	23,11	23,03	±	0,73
300	24,28	23,92	24,68	24,29	±	0,38
330	25,59	24,54	25,36	25,16	±	0,55
360	26,11	25,37	26,45	25,98	±	0,55

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.9.-Porcentajes cedidos (%) de AS a Fase receptora (V=300ml) utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,35% de AS

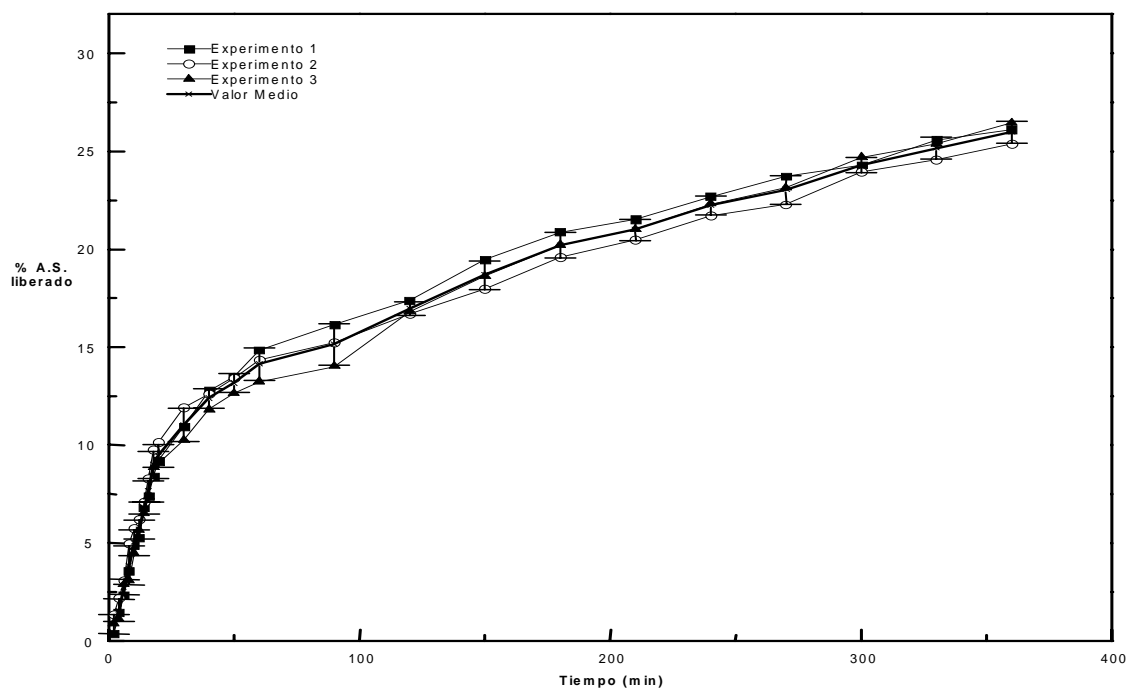


Tabla 5.10.-Porcentajes de AS cedidos al compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.50% de AS.

Tiempo (minutos)	Porcentaje Cedido 1	Porcentaje Cedido 2	Porcentaje Cedido 3	Media ± DE
2	1,70	2,02	3,56	2,42 ± 0,99
4	2,92	3,23	4,76	3,64 ± 0,99
6	3,92	4,24	5,76	4,64 ± 0,98
8	4,65	4,96	6,48	5,37 ± 0,98
10	5,26	5,57	7,08	5,97 ± 0,98
12	5,86	6,17	7,68	6,57 ± 0,97
14	6,53	6,84	5,59	6,32 ± 0,65
16	7,05	7,35	8,85	7,75 ± 0,96
18	7,52	7,83	9,28	8,21 ± 0,94
20	8,26	8,56	9,70	8,84 ± 0,76
30	9,94	10,24	10,42	10,20 ± 0,24
40	11,79	12,09	11,09	11,66 ± 0,51
50	13,07	13,36	11,61	12,68 ± 0,94
60	13,95	14,24	12,12	13,44 ± 1,15
90	16,38	16,67	12,49	15,18 ± 2,33
120	17,82	18,10	12,92	16,28 ± 2,91
150	18,54	18,81	13,43	16,93 ± 3,03
180	19,36	19,62	13,60	17,53 ± 3,41
210	19,95	20,20	15,10	18,42 ± 2,87
240	19,99	20,23	16,37	18,86 ± 2,16
270	19,99	20,22	17,34	19,18 ± 1,60
300	20,10	20,32	18,11	19,51 ± 1,22
330	20,52	20,74	20,49	20,58 ± 0,13
360	20,87	21,08	22,21	21,39 ± 0,72

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

 Membranas Tipo II

Figura 5.10.-Porcentajes cedidos (%) de AS a Fase receptora (V=300ml) utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,50% de AS

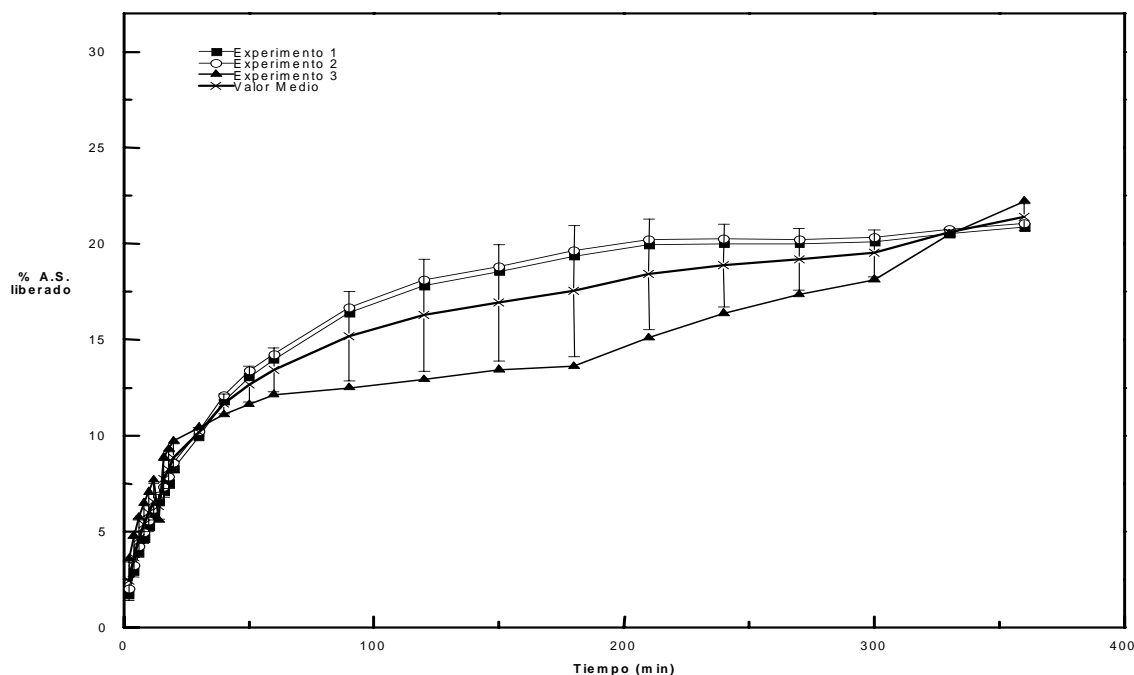


Tabla 5.11.-Porcentajes de AS cedidos al compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.75% de AS.

Tiempo (minutos)	Porcentaje Cedido 1	Porcentaje Cedido 2	Porcentaje Cedido 3	Media ± DE		
2	0,09	0,03	0,06	0,06	±	0,03
4	0,12	0,09	0,27	0,16	±	0,10
6	1,09	0,37	0,61	0,69	±	0,37
8	1,84	1,12	1,36	1,44	±	0,37
10	2,41	1,66	1,90	1,99	±	0,38
12	3,61	2,89	3,13	3,21	±	0,37
14	4,21	3,49	3,73	3,81	±	0,40
16	4,65	3,93	4,17	4,25	±	0,37
18	5,20	4,50	4,74	4,81	±	0,36
20	5,55	4,83	5,07	5,15	±	0,37
30	6,24	5,52	5,76	5,84	±	0,37
40	6,91	6,13	6,37	6,47	±	0,40
50	7,79	7,07	7,31	7,39	±	0,37
60	9,41	8,70	8,93	9,01	±	0,36
90	11,78	11,06	11,30	11,38	±	0,37
120	13,89	13,17	13,41	13,49	±	0,38
150	14,38	13,71	13,90	14,00	±	0,35
180	15,58	14,86	15,10	15,18	±	0,42
210	17,60	16,88	17,12	17,20	±	0,37
240	17,90	17,21	17,45	17,52	±	0,35
270	19,00	18,23	18,47	18,57	±	0,39
300	19,36	18,64	18,88	18,96	±	0,37
330	20,70	19,98	19,22	19,97	±	0,74
360	21,53	20,81	20,19	20,84	±	0,67

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

 Membranas Tipo II

Figura 5.11.-Porcentajes cedidos (%) de AS a Fase receptora (V=300ml) utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,75% de AS

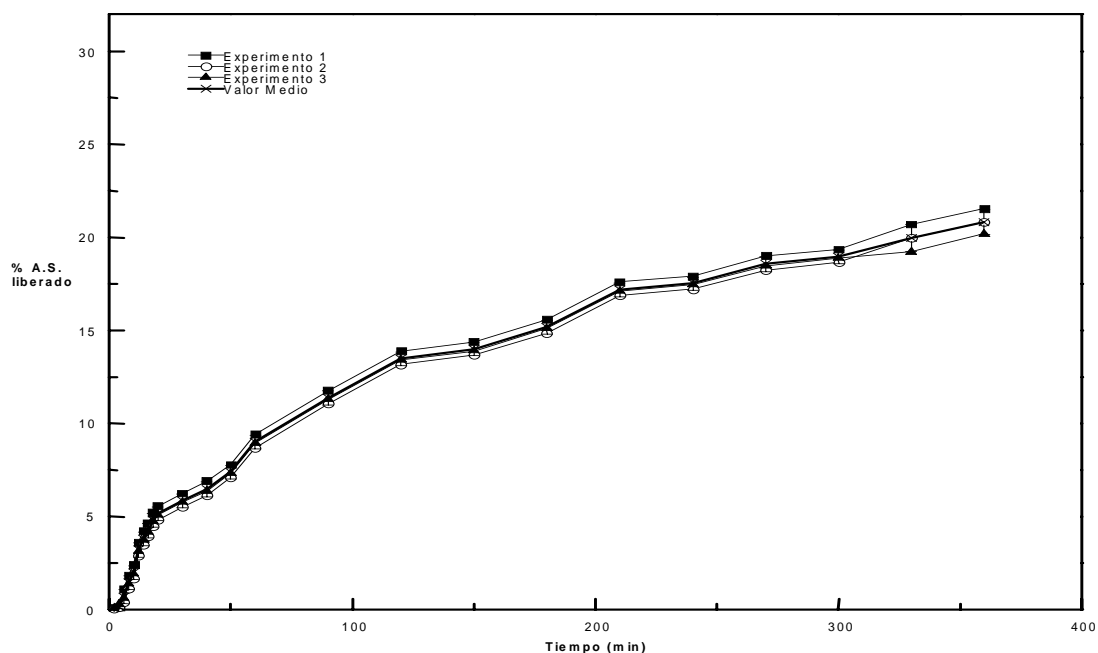


Tabla 5.12.-Porcentajes de AS cedidos al compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 1.00% de AS.

Tiempo (minutos)	Porcentaje Cedido 1	Porcentaje Cedido 2	Media ± DE		
2	4,24	4,18	4,21	±	0,04
4	4,88	4,82	4,85	±	0,04
6	5,78	5,72	5,75	±	0,04
8	6,39	6,32	6,36	±	0,04
10	6,87	6,81	6,84	±	0,04
12	7,27	7,36	7,32	±	0,06
14	7,85	7,78	7,81	±	0,05
16	8,09	8,13	8,11	±	0,03
18	8,52	8,64	8,58	±	0,08
20	8,89	9,43	9,16	±	0,38
30	10,29	10,47	10,38	±	0,13
40	11,43	12,06	11,75	±	0,44
50	13,21	12,92	13,06	±	0,20
60	13,99	14,37	14,18	±	0,27
90	16,08	15,96	16,02	±	0,08
120	17,21	17,07	17,14	±	0,10
150	18,08	17,91	18,00	±	0,11
180	18,56	18,38	18,47	±	0,13
210	18,75	18,54	18,65	±	0,15
240	18,72	18,48	18,60	±	0,17
270	19,38	18,72	19,05	±	0,47
300	19,08	18,73	18,90	±	0,25
330	18,97	18,76	18,86	±	0,15
360	18,72	18,98	18,85	±	0,19

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.12.-Porcentajes cedidos (%) de AS a Fase receptora (V=300ml) utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 1,00% de AS

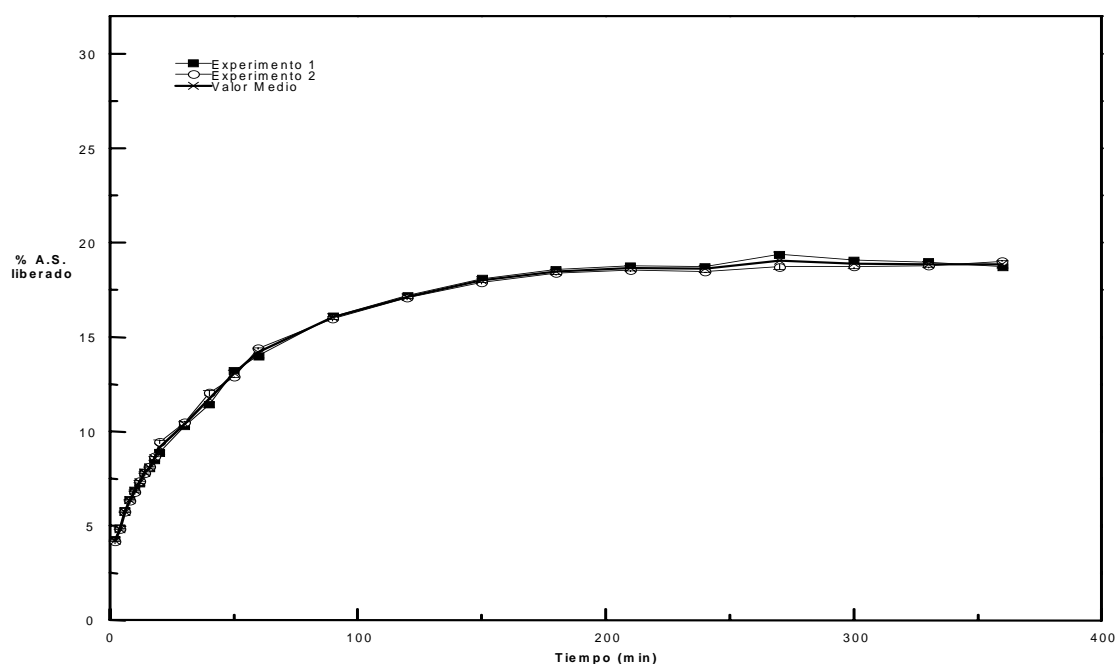


Tabla 5.13.- Cantidades de AS ($Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$) cedidas al compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.15% de AS utilizando Celdas de Franz Modificadas.

Tiempo (minutos)	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 1	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 2	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 3	Media \pm DE
2	41,590	41,590	41,590	41,59 \pm 0,00
4	41,590	41,590	41,590	41,59 \pm 0,00
6	41,590	47,564	47,564	45,57 \pm 3,45
8	47,564	53,539	47,564	49,56 \pm 3,50
10	47,564	53,539	47,564	49,56 \pm 3,46
12	47,564	53,539	53,539	51,55 \pm 3,47
14	47,564	53,539	53,539	51,55 \pm 3,45
16	53,539	59,513	59,513	57,52 \pm 3,40
18	53,539	59,513	65,487	59,51 \pm 5,97
20	53,539	59,513	71,461	61,50 \pm 9,13
30	59,513	65,487	71,461	65,49 \pm 5,97
40	65,487	71,461	83,410	73,45 \pm 9,13
50	77,436	83,410	101,333	87,39 \pm 12,40
60	83,410	89,384	101,333	91,38 \pm 9,13
90	101,333	107,307	113,281	107,31 \pm 5,97
120	119,255	125,230	143,152	129,21 \pm 12,44
150	137,178	143,152	155,101	145,14 \pm 9,13
180	155,101	161,075	167,049	161,08 \pm 5,97
210	173,024	178,998	190,946	180,99 \pm 9,13
240	190,946	196,921	208,869	198,91 \pm 9,13
250	202,895	208,869	220,818	210,86 \pm 9,00
300	208,869	214,843	226,792	216,83 \pm 9,2
330	220,818	226,792	232,766	226,79 \pm 5,97
360	226,792	232,766	238,741	232,77 \pm 6,00

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.13.-Cantidades cedidas ($Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS a Fase receptora utilizando Celdas de Franz como células de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,15% de AS

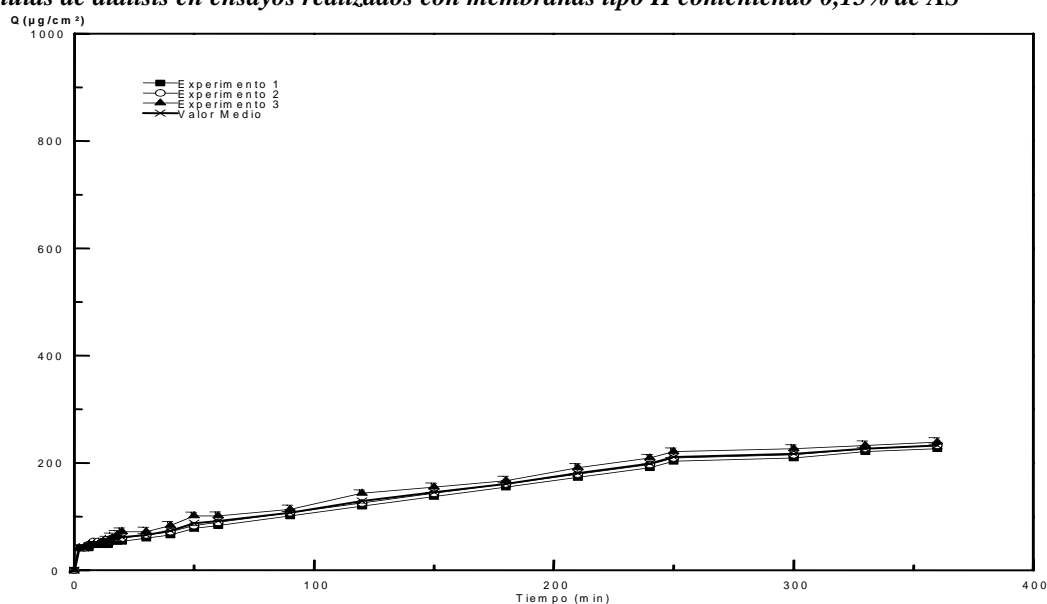


Tabla 5.14.- Cantidades de AS ($Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$) cedidas al compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.25% de AS utilizando Celdas de Franz Modificadas.

Tiempo (minutos)	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 1	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 2	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 3	Media \pm DE
2	41,590	41,590	47,564	43,58 \pm 3,45
4	47,564	47,564	53,539	49,56 \pm 3,50
6	47,564	53,539	53,539	51,55 \pm 3,40
8	53,539	59,513	65,487	59,51 \pm 5,97
10	59,513	59,513	71,461	63,50 \pm 6,90
12	65,487	65,487	71,461	67,48 \pm 3,30
14	71,461	65,487	77,436	71,46 \pm 5,97
16	77,436	83,410	77,436	79,43 \pm 3,45
18	83,410	89,384	83,410	85,40 \pm 3,50
20	89,384	101,333	83,410	91,38 \pm 9,15
30	95,358	113,281	89,384	99,34 \pm 12,44
40	113,281	119,255	107,307	113,28 \pm 5,97
50	125,230	137,178	131,204	131,20 \pm 6,00
60	143,152	155,101	143,152	147,14 \pm 6,90
90	178,998	196,921	167,049	180,99 \pm 15,03
120	208,869	214,843	214,843	212,85 \pm 3,45
150	232,766	244,715	226,792	234,76 \pm 9,13
180	256,663	274,586	244,715	258,65 \pm 15,00
210	280,560	286,535	268,612	278,57 \pm 9,20
240	292,509	298,483	274,586	288,53 \pm 12,44
250	310,432	322,380	304,457	312,42 \pm 9,12
300	328,354	334,329	328,354	330,35 \pm 3,45
330	346,277	358,226	340,303	348,27 \pm 9,13
360	364,200	370,174	358,226	364,20 \pm 5,97

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.14.-Cantidades cedidas ($Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS a Fase receptora utilizando Celdas de Franz como células de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,25% de AS

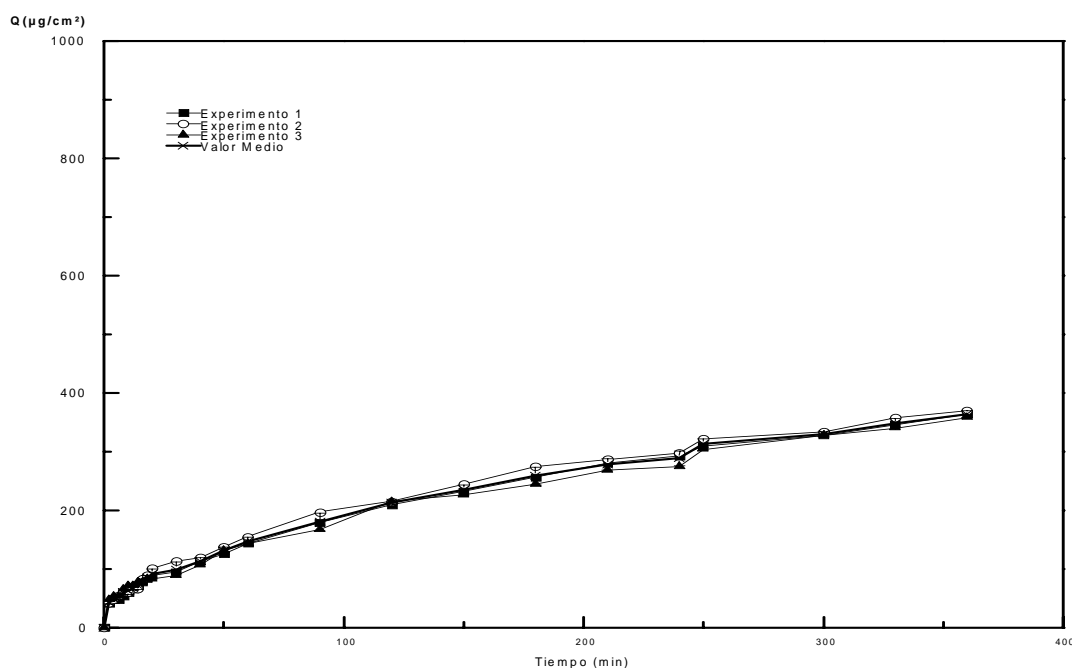


Tabla 5.15.- Cantidades de AS ($Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$) cedidas al compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.35% de AS utilizando Celdas de Franz Modificadas.

Tiempo (minutos)	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 1	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 2	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 3	Media \pm DE
2	47,564	53,539	41,590	47,56 \pm 5,97
4	53,539	59,513	47,564	53,54 \pm 6,01
6	53,539	59,513	47,564	53,54 \pm 5,90
8	59,513	65,487	53,539	59,51 \pm 6,00
10	65,487	71,461	59,513	65,49 \pm 5,98
12	71,461	77,436	59,513	69,47 \pm 9,13
14	77,436	83,410	71,461	77,44 \pm 6,01
16	83,410	89,384	77,436	83,41 \pm 5,98
18	89,384	95,358	77,436	87,39 \pm 9,15
20	95,358	101,333	89,384	95,36 \pm 5,96
30	125,230	131,204	125,230	127,22 \pm 3,40
40	149,127	155,101	137,178	147,14 \pm 9,12
50	173,024	178,998	155,101	169,04 \pm 12,44
60	190,946	196,921	184,972	190,95 \pm 5,95
90	238,741	244,715	226,792	236,75 \pm 9,18
120	280,560	286,535	262,638	276,58 \pm 12,44
150	316,406	322,380	310,432	316,41 \pm 5,97
180	346,277	352,251	352,251	350,26 \pm 3,46
210	376,148	382,123	364,200	374,16 \pm 9,10
240	400,045	406,020	376,148	394,07 \pm 15,81
250	423,942	429,917	417,968	423,94 \pm 5,98
300	447,840	453,814	435,891	445,85 \pm 9,13
330	465,762	471,737	465,762	467,75 \pm 3,45
360	483,685	489,659	477,711	483,69 \pm 5,97

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.15.-Cantidades cedidas ($Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS a Fase receptora utilizando Celdas de Franz como células de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,35% de AS.

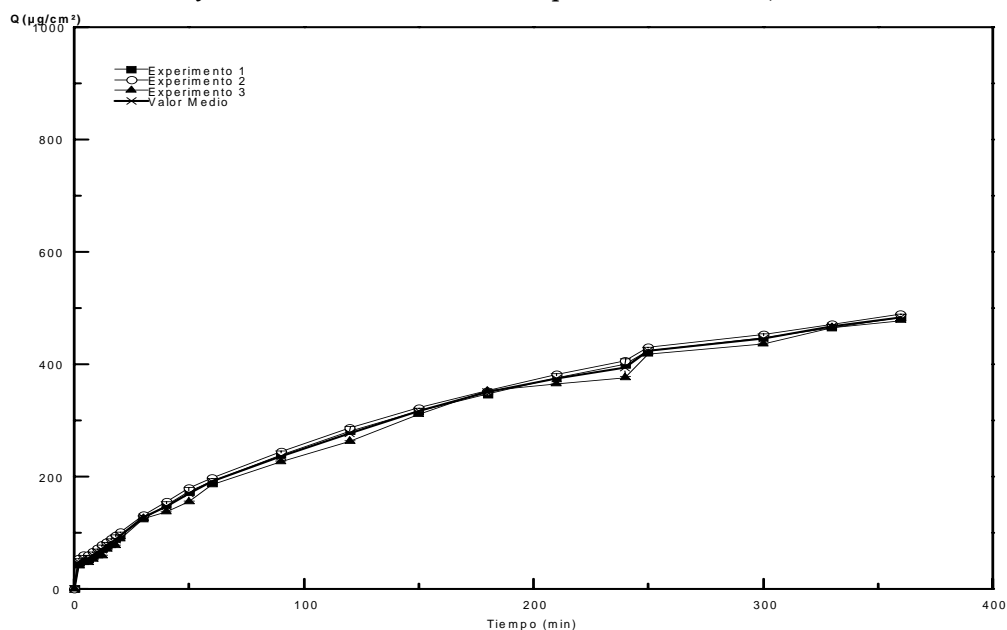


Tabla 5.16.- Cantidades de AS ($Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$) cedidas al compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.50% de AS utilizando Celdas de Franz Modificadas.

Tiempo (minutos)	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 1	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 2	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 3	Media \pm DE
2	47,564	53,539	41,590	47,56 \pm 6,01
4	59,513	65,487	41,590	55,53 \pm 12,44
6	77,436	83,410	53,539	71,46 \pm 15,81
8	89,384	95,358	53,539	79,43 \pm 22,62
10	95,358	101,333	71,461	89,38 \pm 15,83
12	101,333	107,307	89,384	99,34 \pm 9,13
14	113,281	119,255	95,358	109,30 \pm 12,44
16	119,255	125,230	101,333	115,27 \pm 12,50
18	131,204	137,178	113,281	127,22 \pm 12,61
20	137,178	143,152	131,204	137,18 \pm 5,97
30	178,998	184,972	167,049	177,01 \pm 9,13
40	214,843	220,818	196,921	210,86 \pm 12,44
50	244,715	250,689	214,843	236,75 \pm 19,20
60	268,612	274,586	262,638	268,61 \pm 6,01
90	328,354	334,329	310,432	324,37 \pm 12,39
120	382,123	388,097	352,251	374,16 \pm 19,20
150	423,942	429,917	406,020	419,96 \pm 12,44
180	471,737	477,711	447,840	465,76 \pm 15,81
210	507,582	513,556	477,711	499,62 \pm 19,20
240	537,453	543,428	525,505	535,46 \pm 9,13
250	573,299	579,273	555,376	569,32 \pm 12,47
300	591,222	597,196	567,325	585,25 \pm 15,8
330	615,119	621,093	609,144	615,12 \pm 5,97
360	639,016	644,990	633,042	639,02 \pm 6,00

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.16.- Cantidades cedidas ($Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS a Fase receptora utilizando Celdas de Franz como células de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,50% de AS.

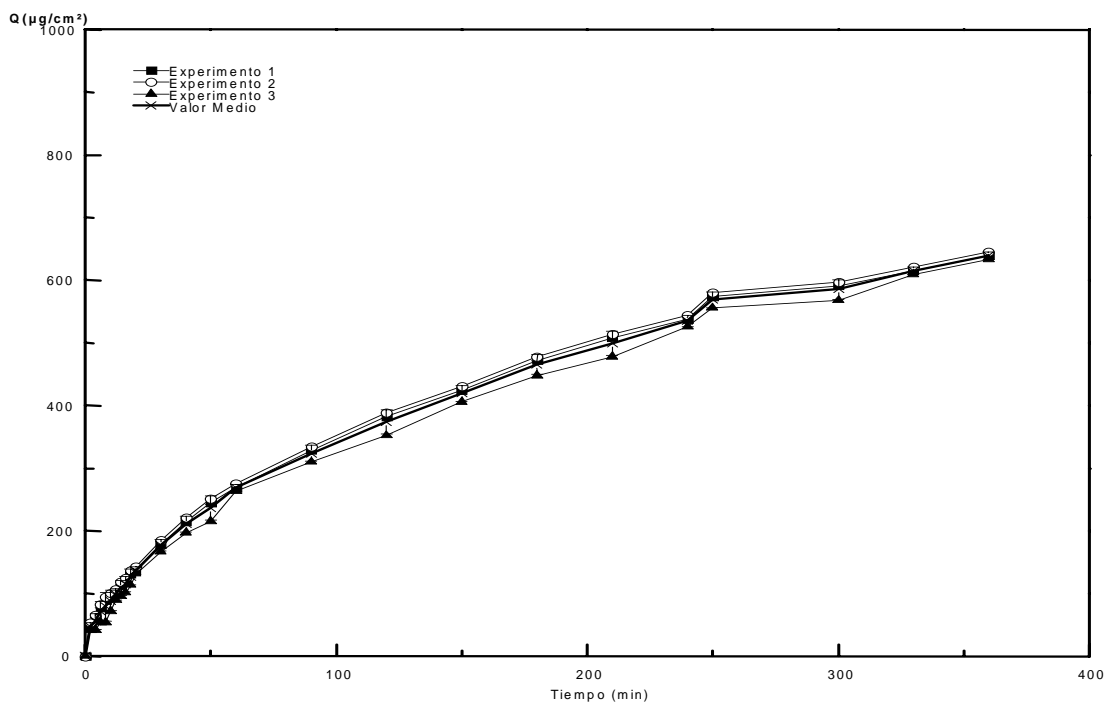


Tabla 5.17.- Cantidades de AS ($Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$) cedidas al compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.75% de AS utilizando Celdas de Franz Modificadas.

Tiempo (minutos)	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 1	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 2	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 3	Media \pm DE
2	53,539	41,590	59,513	51,55 \pm 9,10
4	71,461	53,539	77,436	67,48 \pm 12,60
6	95,358	71,461	101,333	89,38 \pm 15,81
8	107,307	89,384	113,281	103,32 \pm 12,44
10	125,230	113,281	131,204	123,24 \pm 9,15
12	131,204	125,230	137,178	131,20 \pm 5,97
14	143,152	131,204	149,127	141,16 \pm 9,13
16	149,127	149,127	155,101	151,12 \pm 3,60
18	161,075	155,101	167,049	161,08 \pm 5,97
20	167,049	155,101	173,024	165,06 \pm 9,13
30	220,818	202,895	226,792	216,83 \pm 12,44
40	256,663	256,663	262,638	258,65 \pm 3,45
50	286,535	280,560	292,509	286,53 \pm 5,97
60	340,303	328,354	346,277	338,31 \pm 9,12
90	423,942	406,020	429,917	419,96 \pm 12,50
120	489,659	489,659	495,634	491,65 \pm 3,40
150	561,350	549,402	567,325	559,36 \pm 9,13
180	615,119	603,170	621,093	613,13 \pm 9,10
210	674,861	656,939	680,836	670,88 \pm 12,40
240	722,655	716,681	728,630	722,66 \pm 5,97
250	752,527	740,578	758,501	750,54 \pm 9,13
300	806,295	806,295	812,269	808,29 \pm 3,45
330	830,192	836,166	836,166	834,17 \pm 3,50
360	848,115	842,141	854,089	848,11 \pm 5,97

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.17.- Cantidades cedidas ($Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS a Fase receptora utilizando Celdas de Franz como células de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,75% de AS.

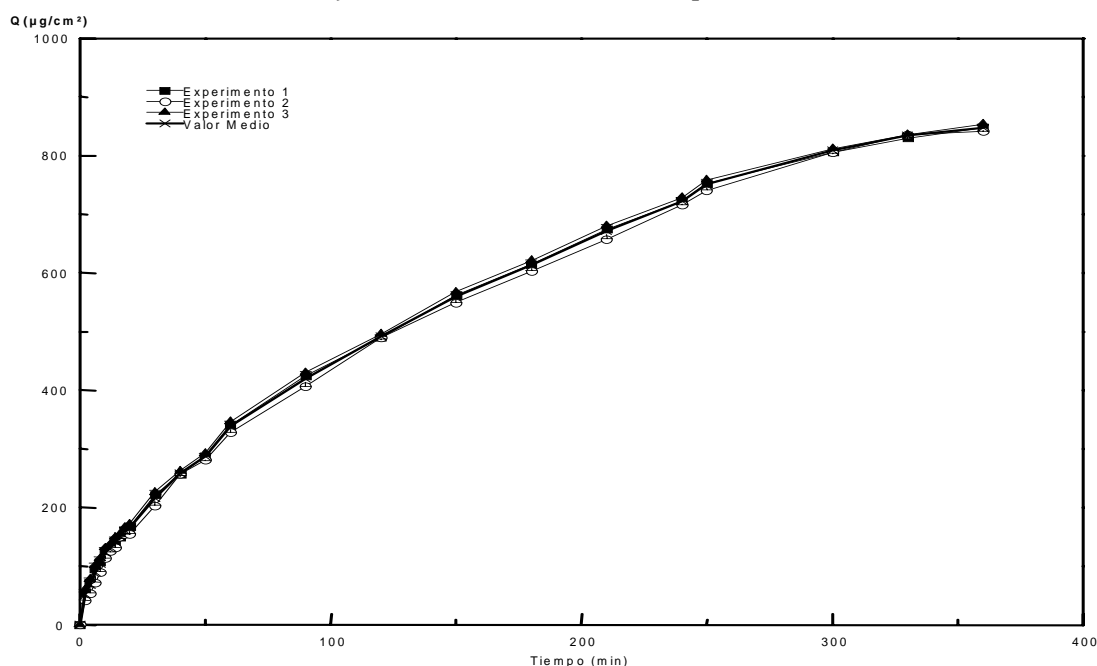


Tabla 5.18.- Cantidades de AS ($Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$) cedidas al compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 1,00% de AS utilizando Celdas de Franz Modificadas.

Tiempo (minutos)	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 1	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 2	$Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 3	Media \pm DE
2	53,539	47,564	59,513	53,54 \pm 5,97
4	71,461	65,487	77,436	71,46 \pm 5,98
6	95,358	83,410	101,333	93,37 \pm 9,13
8	113,281	101,333	119,255	111,29 \pm 9,15
10	137,178	131,204	143,152	137,18 \pm 6,01
12	149,127	143,152	155,101	149,13 \pm 6,00
14	167,049	155,101	173,024	165,06 \pm 9,12
16	184,972	167,049	190,946	180,99 \pm 12,44
18	190,946	190,946	196,921	192,94 \pm 3,47
20	196,921	155,101	202,895	184,97 \pm 26,04
30	274,586	262,638	280,560	272,59 \pm 9,13
40	316,406	298,483	322,380	312,42 \pm 12,50
50	364,200	364,200	370,174	366,19 \pm 3,40
60	406,020	400,045	411,994	406,02 \pm 5,96
90	513,556	501,608	519,531	511,56 \pm 9,14
120	597,196	579,273	603,170	593,21 \pm 12,60
150	668,887	668,887	674,861	670,88 \pm 3,45
180	734,604	728,630	740,578	734,60 \pm 5,87
210	794,346	782,398	800,321	792,36 \pm 9,10
240	842,141	824,218	848,115	838,16 \pm 12,47
250	877,986	877,986	883,960	879,98 \pm 3,51
300	913,832	907,857	919,806	913,83 \pm 6,02
330	937,729	937,729	943,703	939,72 \pm 3,51
360	967,600	961,626	973,574	967,60 \pm 6,03

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.18.- Cantidades cedidas (Q $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS a Fase receptora utilizando Celdas de Franz como células de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 1,00% de AS.

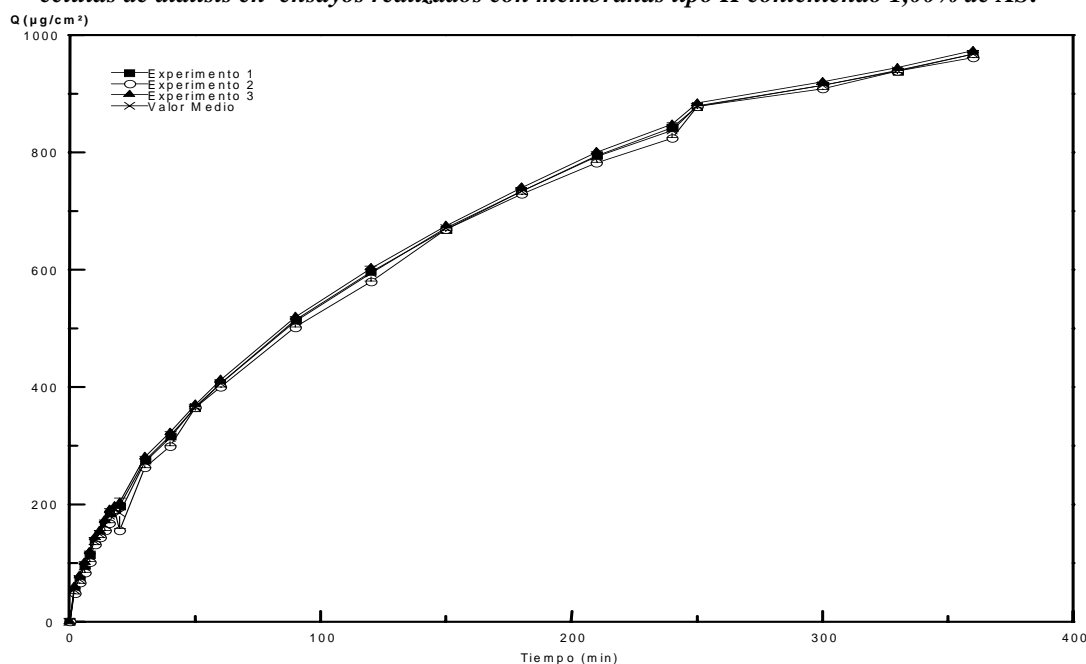


Tabla 5.19.- Cantidades de AS cedidas al compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.35% de AS utilizando la PLACA como célula de diálisis y 600 ml de Fase Receptora.

Tiempo (minutos)	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 1	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 2	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 3	Media \pm DE
2	156,68	103,90	125,00	128,53 \pm 26,57
4	209,05	181,70	211,15	200,63 \pm 16,43
6	265,42	236,06	265,40	255,63 \pm 16,95
8	321,56	279,71	311,04	304,10 \pm 21,77
10	373,28	331,59	358,58	354,48 \pm 21,15
12	441,51	410,46	437,28	429,75 \pm 14,20
14	505,30	480,67	505,23	497,07 \pm 14,20
16	562,57	523,52	554,16	546,75 \pm 20,55
18	617,53	587,01	611,19	605,24 \pm 16,11
20	682,63	658,55	690,79	677,32 \pm 16,76
30	771,23	731,25	771,01	757,83 \pm 23,02
40	838,63	807,67	836,25	827,51 \pm 17,23
50	915,80	883,64	905,10	901,51 \pm 16,38
60	996,51	965,33	991,85	984,57 \pm 16,82
90	1154,18	1081,02	1130,85	1122,02 \pm 16,82
120	1214,75	1175,17	1205,27	1198,40 \pm 20,66
150	1342,46	1278,42	1300,49	1307,12 \pm 32,53
180	1384,72	1382,57	1427,93	1398,41 \pm 25,59
210	1526,97	1491,60	1529,70	1516,09 \pm 21,25
240	1594,49	1569,56	1610,23	1591,43 \pm 20,51
270	1647,26	1597,11	1638,90	1627,76 \pm 26,87
300	1712,63	1659,77	1682,37	1684,92 \pm 26,52
330	1759,60	1715,80	1757,49	1744,30 \pm 24,70
360	1798,08	1765,30	1795,21	1786,20 \pm 18,15

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

 Membranas Tipo II

Figura 5.19.-Cantidades cedidas $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ de AS en 600ml de Fase receptora utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.35% de AS

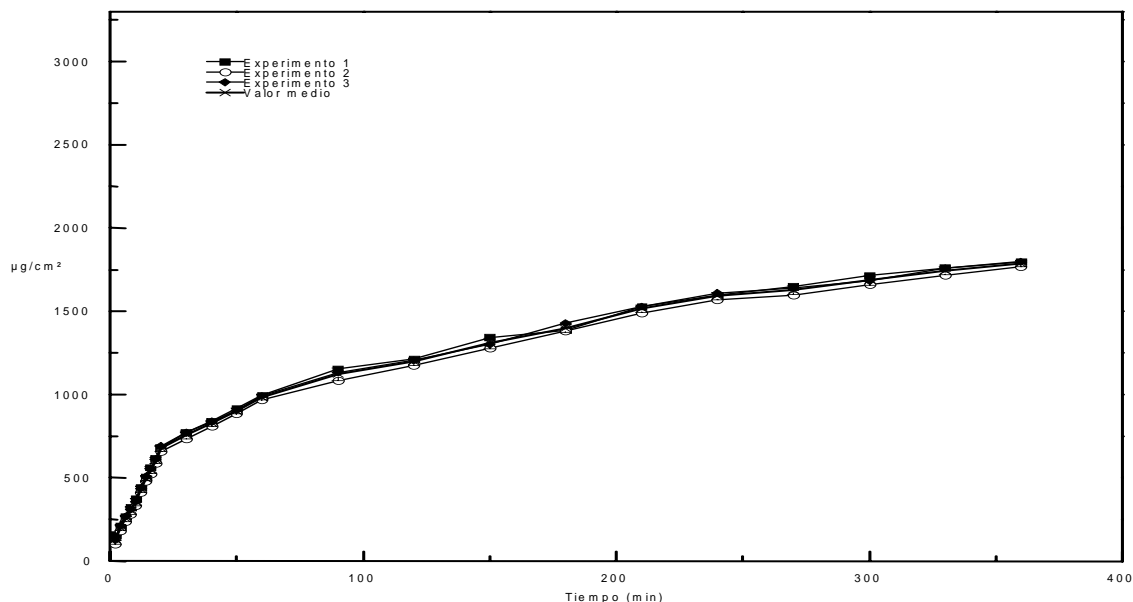


Tabla 5.20.- Cantidades de AS cedidas al compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.50% de AS utilizando la PLACA como célula de diálisis y 600 ml de Fase Receptora.

Tiempo (minutos)	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 1	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 2	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 3	Media \pm DE
2	213,68	8,86	57,43	93,32 \pm 107,02
4	284,88	53,11	110,02	149,34 \pm 120,79
6	360,00	139,25	181,33	226,86 \pm 117,20
8	443,19	231,36	267,06	313,87 \pm 113,40
10	477,86	256,06	318,94	350,95 \pm 114,32
12	550,01	337,12	406,16	431,09 \pm 108,61
14	600,99	392,82	436,68	476,83 \pm 109,74
16	633,03	421,21	492,07	515,44 \pm 107,82
18	694,00	480,68	516,06	563,58 \pm 114,32
20	818,94	622,90	645,79	695,88 \pm 107,19
30	974,85	761,66	811,42	849,31 \pm 111,53
40	1061,70	850,05	901,78	937,84 \pm 110,33
50	1129,42	904,99	958,68	997,70 \pm 117,19
60	1212,93	990,32	1123,86	1109,04 \pm 112,04
90	1341,03	1112,86	1174,49	1209,46 \pm 118,04
120	1410,69	1193,37	1242,70	1282,25 \pm 113,93
150	1546,81	1303,05	1366,46	1405,44 \pm 126,47
180	1623,21	1417,33	1450,63	1497,06 \pm 110,51
210	1670,71	1462,51	1523,76	1552,33 \pm 107,00
240	1721,10	1497,15	1544,46	1587,57 \pm 118,03
270	1870,68	1651,13	1692,71	1738,18 \pm 116,62
300	1891,33	1658,59	1708,03	1752,65 \pm 122,62
330	2114,22	1900,70	1962,19	1992,37 \pm 109,91
360	2329,27	2116,53	2151,32	2199,04 \pm 114,12

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.20.- Cantidades cedidas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en 600 ml de Fase receptora utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.50% de AS

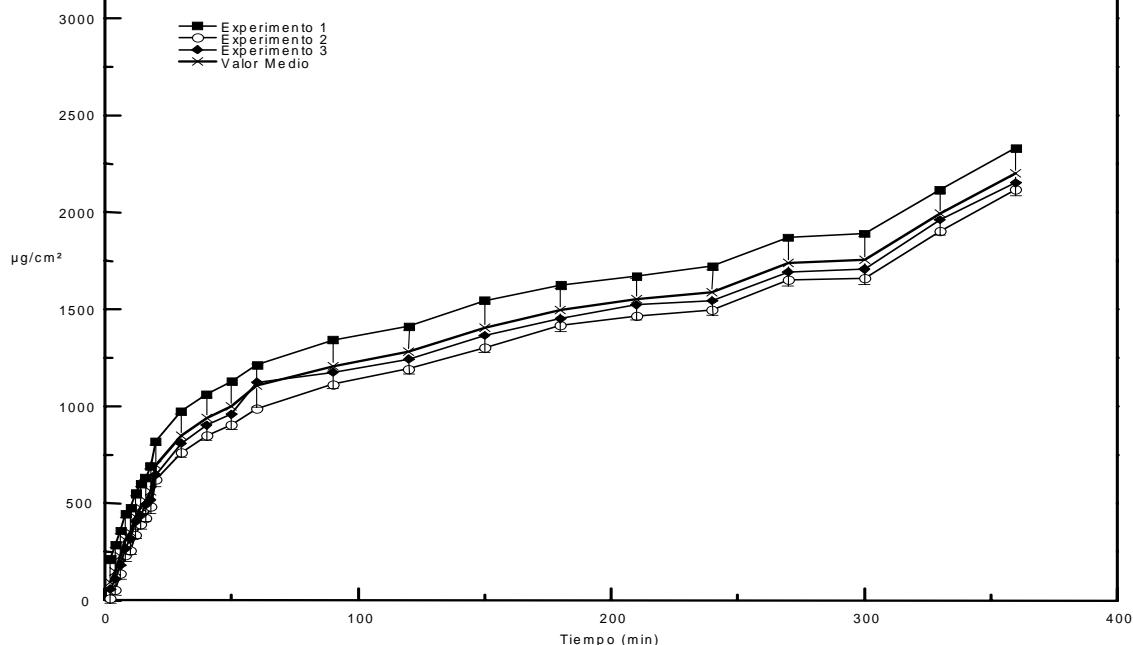


Tabla 5.21.- Cantidades de AS cedidas al compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.75% de AS utilizando la PLACA como célula de diálisis y 600 ml de Fase Receptora.

Tiempo (minutos)	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 1	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 2	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 3	Media \pm DE
2	427,02	220,05	106,01	251,03 \pm 162,73
4	497,87	293,40	194,34	328,54 \pm 154,78
6	572,65	368,57	252,88	398,04 \pm 161,91
8	655,55	445,55	334,30	478,47 \pm 163,13
10	689,91	476,12	365,11	510,39 \pm 165,09
12	761,80	546,32	433,44	580,52 \pm 166,83
14	812,52	607,89	497,34	639,25 \pm 159,91
16	844,29	635,87	525,57	668,58 \pm 161,86
18	907,12	703,26	589,04	733,14 \pm 161,13
20	1029,89	824,33	724,92	859,72 \pm 155,54
30	1186,23	1014,32	900,90	1033,82 \pm 143,66
40	1273,54	1062,87	943,75	1093,39 \pm 167,00
50	1341,80	1160,48	1050,16	1184,14 \pm 147,26
60	1426,05	1214,41	1051,26	1230,57 \pm 187,91
90	1761,02	1552,26	1441,97	1585,08 \pm 162,04
120	1899,50	1689,53	1574,66	1721,23 \pm 164,72
150	2082,75	1877,58	1724,07	1894,36 \pm 179,96
180	2330,07	2115,51	2002,49	2149,36 \pm 166,39
210	2398,92	2177,17	2053,94	2210,01 \pm 174,82
240	2744,65	2547,17	2434,90	2575,57 \pm 156,82
270	2770,64	2571,85	2503,06	2615,18 \pm 138,95
300	3062,98	2880,13	2792,72	2911,94 \pm 137,91
330	3131,38	2966,50	2865,78	2987,89 \pm 134,09
360	3291,90	3067,14	2957,36	3105,47 \pm 170,53

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Membranas Tipo II

Figura 5.21.- Cantidades cedidas $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ de AS en 600ml de Fase receptora utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0.75% de AS

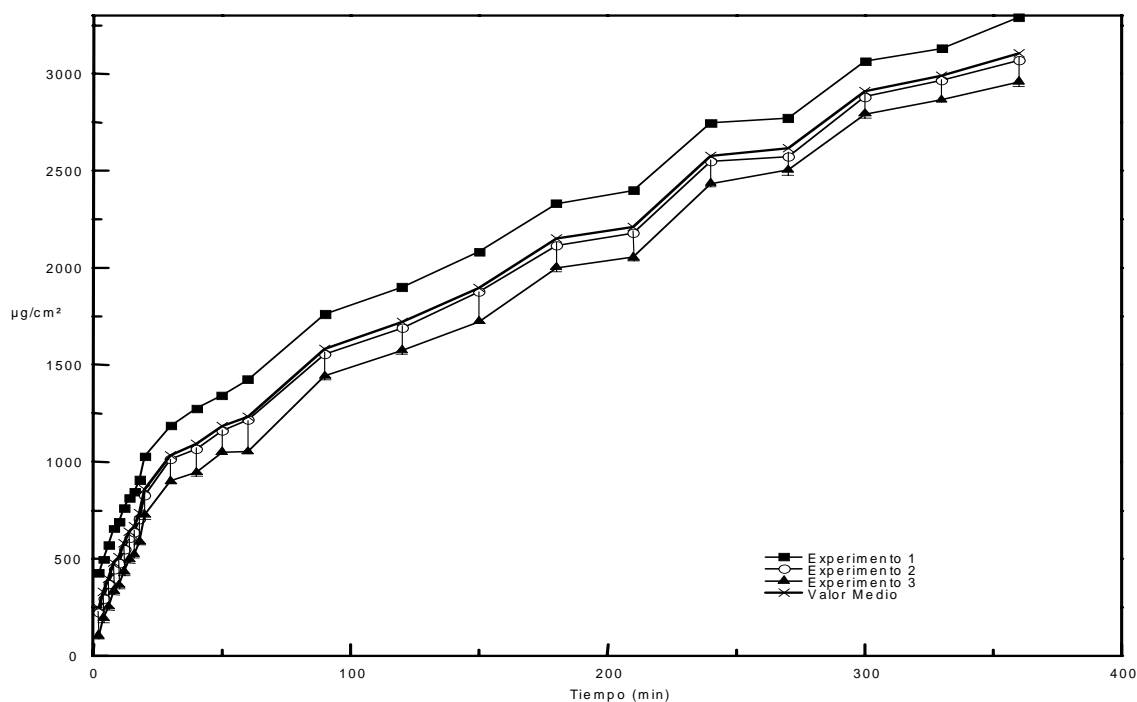


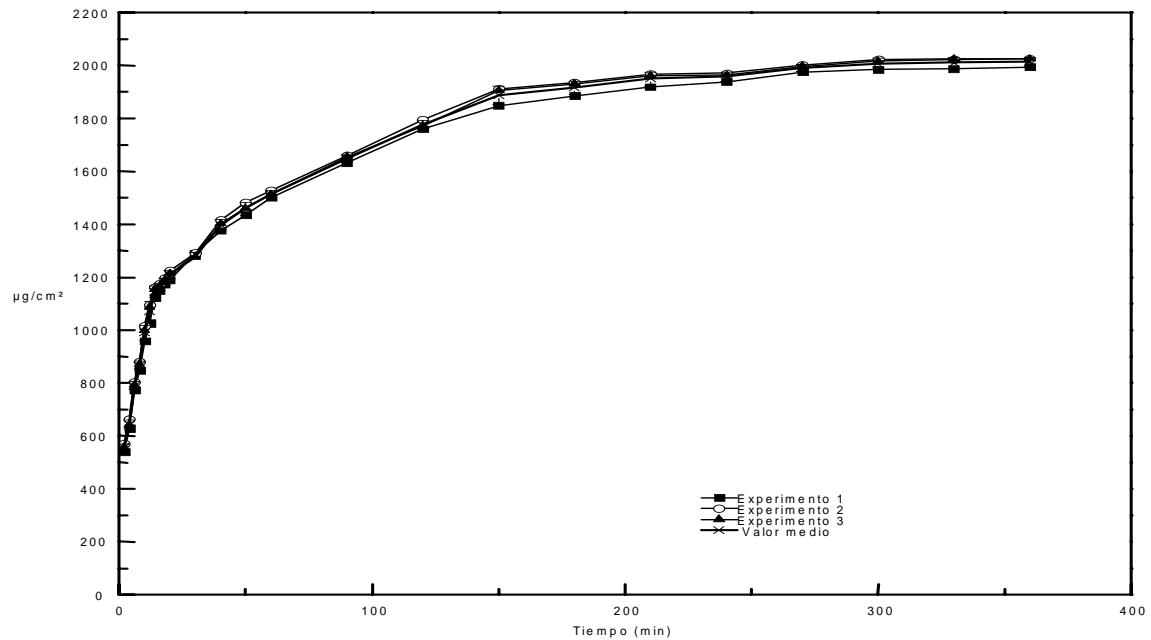
Tabla 5.22.- Cantidades de AS cedidas al compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra a partir de los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 1,00% de AS utilizando la PLACA como célula de diálisis y 600 ml de Fase Receptora.

Tiempo (minutos)	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 1	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 2	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 3	Media \pm DE
2	539,01	568,51	557,95	555,16 \pm 14,95
4	628,70	662,27	641,19	644,05 \pm 16,97
6	772,78	804,05	791,43	789,42 \pm 15,73
8	847,01	880,19	869,69	865,63 \pm 16,96
10	956,61	1014,71	997,94	989,76 \pm 29,90
12	1026,05	1096,41	1088,04	1070,17 \pm 38,44
14	1122,38	1161,09	1152,74	1145,40 \pm 20,37
16	1149,54	1175,50	1165,08	1163,37 \pm 13,07
18	1172,42	1194,01	1187,77	1184,73 \pm 11,11
20	1188,98	1222,81	1212,43	1208,07 \pm 17,33
30	1289,83	1291,59	1275,04	1285,49 \pm 9,09
40	1375,71	1415,65	1401,21	1397,52 \pm 20,22
50	1434,35	1481,35	1460,78	1458,83 \pm 23,56
60	1500,93	1526,12	1513,82	1513,62 \pm 12,60
90	1632,76	1660,34	1654,22	1649,11 \pm 14,48
120	1759,47	1794,98	1770,65	1775,03 \pm 18,15
150	1848,56	1911,86	1903,80	1888,07 \pm 34,46
180	1886,23	1933,07	1929,06	1916,12 \pm 25,96
210	1919,52	1967,87	1961,89	1949,76 \pm 26,36
240	1938,43	1970,43	1964,48	1957,78 \pm 17,02
270	1975,17	2000,41	1996,47	1990,69 \pm 13,58
300	1983,62	2022,08	2016,20	2007,30 \pm 20,72
330	1985,98	2023,88	2021,93	2010,60 \pm 21,34
360	1994,21	2025,52	2023,59	2014,44 \pm 17,55

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

 Membranas Tipo II

Figura 5.22.-Cantidades cedidas $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ de AS en 600 ml de Fase receptora utilizando la PLACA como célula de diálisis en ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 1,00% de AS



5.5. COMENTARIOS

5.5.1.- Influencia de la célula de diálisis que se emplea en los ensayos de cesión

A continuación se realizan los comentarios de los resultados obtenidos, comenzando por aquellos en los que se utiliza como célula de difusión, la Placa **Petri** (*Superficie de cesión*= $58,77\text{cm}^2$) y, después, los correspondientes a los datos de las **Celdas de Franz** modificadas (*Superficie de cesión*= $1,77\text{cm}^2$).

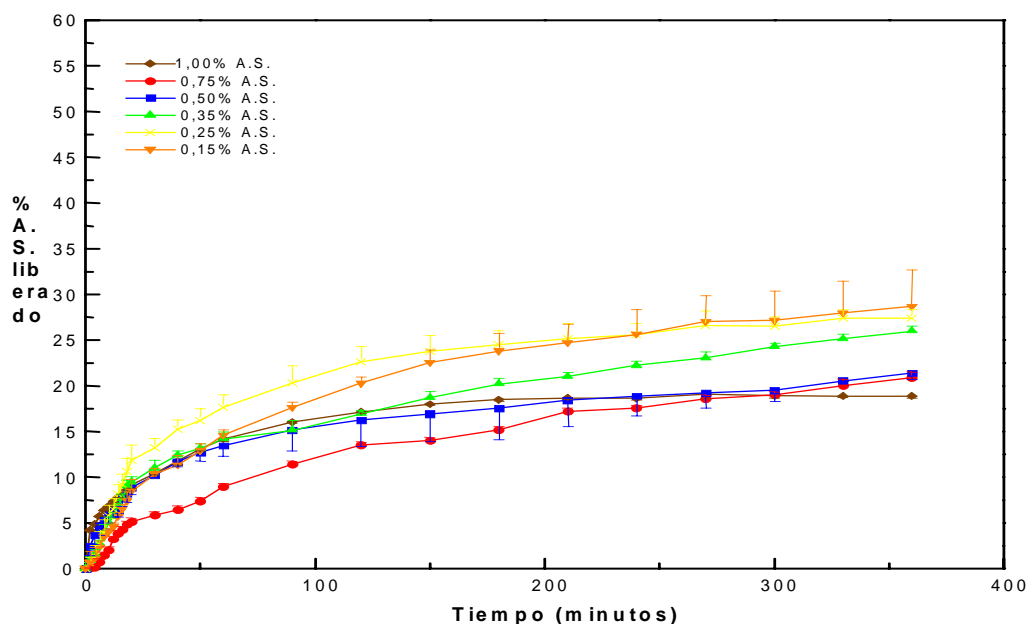
 Membranas Tipo II

5.5.1.1. Célula de difusión: PLACA

Con los datos de cesión de AS que se obtienen al utilizar ambos tipos de células de difusión (Placa Petri o celdas de Franz modificadas) se estudia la influencia, del tipo de dispositivo que se utiliza en los ensayos de difusión, en la cesión del AS contenido en las membranas tipo II (%ASm). Se comienza por realizar la representación gráfica de los valores medios de los porcentajes de AS cedidos a fase receptora ($V=300\text{ml}$), desde cada una de las membranas preparadas (tablas 5.1-5.6), utilizando la **PLACA** como célula de difusión (Figura 5.23).

Figura 5.23. Porcentajes de AS cedidos a fase receptora en función del porcentaje (%ASm) que forma parte de las membranas tipo II, utilizando como célula de diálisis la PLACA.

Como se puede observar los perfiles que se obtienen para cada una de las 6 membranas de AS, en todos los casos ensayados, son curvas exponenciales y no muestran período de latencia; la liberación del componente trazador, ácido salicílico,



es muy rápida, sobre todo, en los primeros veinte minutos de ensayo. Después de transcurrido ese tiempo y una vez concluido el ensayo, que tiene una duración de 360 minutos, se observa que, el máximo porcentaje de AS que se libera a partir de estas membranas es 28,67%; esa cesión se produce desde las membranas tipo II que contienen la proporción de AS más baja (0,15% de ASm), mientras que, por el contrario, el valor mínimo de cesión de AS (18,85%) se obtiene con las membranas

Membranas Tipo II

que llevan la mayor cantidad de AS en su composición (1,00% de ASm). Los porcentajes de AS cedidos a partir del resto de membranas de AS (con 0,25%-0,35%-0,50% ó 0,75% de ASm) se recogen en las tablas 5.8-5.11.

En la figura 5.23 también se observa que al incrementarse la cantidad de ASm que se incorpora a estas membrana tipo II se produce una disminución en el porcentaje de AS que se transfiere desde las mismas. Es decir, parece existir una relación inversa entre el porcentaje de AS que compone la membrana (ASm) y el porcentaje de AS cedido a partir de cada una de ellas. Esto indicaría que la proporción de ASm de la membrana es un factor influyente en la transferencia del fármaco (ácido salicílico) desde las membranas tipo II al líquido receptor.

Con el fin de analizar si la proporción de ASm, es un factor influyente en la cesión del ácido salicílico a fase receptora, se realiza el análisis estadístico de los datos (ANOVA) de los valores de cesión de AS, tanto expresados en porcentajes de AS cedidos, como en cantidades de AS cedidas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) desde las distintas membranas tipo II a los 300ml de líquido receptor utilizados en estos ensayos. Este análisis se realiza, para distintos tiempos de experimentación y en todos los casos se obtiene como resultado que, $p < 0,05$, tanto para los valores de porcentaje, como para los de cantidades de AS cedidas. Ello indica que, tanto para (%)AS, como para $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ de AS cedidas existen diferencias, estadísticamente significativas, entre los valores de cesión de AS a fase receptora en función del contenido en ácido salicílico (ASm) que lleve la membrana tipo II ensayada en cada caso.

Luego, de esos resultados se deduce que el porcentaje de ASm sí es un factor que influye, significativamente, en la liberación del ácido salicílico contenido en las membranas y así, cuanto mayor es el contenido en ácido salicílico de la membrana, menor es el %AS que se libera desde ellas. Sin embargo, ocurre todo lo contrario si lo que se comparan son las cantidades de AS $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ cedidas desde esas mismas membranas, ya que la cantidades de AS que se liberan son mayores cuanto mayor es el contenido en AS de la membrana, como se puede apreciar en la *figura 5.24*.

Por tanto, el porcentaje de ASm también influye, lógicamente, en las cantidades de AS que se transfieren desde esas membranas tipo II al líquido receptor.

Membranas Tipo II

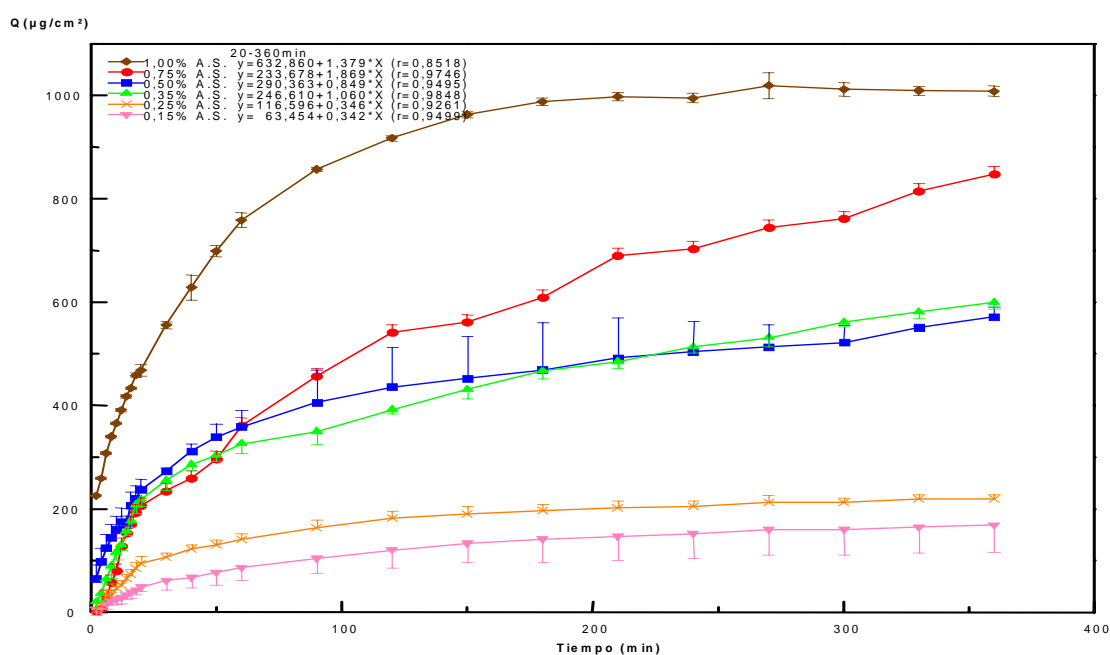


Figura 5.24. Cantidades Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS cedidas a 300ml de fase receptora en función del %ASm que forma parte de las membranas tipo II utilizando como célula de diálisis la PLACA.

La velocidad de cesión del AS es muy rápida en el inicio del ensayo. Los valores correspondientes a cada una de las velocidades de cesión que se producen con cada membrana, en los primeros 20 minutos de experimentación, calculados a partir de las cantidades de AS cedidas desde los 2-20 minutos de ensayo, para cada membrana (ver tablas 5.1-5.6) aparecen recogidos en la Tabla 5.23.

Tabla 5.23.- Valores de velocidades de cesión de AS que se obtienen en los 20 minutos iniciales de experimentación con cada una de las membranas de AS estudiada, utilizando la placa como célula de diálisis.

Porcentaje (%) de AS en membrana (ASm)	“Tramo de cesión rápida” (2-20 minutos) Velocidad de cesión ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$)
0,15	2,393
0,25	5,148
0,35	11,418
0,50	8,815
0,75	12,713
1,00	14,394

Como se puede ver las velocidades de cesión aumentan al incrementarse el porcentaje de ASm y, a partir de los valores de velocidad recogidos en la tabla 5.23, podría establecerse una relación entre esas velocidades de cesión de AS iniciales

 Membranas Tipo II

(velocidad rápida) y el porcentaje de fármaco que contiene la membrana (ASm). La ecuación que relaciona ambos parámetros, es (ecuación 5.1):

$$\text{Velocidad rápida de cesión AS } (\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}) = 0,3699 + 15,2842 (\%)\text{ASm} \\ (r = 0,9908) \quad (\text{Ec. 5.1})$$

En la obtención de la ecuación 5.1 se desprecia el valor de pendiente correspondiente a la membrana que contiene 0,35% ASm, por considerarlo aberrante; pero, mediante la aplicación de esa ecuación se podrían preparar membranas con la cantidad de ASm necesaria para conseguir la velocidad de transferencia de AS que se deseara obtener en los primeros momentos de contacto de la membrana con el receptor.

Transcurridos esos primeros veinte minutos de ensayo, en que la transferencia del componente activo es muy rápida, la cesión del AS desde la membrana se produce con una velocidad mucho menor, puesto que los valores que se obtienen para este segundo tramo (“Tramo Lento”), comprendido entre los 20 minutos y el final del ensayo (a los 360 minutos) que se muestran en la Tabla 5.24 son, en el mejor de los casos ($v = 1,379 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{minuto}$, que se obtiene con 1,00% de ASm), casi la mitad del menor de los valores obtenidos en el tramo anterior (“Tramo Rápido”) ($v = 2,393 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{minuto}$, que se obtiene con 0,15% de ASm) (ver tabla 5.23).

Tabla 5.24.- Valores de velocidades de cesión de AS que se obtienen, desde los 20 minutos iniciales de experimentación hasta el final del ensayo (t = 360 minutos) con cada una de las membranas de AS estudiada utilizando la placa como célula de diálisis.

Porcentaje (%) de AS en membrana (ASm)	“Tramo de cesión lenta” (20-360minutos) Velocidad de cesión ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$)
0,15	0,342
0,25	0,346
0,35	1,060
0,50	0,849
0,75	1,869
1,00	1,379

Sin embargo, se ve que la velocidad de cesión del AS, en ambos tramos, está influenciada por el contenido de ASm (ver Tablas 5.23 y 5.24); para el tramo de cesión más lento, la relación que se establece entre la velocidad de liberación lenta del fármaco y el (%) de ASm (ecuación 5.2) es:

 Membranas Tipo II

$$\text{Velocidad de cesión lenta de AS } (\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}) = 0,0894 + 1,6369 (\%) \text{ ASm}$$

$$(r = 0,863) \text{ (Ec. 5.2)}$$

Por tanto, al obtenerse un coeficiente de correlación próximo a 0,9 ($r = 0,86$) podría considerarse que, en este caso, también existe relación lineal entre ambos parámetros y por ello, cuanto mayor es ASm, más rápida es la velocidad de liberación del AS desde la membrana, como se observa en el caso precedente (tramo rápido: 2-20 minutos de ensayo).

Luego, la cesión del AS a partir de las membranas tipo II se produce siguiendo, aparentemente, dos cinéticas parciales consecutivas: una primera (cesión rápida) en los veinte minutos iniciales de ensayo, en la que la liberación del AS es muy rápida, y la segunda (cesión lenta), que rige la cesión del fármaco desde ese momento hasta el final del ensayo, en que la transferencia del AS a líquido receptor se produce con menor velocidad. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Rodríguez-Bayón y Cadórniga Carro en los estudios de cesión de AS a través de membranas de celofán utilizando como fase dadora una emulsión O/A de AS (Rodríguez Bayón y Cadórniga Carro, 1991).

De esas dos cinéticas parciales, la primera (cesión rápida) representaría la cesión del fármaco que está disponible para transferirse a la fase receptora en el mismo momento en que se pone en contacto con ella, mientras que la segunda (cinética lenta) indicaría, la verdadera velocidad de liberación del AS desde este tipo de membranas, puesto que sería la velocidad de liberación del AS desde la membrana una vez que se ha alcanzado el equilibrio en la transferencia del AS a líquido receptor. A conclusiones similares llegan Joshi y col. cuando investigan la liberación de distintos fármacos incorporados físicamente en membranas de ácido hialurónico y sus ésteres (Joshi y col., 1992).

Por último, para terminar el comentario de los datos de cesión de AS obtenidos con cada una de las membranas de ácido salicílico preparadas y colocadas como fase dadora en la placa utilizada como célula de diálisis en estos ensayos y, empleando 300 ml de tampón fosfatos de pH 7, como líquido receptor, se representan en la *figura 5.25*, las cantidades de AS cedidas a partir de cada una de esas membranas tipo II $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ en ordenadas, frente a la raíz cuadrada del tiempo en abscisas (tratamiento cinético de Higuchi).

Membranas Tipo II

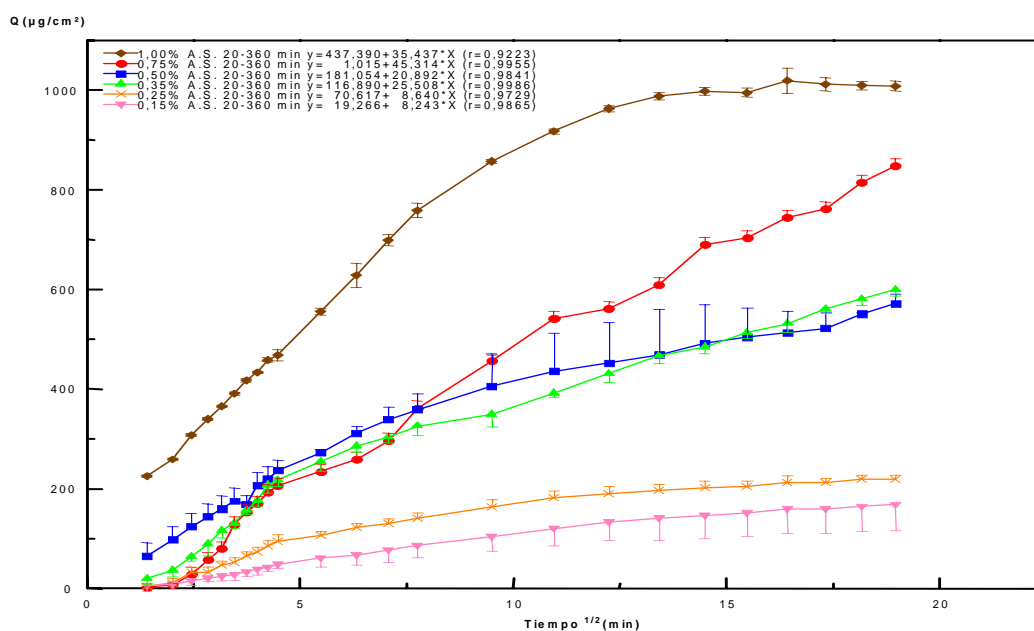


Figura 5.25 Cantidad de AS liberado a fase receptora $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ versus raíz cuadrada del tiempo en función del porcentaje de ácido salicílico que llevan las membranas tipo II

Al aplicar a los valores de cantidades de AS cedidas, obtenidas experimentalmente, el tratamiento cinético de Higuchi se observan, por lo general (figura 5.25), trazados más o menos rectilíneos, salvo en el caso de la membrana de 1,00% de ASm, que es claramente, curvilíneo. Aún así, los coeficientes de correlación de las rectas de regresión calculadas con los datos correspondientes al tramo de cesión lenta (20-360 minutos) son mejores ($r > 0,92$), en todos los casos estudiados, a los obtenidos, en las mismas condiciones de ensayo, en la representación anterior ($r > 0,85$; ver figura 5.24), por lo que se considera que los resultados de cesión de AS desde las membranas tipo II se ajustan mejor al tratamiento cinético de Higuchi (Tabla 5.25).

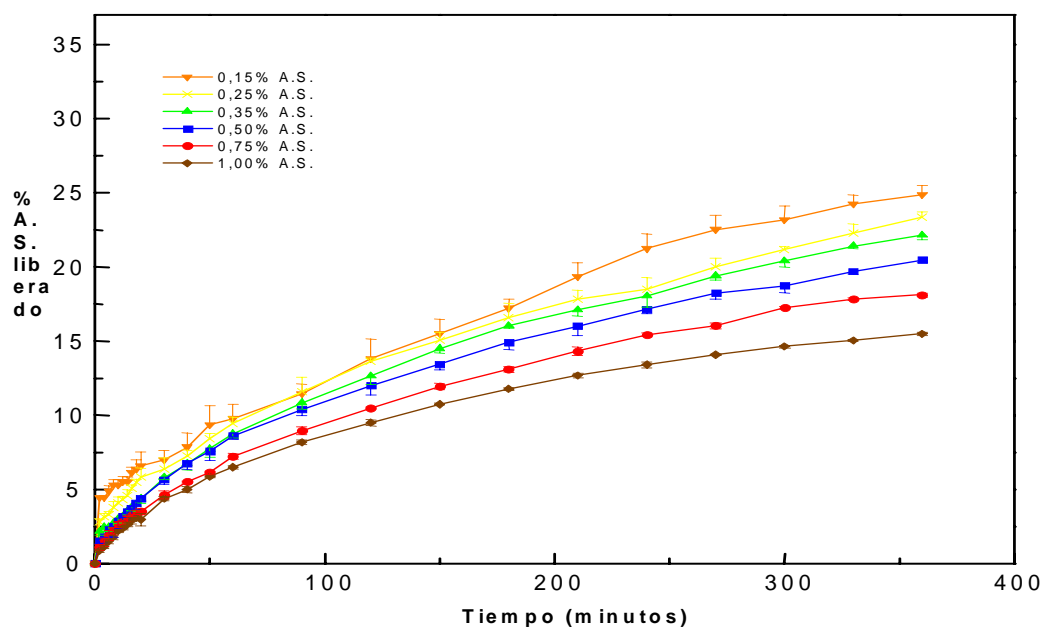
Tabla 5.25.- Parámetros obtenidos al aplicar el tratamiento cinético de Higuchi a los datos experimentales de cantidades $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ de AS cedidas entre los 20 y 360 minutos de ensayo

Porcentaje de AS (%) en membranas tipo II	Ordenada en el origen	Pendiente	Coefficiente de correlación
0,15	19,266	8,243	0,9865
0,25	70,617	8,640	0,9729
0,35	116,890	25,508	0,9986
0,50	181,054	20,892	0,9841
0,75	1,015	45,314	0,9955
1,00	437,390	35,437	0,9223

 Membranas Tipo II

5.5.1.2. Célula de difusión: CELDAS de FRANZ MODIFICADAS

En la *figura 5.26* se representan los resultados de la cesión de AS desde las distintas membranas tipo II, que contienen: 0,15%-0,25%-0,35%-0,50%-0,75% ó



1,00% de ASm, cuando se emplean, como células de diálisis, las **celdas de Franz** modificadas.

Figura 5.26. Porcentajes de AS cedidos a fase receptora en función del % de ASm que forma parte de las membranas tipo II cuando se utilizan como célula de diálisis CELDAS de FRANZ MODIFICADAS.

Como se aprecia en la figura la liberación del ácido salicílico desde este tipo de membranas es instantánea, no se observa período de latencia ya que se puede detectar AS en el líquido receptor desde el inicio del ensayo. Los perfiles de cesión obtenidos con cada una de las seis membranas tipo II son semejantes entre sí; todos ellos son similares a la rama de una parábola, más o menos amplia, igual que ocurre cuando en los ensayos de cesión se utiliza la placa como célula de diálisis.

También se observa que, después de 6 horas de experimentación, se obtiene la máxima liberación de AS(24,85%) con la membrana de 0,15% ASm y, la cesión más baja (15,49%) se produce cuando se ensayan membranas elaboradas con el mayor porcentaje de AS que se emplea en este estudio (1,00% de ASm) (Tabla 5.26). Ambos valores son inferiores a los que se obtienen cuando se utiliza la **placa**, como célula de diálisis en los ensayos de cesión con esas mismas membranas; esas cifras en este caso son, respectivamente: 28,67%(membranas de 0,15% de ASm) y 18,85% (para las de 1,00% de ASm).

 Membranas Tipo II

En general, al igual que ocurre cuando se utiliza la placa como célula de diálisis en los ensayos de cesión del AS desde la membrana, se observa que al incrementar la cantidad de ASm disminuye el porcentaje de AS que transfiere a la fase receptora contenida en la celda de Franz. Es decir, parece que existe una relación inversa entre porcentaje de ASm y el porcentaje de AS cedido desde ella. Para determinar esa posible relación, se utilizan los valores de (%)AS que se ceden a partir de cada membrana al finalizar el ensayo (t= 360 minutos) (tabla 5.26) y el % ASm.

Tabla 5.26.- Porcentajes de cesión de ácido salicílico obtenidos al finalizar el ensayo (t = 360 minutos) con cada una de las membranas de tipo II estudiadas utilizando las celdas de Franz modificadas como célula de diálisis.

<i>Porcentaje de AS en membrana (%ASm)</i>	<i>Cesión de AS (%) al cabo de 360 minutos de ensayo</i>
0,15	24,85
0,25	23,33
0,35	22,07
0,50	20,47
0,75	18,11
1,00	15,49

La relación lineal que se establece entre esos dos parámetros viene definida por la ecuación 5.3:

$$\text{Celda: } (\%) \text{ de AS cedido} = 26,0738 - 10,7077 (\%) \text{ ASm} \quad (r = - 0,9975) \text{ (Ec.5.3)}$$

La ecuación 5.3 indica, que cuanto mayor es el contenido en ASm , menor es el porcentaje de AS que se libera desde ellas y además, a partir de esa expresión, se podría saber el porcentaje de AS que se cedería al cabo de seis horas de ensayo, a partir de una membrana preparada con un porcentaje de ácido salicílico concreto. En el caso de utilizar la placa como célula de diálisis en los ensayos de cesión de AS a partir de membranas tipo II la relación sería (ecuación 5.4):

$$\text{Placa: } (\%) \text{ AS cedido} = 29,4284 - 11,4225 (\%) \text{ ASm} \quad (r = - 0,9422) \text{ (Ec.5.4)}$$

en la que se ha excluido para su cálculo el valor correspondiente a 0,25% de ASm.

Membranas Tipo II

Para ver si la relación entre cesión y contenido en AS de la membrana es estadísticamente significativa, se realiza el análisis estadístico (ANOVA de una vía) de los datos de porcentaje de AS cedido a partir de cada membrana tipo II.

El resultado del análisis estadístico ($p < 0.05$) nos indica que, como en el caso de utilizar la placa en los ensayos de cesión del AS de las membranas tipo II, sí existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de cesión de AS obtenidos con cada una de las membranas ensayadas en las celdas de Franz modificadas, y el contenido en AS de la membrana, por lo que el ASm es un factor a tener en cuenta en los ensayos de cesión utilizando estas celdas de Franz, puesto que dependiendo del porcentaje de ASm así será el porcentaje de AS liberado a partir de ellas.

Este mismo hecho se puede constatar si en lugar de los datos de porcentajes de AS cedidos a partir de cada una de las seis membranas tipo II ensayadas, se utilizan los resultados de cantidades de AS cedidas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a partir de cada membrana de AS ensayada (Figura 5.27).

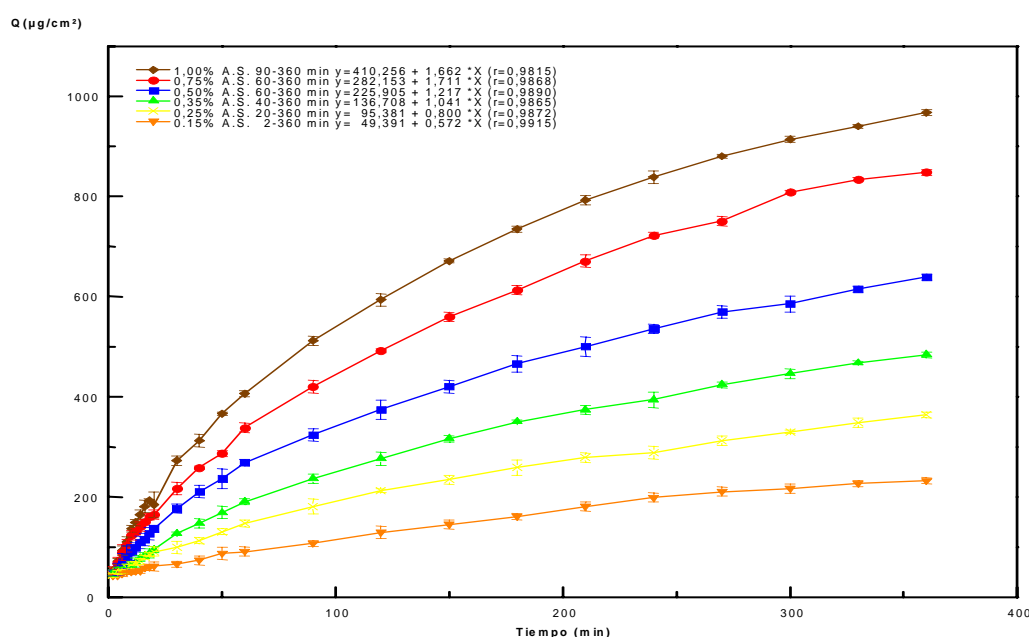


Figura 5.27. Cantidades $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ de AS cedidas en función del %ASm que forma parte de las membranas tipo II utilizando como célula de diálisis en el ensayo las CELDAS de FRANZ MODIFICADAS

Como se observa en la figura, solamente los datos obtenidos a partir de la membrana que contiene un 0,15% de ASm se ajustan a un trazado rectilíneo, desde el

Membranas Tipo II

comienzo hasta el final del ensayo (2-360 minutos) y, además, al ser el coeficiente de correlación $r > 0,99$ indica que existe una relación lineal entre la cesión del AS y el tiempo de ensayo. Pero, para el resto de las membranas ese ajuste se cumple solo en los periodos de tiempo que se especifican en cada caso y aunque los coeficientes de correlación ($r < 0,99$), se pueden considerar como buenos ya que en todos los casos son $> 0,98$.

Al realizar el análisis estadístico (ANOVA) de los resultados de cantidades de AS cedidas desde esas membranas, se obtiene, como en el caso anterior, que $p < 0,05$ lo que confirma que la transferencia del AS, desde la membrana al líquido receptor, depende significativamente del contenido en ASm y como se expuso anteriormente, cuanto mayor es el contenido en ASm peor se cede el fármaco a la fase receptora.

En un intento de ajustar todos los valores de cantidades cedidas de AS desde cada una de las membranas ensayadas a una única cinética que se cumpla para todo el tiempo de duración del ensayo (2-360 minutos), se aplica a los datos de cantidades Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS cedidas a lo largo del tiempo de experimentación, el tratamiento cinético de Higuchi.

Al hacer la representación gráfica de las cantidades Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS cedidas desde cada una de las membranas frente a la raíz cuadrada del tiempo, se obtiene la *figura 5.28*.

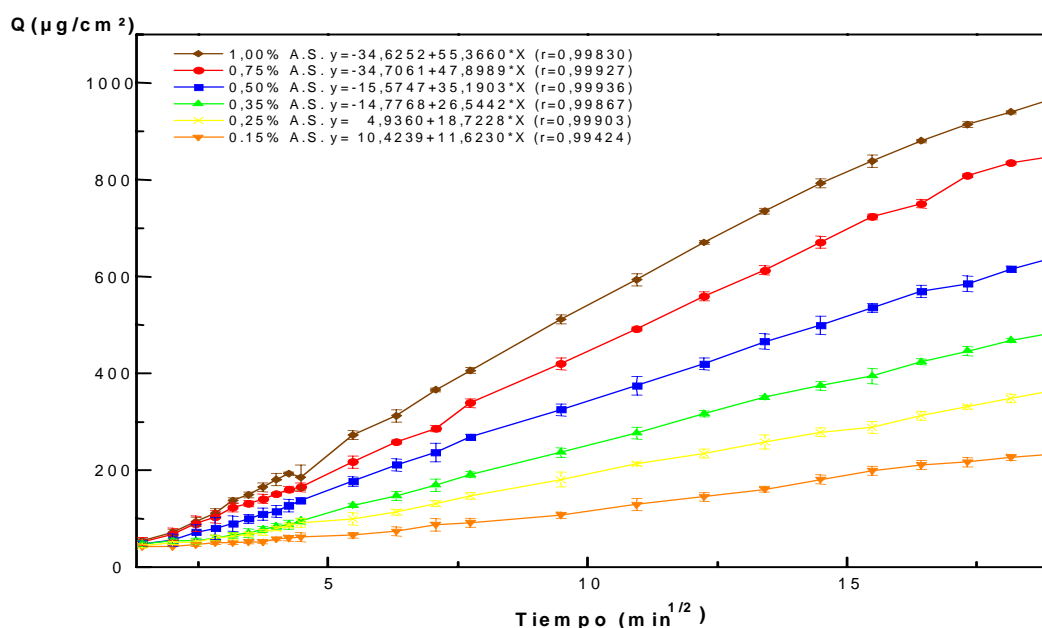


Figura 5.28 Cantidad de AS liberado a fase receptora Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) versus raíz cuadrada del tiempo (cinética de Higuchi) en función del porcentaje de ácido salicílico que llevan las membranas tipo II utilizando en el ensayo las Celdas de

 Membranas Tipo II

Franz modificadas

En la figura 5.28 aparecen recogidas las ecuaciones del tratamiento cinético que se ha realiza con los datos de cesión de AS obtenidos con cada una de las membranas ensayadas, así como los coeficientes de correlación de las rectas de regresión calculadas con esos datos. Como se ve, en todos los casos estudiados, estos coeficientes son mejores ($r > 0,99$), a los obtenidos, en las mismas condiciones de ensayo, en la representación anterior (ver figura 5.27) en que $r > 0,98$, por lo que se considera que los resultados de cesión de AS a partir de las membranas tipo II, al utilizar las celdas de Franz como células de diálisis, se ajustan mejor al tratamiento cinético de Higuchi. Los parámetros de las rectas de regresión que se obtienen al realizar ese tratamiento de datos aparecen recogidos en la Tabla 5.27.

Tabla 5.27.- Parámetros de las rectas de regresión obtenidas al aplicar el tratamiento cinético de Higuchi a los datos experimentales de cantidades $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ de AS cedidas entre los 20 y 360 minutos de ensayo utilizando, como células de diálisis, Celdas de Franz modificadas.

<i>Cantidad de AS (%) de la membrana</i>	<i>Ordenada en el origen</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Coefficiente de correlación</i>
<i>0,15</i>	10,4239	11,6230	0,9942
<i>0,25</i>	4,9360	18,7228	0,9990
<i>0,35</i>	-14,7768	26,5442	0,9987
<i>0,50</i>	-15,5747	35,1903	0,9994
<i>0,75</i>	-34,7061	47,8999	0,9993
<i>1,00</i>	-34,6252	55,3660	0,9983

Idéntico comportamiento se observa cuando se emplea la placa en este tipo de ensayos de difusión. Sin embargo, con este dispositivo de cesión, los coeficientes de correlación de los datos a esa cinética son peores, en todos los casos, a los que se obtienen cuando se utiliza para el ensayo de cesión de AS las celdas de Franz modificadas; esto se puede comprobar al comparar los datos que aparecen en la Tabla 5.25 con los de la Tabla 5.27.

Por tanto, a partir de los datos de cesión de AS obtenidos con las distintas membranas, se observa que el porcentaje de ASm sí influye, significativamente, en la velocidad de transferencia del AS contenido en la membrana, independientemente del tipo de célula de difusión que se utilice para el ensayo: placa o celda de Franz modificada. No obstante, con objeto de dilucidar si el dispositivo utilizado en los

Membranas Tipo II

ensayos de difusión de AS, más concretamente, si su superficie, influye en la liberación del AS contenido en la membrana, se realiza el análisis estadístico de los datos de cantidades de AS, normalizadas por la superficie de cesión de la placa o la celda de Franz ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) utilizadas en los ensayos de cesión.

Al realizar el ANOVA correspondiente, se obtiene como resultado que $p < 0,05$, lo que indica que existen diferencias, estadísticamente significativas, en las cantidades de AS que se transfieren desde las membranas tipo II al utilizar la placa o la celda de Franz modificada como célula de diálisis. Por lo tanto, el tipo de dispositivo de difusión que se utilice (Placa o celda de Franz) para realizar los ensayos de cesión de AS desde cada una de estas membranas influye, significativamente, en los resultados de cesión que se obtienen, siempre y cuando el contenido en AS de la membrana sea mayor de 0,25% ASm. Para las membranas con menor contenido en AS no existen diferencias, estadísticamente significativas, en la cesión del componente activo al utilizar la placa o la celda de Franz, como células de diálisis en los ensayos de cesión del AS.

5.5.2.- Influencia del volumen del líquido de la Fase receptora que se emplea en los ensayos de cesión del ácido salicílico

Los valores de cesión de AS obtenidos al utilizar la **placa** Petri como célula de difusión y un volumen de **300 ml de líquido receptor**, se representan en las *figuras* 5.23 y 5.24. El comentario de los resultados obtenidos se ha realizado en el epígrafe 5.6.1.1 de esta memoria, por lo que, a continuación se comentan únicamente los resultados obtenidos en los ensayos de cesión de AS desde las membranas tipo II, utilizando esa misma **placa y un volumen de 600 ml de líquido receptor**.

El duplicar el volumen de la fase receptora que se utiliza en los primitivos ensayos de cesión, es con el fin de estudiar si el volumen de líquido receptor influye en la cesión del AS porque se produzca la saturación en p.a. de los 300 ml de fase receptora que se emplea en esos primitivos ensayos y sea ese el motivo de que no se produzca una mayor liberación de AS a partir de las membranas que contienen porcentajes más alto de AS (superiores a 0,25% de ASm). Por este motivo se realizan estos ensayos de cesión con las membranas de 0,35%- 0,50%- 0,75 % ó 1,00% ASm, utilizando 600ml de tampón fosfatos de pH 7,0 como fase receptora.

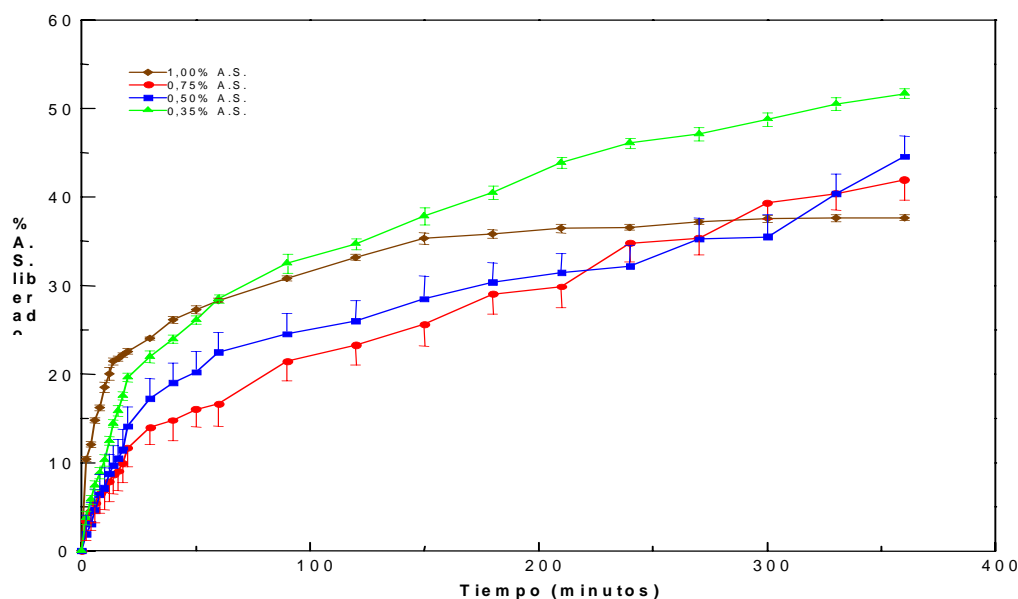
 Membranas Tipo II


Figura 5.29. Porcentajes de AS cedidos a 600 ml de fase receptora en función del %AS que forma parte de las membranas tipo II utilizando como célula de diálisis la PLACA.

Si se representan los datos de porcentajes de AS cedidos en los 600 ml de fase receptora a los distintos tiempos de toma de muestra, se obtiene la *figura 5.29* en la que en ordenadas se representan los porcentajes de AS cedidos desde las distintas membranas tipo II que contienen 0,35%-0,50%-0,75% ó 1,00% de ASm, frente a los tiempos de toma de muestra, en abscisas.

Cuando el volumen de fase receptora se incrementa hasta **600 ml**, se observa lo mismo que cuando la fase receptora es 300 ml. La máxima cantidad de ácido salicílico que se libera de la membrana (**51,71%**) se obtiene con la membrana que contiene el menor porcentaje de ácido salicílico (**0,35% ASm**), mientras que la mínima liberación de AS (**37,66%**) se obtiene con la membrana que lleva **1,00% ASm**.

Con el fin de analizar si la proporción de AS, que entra a formar parte de cada una de esas membranas, es un factor influyente en la cesión del ácido salicílico a 600 ml de fase receptora, se realiza el análisis estadístico de los datos (ANOVA) de los valores de cesión de AS, desde las distintas membranas tipo II cuando se utilizan **600 ml de líquido receptor** en el dispositivo de ensayo.

Membranas Tipo II

De los datos obtenidos ($p < 0,05$) se concluye que también con este volumen de líquido hay diferencias, estadísticamente significativas, en la cesión del AS a partir de las membranas tipo II, dependiendo de la membrana que se emplee en el ensayo. Se observa que al incrementar la cantidad de ASm de la membrana, disminuye el porcentaje de AS transferido desde la misma a los 600 ml de fase receptora contenidos en el cristizador del dispositivo de cesión.

Luego, de los resultados obtenidos en los ensayos de cesión con **600 ml de líquido receptor** se deduce que, como en el caso en que se utilizan **300 ml de fase receptora**, el porcentaje de AS que compone la membrana sí es un factor que influye, significativamente, en la liberación del ácido salicílico contenido en la membrana y así, cuanto mayor es el (%) de ASm, menor es el porcentaje que se libera de AS en los 600 ml de fase receptora.

En la figura 5.29, también se puede ver que la velocidad de cesión del AS en un volumen de **600 ml de líquido receptor**, es muy rápida en los veinte minutos iniciales del ensayo, lo mismo que ocurre cuando se emplean **300 ml del mismo líquido**. En ese periodo, las velocidades de cesión de AS aumentan al incrementarse el porcentaje de ASm (Tabla 5.28). Después de transcurrir esos veinte primeros minutos, y hasta el final del ensayo, la cesión del AS desde la membrana se hace más lenta, la velocidad de cesión es mucho menor, como se puede ver en esa misma tabla, donde se recogen las ecuaciones de las rectas de regresión que se obtienen del ajuste de los datos experimentales a esas dos cinéticas de cesión: rápida y lenta.

 Membranas Tipo II

Tabla 5.28.- Ecuaciones de los trazados rectilíneos ($y=b+mx$) que se obtienen al ajustar los datos experimentales de cantidades $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ de AS cedidas, en un volumen de 600 ml de líquido receptor, a dos cinéticas de cesión (*rápida*: 2-20 minutos y *lenta*: 20-360 minutos)

<i>Porcentaje de A.S.</i>	<i>Tramos Rectilíneos (minutos)</i>	<i>Ordenada en el origen</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Coefficiente de Correlación</i>
0,35	2-20	70,578	29,943	0,9991
	20-360	752,045	3,202	0,9787
0,50	2-20	37,229	31,317	0,9936
	20-360	792,467	3,640	0,9819
0,75	2-20	204,244	30,956	0,9935
	20-360	866,666	6,595	0,9941
1,00	2-20	546,560	37,729	0,9669
	20-360	1364,500	2,267	0,9108

Sin embargo, en ambas cinéticas se aprecia un aumento de los valores de velocidad de cesión conforme se incrementa el porcentaje de ASm.

Ese comportamiento es similar al que se produce cuando el volumen de fase receptora es de 300 ml. Pero al contrario de lo que ocurre en ese caso, cuando el volumen de fase receptora que se utiliza es 600ml, los valores de velocidades de cesión rápida obtenidos para cada membrana no están directamente relacionados con el contenido en ASm y, por tanto, no se puede establecer una ecuación que relacione ambos parámetros, como ocurre cuando se emplean 300 ml de fase receptora en los ensayos de cesión con este tipo de membranas (ecuación 5.2).

Los porcentajes de cesión de AS a **600 ml de fase receptora** son el doble de los que se obtienen cuando ese volumen es de **300 ml**; así, por ejemplo, para la membrana tipo II que contiene un 0,35% de ASm el porcentaje de fármaco que se cede es **25,98%** cuando se utilizan 300 ml de fase receptora y **51,71%** cuando el volumen de fase receptora se incrementa hasta 600 ml (Tabla 5.29).

 Membranas Tipo II

Tabla 5.29.- Porcentajes de cesión de ácido salicílico obtenidos al finalizar el ensayo (t = 360 minutos) con cada una de las membranas de tipo II estudiadas utilizando la PLACA como célula de diálisis y 300 ó 600ml de fase receptora.

<i>Porcentaje (%) de AS en membrana</i>	<i>Cesión de AS (%) en un volumen= 300 ml de Líquido receptor</i>	<i>Cesión de AS (%) en un volumen= 600 ml de Líquido Receptor</i>
<i>0,15</i>	28,67	-
<i>0,25</i>	20,55	-
<i>0,35</i>	25,98	51,71
<i>0,50</i>	21,39	44,56
<i>0,75</i>	24,84	41,95
<i>1,00</i>	18,85	37,66

Para dilucidar si esas diferencias en los valores de cesión obtenidos son estadísticamente significativas, se realiza, como en casos precedentes, el análisis estadístico de los datos de cesión, utilizando como variables los dos valores de fase receptora (300 ó 600 ml) que se ensayan con esas membranas tipo II.

Tras la realización del ANOVA se obtiene un valor de $p < 0,05$, que indica que sí existen diferencias, estadísticamente significativas, en la cesión del AS desde las membranas tipo II al utilizar un volumen u otro de líquido receptor. En todos los casos estudiados, la cesión de AS desde las membranas de ASm depende del volumen de fase receptora que se utilice en esos ensayos de cesión. A mayor volumen de fase receptora se produce mayor porcentaje de cesión de AS a partir de esas membranas tipo II. La cesión es mayor cuando se utiliza un volumen de 600 ml de líquido receptor que cuando se emplean 300 ml.

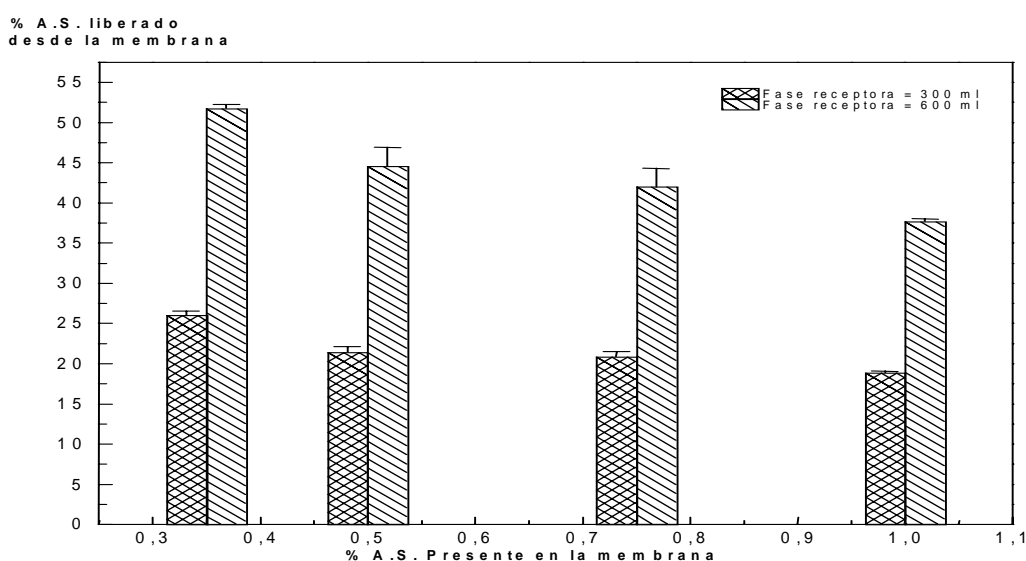
Además se observa que las diferencias en los porcentajes de cesión de AS son más acusadas cuanto mayor es el porcentaje de ASm. Esto es lógico puesto que, sobre todo en las membranas con un alto porcentaje de ASm (0,75% ó 1,00% de ASm) al utilizar un volumen de fase receptora pequeño ($V=300\text{ml}$) puede ocurrir que no se cumplan las condiciones “sink” a lo largo de todo el tiempo que dura el ensayo.

 Membranas Tipo II

Luego el volumen de fase receptora que se emplea en los ensayos de cesión de AS a partir de membranas tipo II, es un factor muy influyente y, por tanto hay que controlarlo, sobre todo cuando se emplean en los ensayos las membranas con porcentajes elevados de ASm.

Por último, en la *figura 5.30* se comparan, mediante un diagrama de barras, los porcentajes de AS liberados desde cada membrana, en un volumen de **300 ó 600 ml de líquido receptor**, al finalizar el ensayo ($t= 360$ minutos) (ver Tabla 5.29).

Figura 5.30 *Porcentajes de AS cedidos, al cabo de 360 minutos de ensayo, desde membranas tipo II con 0,35%-0,50%-0,75% ó 1,00% de AS utilizando la PLACA como célula de difusión y 300 ml ó 600ml de tampón fosfatos de pH 7,0 como fluido receptor.*



Al representar los porcentajes de AS liberados después de 360 minutos de ensayo frente al porcentaje de AS que se utiliza en la preparación de las correspondientes membranas tipo II, se obtienen los trazados rectilíneos que se recogen en la *figura 5.31*. Cada una de esas rectas corresponde al ajuste de los datos experimentales obtenidos con cada uno de los dos volúmenes de fase receptora que se emplea en cada caso (300 ó 600 ml).

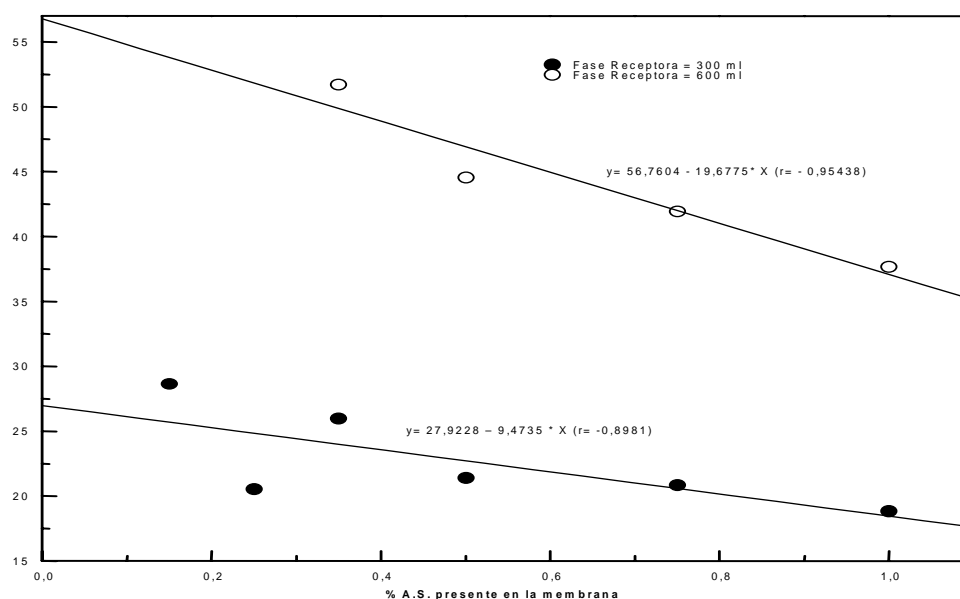
 Membranas Tipo II


Figura 5.31 Representación de porcentaje de AS liberado al finalizar el ensayo ($t=360$ minutos) en función del porcentaje de ASm al utilizar 300 ó 600 ml de líquido receptor y la PLACA como célula de diálisis.

Las ecuaciones correspondientes a esos ajustes (ecuaciones 5.5 y 5.6, respectivamente) son:

$$\% \text{ AS cedido a 300 ml de Fase receptora} = 27,9228 - 9,4735 (\%) \text{ AS en membrana} \\ (r=-0,8981) \quad (\text{Ec. 5.5})$$

$$\% \text{ AS cedido a 600 ml de Fase receptora} = 56,7604 - 19,6776 (\%) \text{ AS en membrana} \\ (r = -0,9544) \quad (\text{Ec. 5.6})$$

Como se puede ver la relación que se establece a partir de ambas rectas es, que a mayor cantidad de ácido salicílico en membrana, menor es el porcentaje de AS que se libera a fase receptora, independientemente del volumen de líquido receptor utilizado en el ensayo. Además, a mayor volumen de fase receptora, más alto es el porcentaje de ácido salicílico liberado desde ese tipo de membranas, como se ha comentado anteriormente

Al comparar las pendientes de las rectas de regresión de la *figura 5.31* (fase receptora 300 ml ó 600 ml) se ve como la pendiente del trazado lineal correspondiente a la cesión del ácido salicílico a un volumen de 600 ml de fase receptora (-19,6776) es el doble de la pendiente del trazado correspondiente al volumen de 300 ml de fase receptora (-9,4735); es decir, al incrementar el volumen hasta dos veces ($V=600\text{ml}$) del que se emplea inicialmente ($V=300\text{ml}$), la pendiente del trazado lineal también se incrementa en la misma cuantía: aumenta el doble.

Membranas Tipo II

Capítulo 6 ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA “In Vitro” DE Ac. SALICILICO A TRAVES DE MEMBRANAS TIPO I o TIPO II y EPIDERMIS HUMANA

Una vez que se realiza la caracterización de las membranas sintéticas (Tipo I y Tipo II) preparadas en el laboratorio y utilizadas como barrera de separación entre las fases dadora y receptora de los ensayos de cesión comentados en los capítulos 4 y 5, respectivamente, se dedica el presente capítulo al estudio de la influencia de la membrana sintética en la transferencia del AS a través de membranas naturales, utilizando para ello, epidermis aislada de muestras de piel humana.

Por lo tanto, para establecer la influencia del tipo de membrana sintética en el proceso de transferencia del AS a través de la piel humana, en este capítulo se lleva a cabo el estudio de la cesión del AS utilizando como membranas de difusión:

- 1.- solo la epidermis obtenida a partir de piel humana
- 2.- epidermis humana + una de las membranas tipo I
- 3.- epidermis humana + una de las membranas tipo II

Las membranas naturales se obtienen a partir de muestras de piel humana extraídas de operaciones quirúrgicas efectuadas en un hospital de Madrid.

6.1. Preparación de las membranas naturales para los ensayos de cesión:**Aislamiento de la epidermis de las muestras de piel humana**

La piel humana obtenida de operaciones quirúrgicas de mama, o de abdomen, efectuadas en un hospital madrileño, se trata por el método del calor de *Kligman* y *Christophers* (1964) para extraer la epidermis humana.

El método, someramente, consiste en poner la piel sobre un soporte adecuado y retirar la grasa subcutánea cuidadosamente. A continuación, la piel se sumerge durante 90 segundos en agua destilada previamente calentada a 60°C. Transcurrido este tiempo se saca del agua y se procede a separar la dermis de la epidermis con ayuda de unas pinzas quirúrgicas. Las muestras de epidermis humana así obtenidas se pueden utilizar inmediatamente o guardarlas congeladas en el frigorífico, hasta su utilización.

6.2. Dispositivo utilizado en los ensayos de cesión a través de epidermis humana (membrana natural) y membranas sintéticas (tipo I o tipo II)

El dispositivo que se emplea para llevar a cabo estos ensayos es el que se describe en el apartado 4.4.2 de esta memoria (ver figura 4.2). En todos los casos ensayados se utilizan las celdas de Franz modificadas.

Se escoge la celda de Franz frente a la placa como celda de difusión por diferentes motivos:

II y Epidermis Humana

1º) por la facilidad en el montaje del dispositivo, ya que las muestras de epidermis se pueden colocar más fácilmente y con mayores garantías de integridad;

2º) porque su superficie es más representativa de la realidad, del tamaño final que debería tener el sistema transdérmico que se fabricase con la/s membrana/s seleccionada/s y

3º) y fundamental, por ser las que presentan menor disparidad en los resultados obtenidos en los ensayos de cesión efectuados con los dos tipos de membranas sintéticas (Tipo I y II) estudiadas y comentadas anteriormente (capítulos 4 y 5, respectivamente). De este modo, la variabilidad en los resultados que se obtengan, se deberá, sobre todo y fundamentalmente, al distinto comportamiento de la membrana en los procesos difusionales del AS a través de la epidermis humana.

Los elementos que separan ambas fases, dadora y receptora, a través de los cuales se realiza la transferencia del componente activo, son: la epidermis aislada, o la epidermis aislada + la membrana sintética objeto de estudio. El montaje del dispositivo se realiza del siguiente modo: una vez colocada la epidermis en la celda de Franz, se sitúa encima, con mucho cuidado, la membrana sintética a ensayar. Ambas membranas se sujetan a la celda con teflón y si la membrana es de tipo I, encima de ella se coloca la emulsión O/A.

Cuando la membrana a estudiar es tipo II, la propia membrana actúa como fase dadora en los procesos de transferencia del AS ya que el ácido salicílico está físicamente incorporado en la membrana y de ahí se cede, atravesando la epidermis humana, a la fase receptora.

En todas las experiencias los intervalos de toma de muestra, han sido los mismos, y se eligen en función de la evolución del proceso de cesión. La primera muestra se extrae a las 4 horas de comenzado el ensayo, porque en experimentos previos se observó que antes de este tiempo no se liberaba nada de AS. Desde las 4 a las 12 horas de ensayo, las muestras se toman cada hora y la última muestra se toma a las 24 horas de comenzado el ensayo. En total se toman 10 muestras con lo que obtenemos los datos suficientes para definir adecuadamente la curva de transferencia del AS a través de esas membranas.

El resto de condiciones experimentales empleadas en estos estudios, se mantienen constantes a lo largo del desarrollo del mismo, así como la técnica utilizada en la determinación del AS que atraviesa la membrana. Todo ello aparece resumido en la tabla 4.2 y descrito en el apartado 4.4.2 de esta memoria.

6.3. Influencia de la membrana en la transferencia del AS a través de la piel

Con objeto de dilucidar la posible influencia del tipo de membrana sintética utilizada, en los estudios de transferencia del AS a través de la piel, se realizan tres tipos de ensayo:

- 6.3.1.- utilizando solo la epidermis aislada de la piel humana
- 6.3.2.- utilizando epidermis humana + una de las membranas tipo I
- 6.3.3.- utilizando epidermis humana + una de las membranas tipo II

De este modo, si se observan diferencias en los valores de AS que acceden a la fase receptora se deberán, fundamentalmente, al diferente comportamiento en el proceso de transferencia del AS a través de la piel, de la membrana en sí.

6.4.- RESULTADOS

Como en los capítulos anteriores, los experimentos se realizan, al menos por triplicado. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en tablas y representados en las figuras correspondientes.

En las distintas columnas de las tablas siguientes aparecen:

- Tiempo de toma de muestras expresado en horas. Desde 4 a 24 horas.
- Cantidad de ácido salicílico que llega a fase receptora, Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
- Media (valor medio) y desviación estándar de los valores de Q

6.4.1. Resultados obtenidos al ensayar exclusivamente la membrana natural, la epidermis humana: Tabla 6.1 y *Figura 6.1*

6.4.2. Resultados obtenidos al ensayar la epidermis humana con cada una de las membranas Tipo I: Tablas 6.2-6.5 y *Figuras 6.2-6.5*

6.4.3. Resultados obtenidos al ensayar la epidermis humana con cada una de las membranas Tipo II: Tablas 6.6-6.11 y las correspondientes *Figuras 6.6-6.11*

6.4.4. TRATAMIENTO DE DATOS

El tratamiento de los datos experimentales de transferencia de AS a través de la piel o a través de ésta + una membrana tipo I ó II, se realiza del mismo modo que se hace en los capítulos 4 y 5, aplicando el análisis estadístico a los mismos.

Se utiliza el factor de similitud, f_2 , como análisis de comparación estadística de los perfiles de liberación “in vitro” que se obtienen en los distintos casos ensayados. Además, también se realiza el análisis estadístico ANOVA y t- Student cuando se necesita.

Los resultados obtenidos, para cada condición ensayada, se representan en gráficas. En el eje de ordenadas, las cantidades acumuladas de fármaco cedido (AS) en las distintas condiciones de ensayo, expresadas en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, y en abscisas, los tiempos de toma de muestra expresados en minutos.

Tabla 6.1.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con Epidermis Humana utilizando Celdas de Franz modificadas

Tiempo (horas)	Q($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 1	Q($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 2	Media \pm DE
4	169,503	174,714	172,11 \pm 3,69
5	195,559	200,771	198,16 \pm 3,71
6	216,405	216,405	216,40 \pm 0,00
7	237,250	232,039	234,64 \pm 3,70
8	263,307	263,307	263,31 \pm 0,00
9	284,152	289,363	286,76 \pm 3,68
10	304,997	304,997	305,00 \pm 0,00
11	325,843	331,054	328,45 \pm 3,69
12	351,899	357,111	354,51 \pm 3,70
24	476,972	482,183	479,58 \pm 3,65

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

II y Epidermis Humana

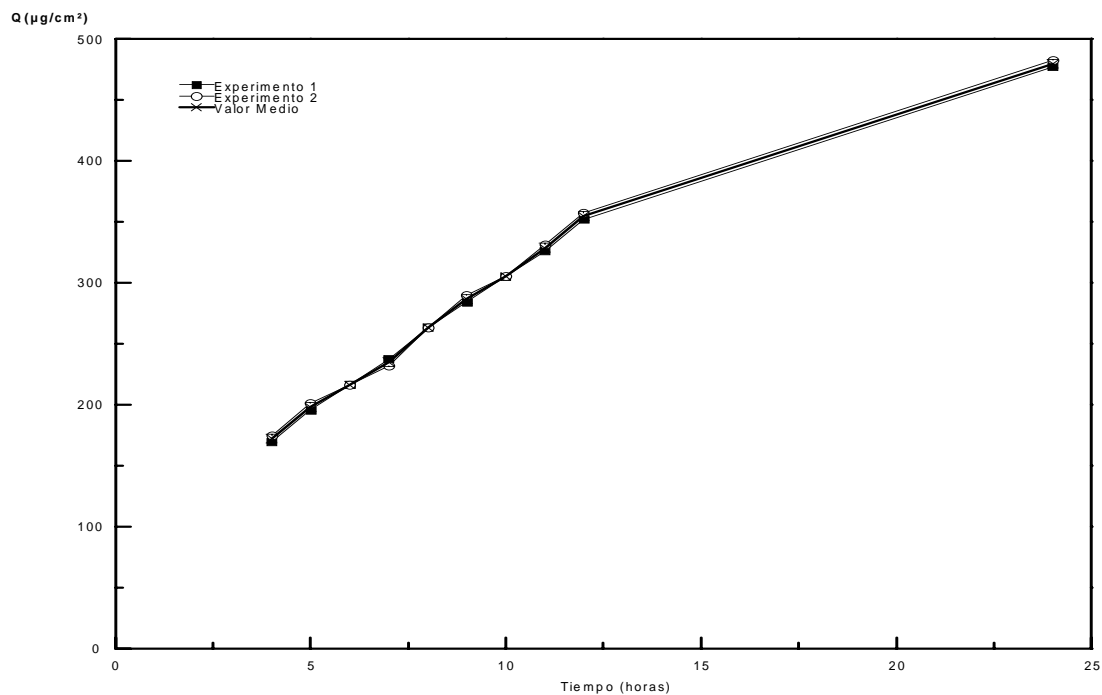


Figura 6.1.- Cantidades acumuladas Q (µg/cm²) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando Epidermis Humana en Celdas de Franz modificadas.

Tabla 6.2.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I conteniendo 0,65 g. de AR y Epidermis Humana utilizando Celdas de Franz modificadas.

Tiempo (horas)	Q(µg/cm²) 1	Q(µg/cm²) 2	Q(µg/cm²) 3	Media ± DE
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	2,7397	2,7397	7,951	4,48 ± 3,01
8	7,9510	7,9510	13,162	9,69 ± 3,01
9	18,3737	13,1624	23,585	18,37 ± 5,21
10	28,7964	23,5850	34,008	28,80 ± 5,21
11	39,2191	28,7964	44,430	37,48 ± 7,96
12	54,8531	44,4304	54,853	51,38 ± 6,02
24	185,1366	174,7139	190,348	183,40 ± 7,96

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

Figura 6.2.- Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo I conteniendo 0,65g de Aceite de Ricino (AR) y Epidermis Humana en Celdas de Franz modificadas.

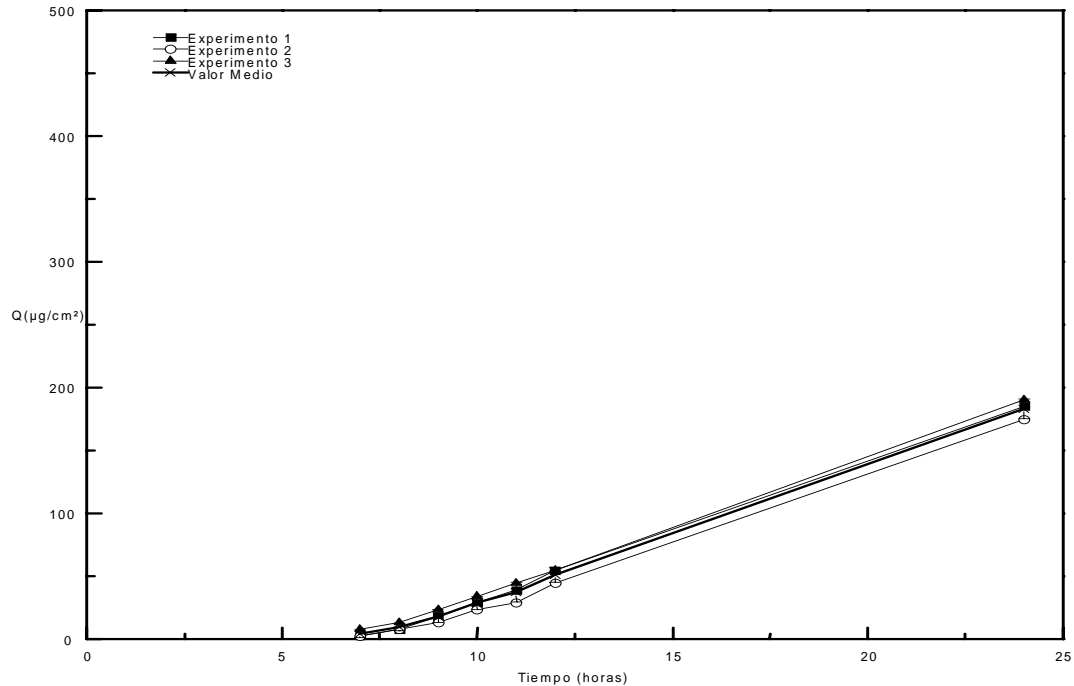


Tabla 6.3.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I conteniendo 0,75 g. de AR y Epidermis Humana utilizando Celdas de Franz modificadas.

Tiempo (horas)	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 1	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 2	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 3	Media \pm DE
4	—	—	—	—
5	2,740	7,951	13,162	$7,95 \pm 5,20$
6	13,162	13,162	18,374	$14,90 \pm 3,00$
7	28,796	39,219	34,008	$34,01 \pm 5,21$
8	49,642	65,276	54,853	$56,59 \pm 7,96$
9	60,064	70,487	65,276	$65,28 \pm 5,22$
10	80,910	80,910	86,121	$82,65 \pm 3,01$
11	96,544	112,178	101,755	$103,49 \pm 8,00$
12	112,178	122,601	112,178	$115,65 \pm 6,02$
24	247,673	258,095	252,884	$252,88 \pm 5,23$

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

II y Epidermis Humana

Figura 6.3.- Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo I conteniendo 0,75g de Aceite de Ricino (AR) y Epidermis Humana en Celdas de Franz modificadas.

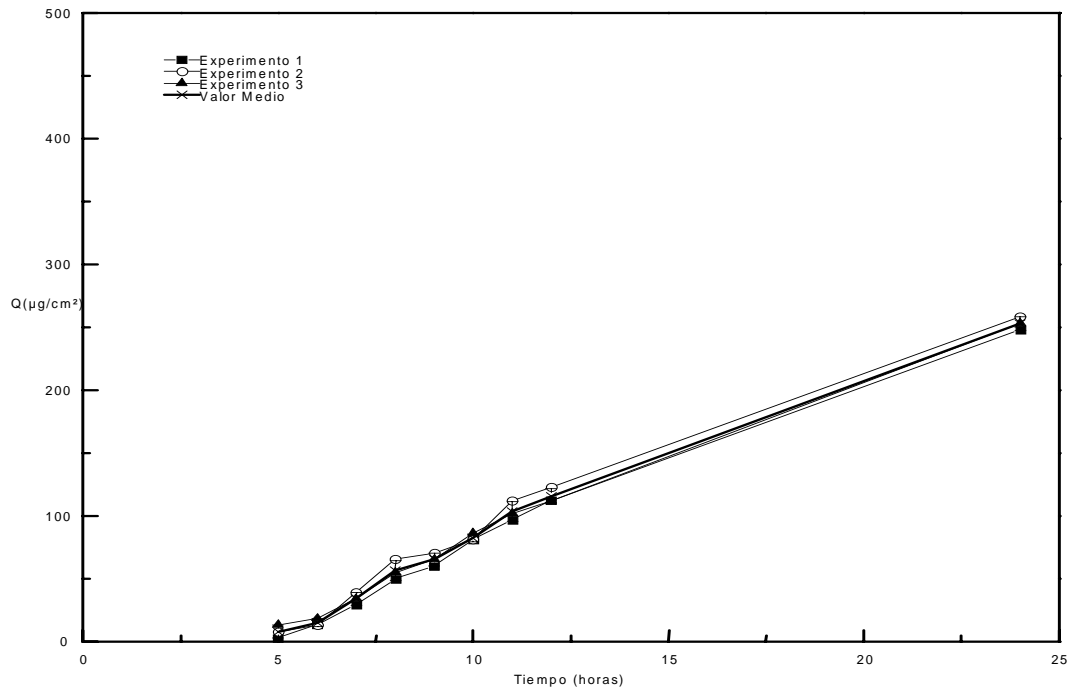


Tabla 6.4.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I conteniendo 0,85 g. de AR y Epidermis Humana utilizando Celdas de Franz modificadas.

Tiempo (horas)	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 1	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 2	Media \pm DE
4	13,162	7,951	10,56 \pm 3,70
5	39,219	34,008	36,61 \pm 3,68
6	54,853	49,642	52,25 \pm 3,69
7	75,698	70,487	73,09 \pm 3,67
8	96,544	91,332	93,94 \pm 3,65
9	106,966	106,966	106,97 \pm 0,00
10	133,023	127,812	130,42 \pm 3,70
11	153,869	148,657	151,26 \pm 3,68
12	169,503	164,291	166,90 \pm 3,69
13	185,137	185,137	185,14 \pm 0,00
14	211,193	205,982	208,59 \pm 3,68
24	310,209	304,997	307,60 \pm 3,67

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

II y Epidermis Humana

Figura 6.4.- Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo I conteniendo 0,85g de Aceite de Ricino (AR) y Epidermis Humana en Celdas de Franz modificadas.

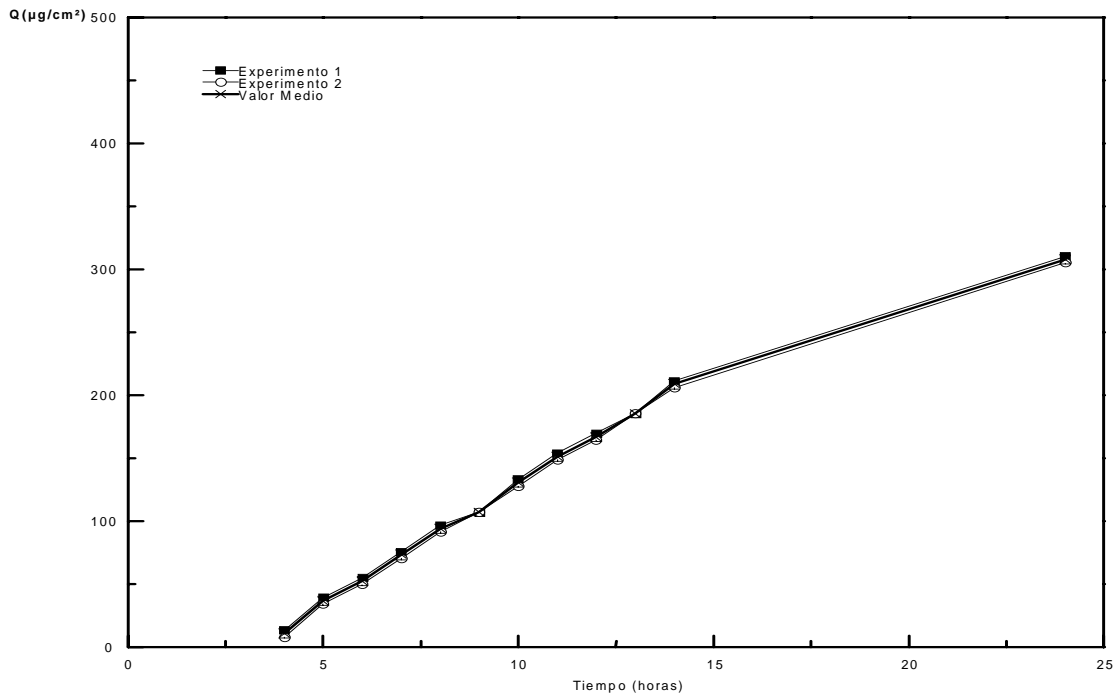


Tabla 6.5.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo I conteniendo 1,00 g. de AR y Epidermis Humana utilizando Celdas de Franz modificadas.

Tiempo (horas)	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 1	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 2	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 3	Media \pm DE
4	70,487	60,064	23,585	51,38 \pm 24,63
5	80,910	70,487	60,064	70,49 \pm 10,50
6	138,235	127,812	101,755	122,60 \pm 18,79
7	164,291	153,869	138,235	152,13 \pm 13,11
8	185,137	174,714	164,291	174,71 \pm 10,42
9	211,193	200,771	185,137	199,03 \pm 13,11
10	232,039	221,616	211,193	221,62 \pm 10,40
11	258,095	247,673	226,827	244,20 \pm 15,92
12	273,729	263,307	242,461	259,83 \pm 15,95
24	372,745	362,322	357,111	364,06 \pm 7,96

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

II y Epidermis Humana

Figura 6.5.- Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesi3n utilizando membranas tipo I conteniendo 1,00g de Aceite de Ricino (AR) y Epidermis Humana en Celdas de Franz modificadas.

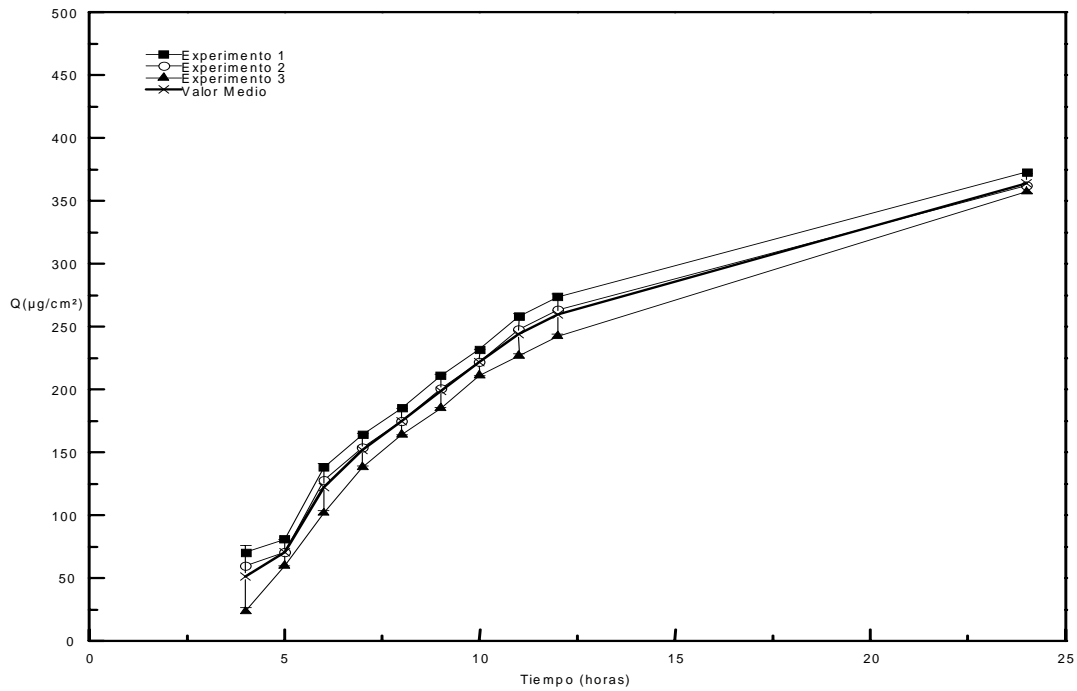


Tabla 6.6.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,15% de AS y Epidermis Humana utilizando Celdas de Franz modificadas.

Tiempo (horas)	Q($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 1	Q($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 2	Q($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 3	Media \pm DE
4	77,436	65,487	83,410	75,44 \pm 9,13
5	95,358	71,461	89,384	85,40 \pm 12,44
6	119,255	113,281	95,358	109,30 \pm 12,44
7	137,178	119,255	131,204	129,21 \pm 9,13
8	155,101	149,127	161,075	155,10 \pm 5,97
9	173,024	173,024	178,998	175,02 \pm 3,45
10	190,946	196,921	184,972	190,95 \pm 5,97
11	214,843	226,792	208,869	216,83 \pm 9,13
12	238,741	232,766	244,715	238,74 \pm 5,97
24	459,788	447,840	453,814	453,81 \pm 5,97

DE: Desviaci3n est3ndar de los datos obtenidos

II y Epidermis Humana

Figura 6.6.- Cantidades acumuladas Q (µg/cm²) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo II conteniendo 0,15% AS y Epidermis Humana en Celdas de Franz modificadas.

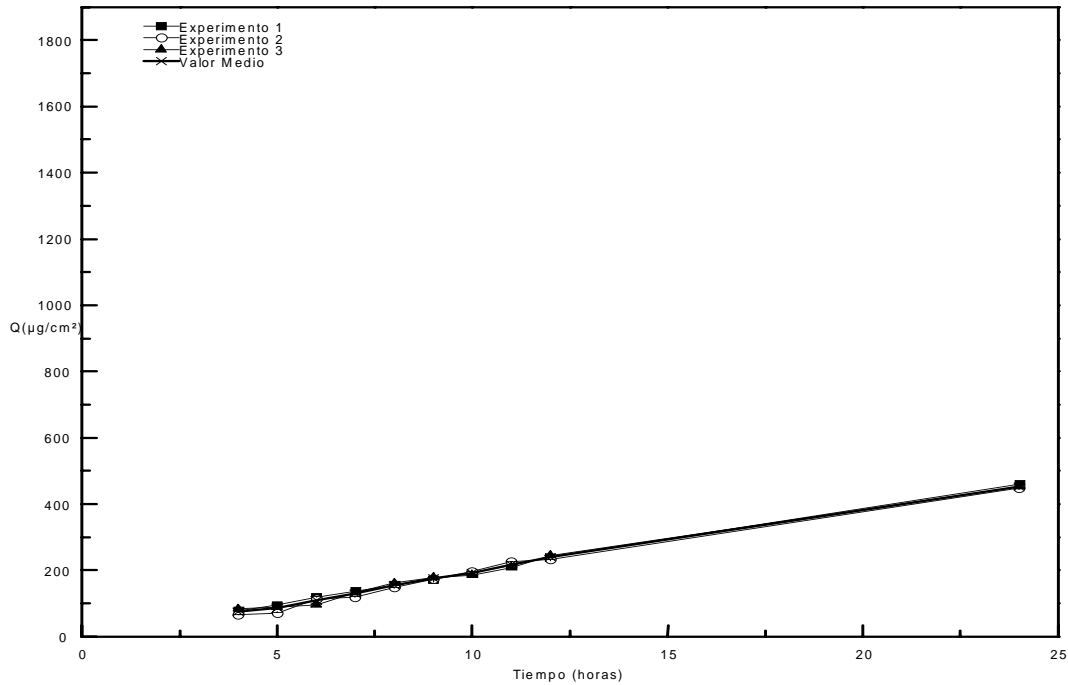


Tabla 6.7.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,25% de AS y Epidermis Humana utilizando Celdas de Franz modificadas.

Tiempo (horas)	Q(µg/cm²) 1	Q(µg/cm²) 2	Q(µg/cm²) 3	Media ± DE
4	149,127	125,230	137,178	137,18 ± 11,95
5	173,024	149,127	155,101	159,08 ± 12,44
6	202,895	190,946	196,921	196,92 ± 5,96
7	232,766	244,715	226,792	234,76 ± 9,13
8	262,638	268,612	256,663	262,64 ± 6,00
9	286,535	298,483	316,406	300,47 ± 15,03
10	316,406	310,432	328,354	318,40 ± 9,12
11	346,277	334,329	364,200	348,27 ± 15,00
12	376,148	382,123	370,174	376,15 ± 6,01
24	716,681	710,707	722,655	716,68 ± 6,00

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

II y Epidermis Humana

Figura 6.7.- Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo II conteniendo 0,25% AS y Epidermis Humana en Celdas de Franz modificadas.

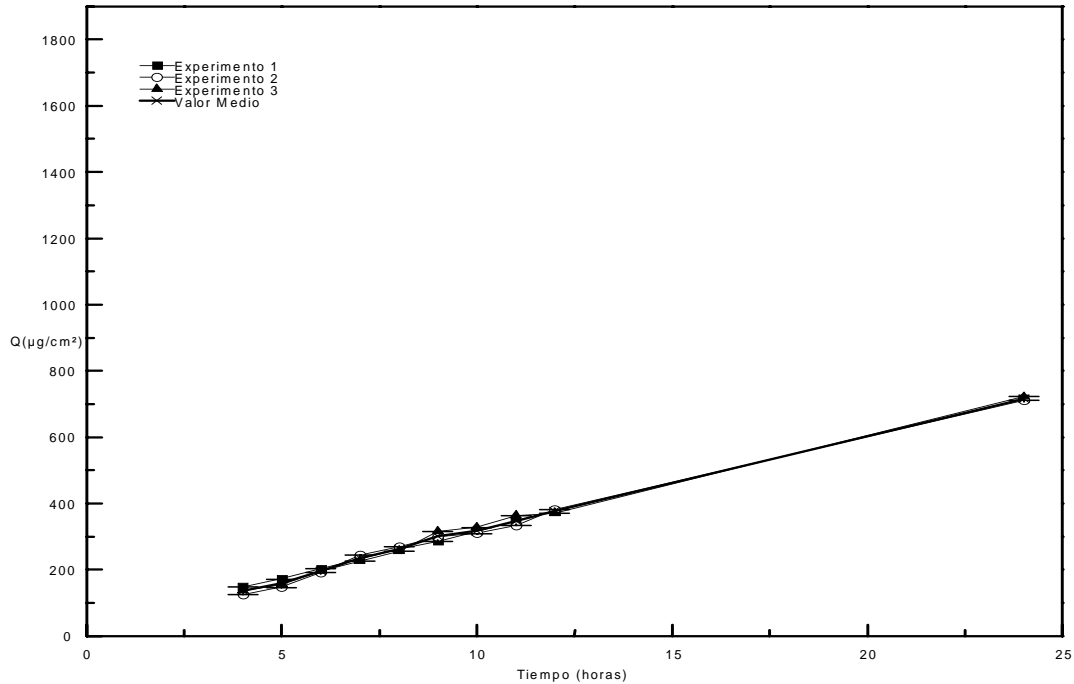


Tabla 6.8.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,35% de AS y Epidermis Humana utilizando Celdas de Franz modificadas

Tiempo (horas)	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 1	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 2	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 3	Media \pm DE
4	190,946	143,152	214,843	182,98 \pm 36,50
5	232,766	184,972	262,638	226,79 \pm 39,18
6	268,612	244,715	298,483	270,60 \pm 26,97
7	310,432	286,535	340,303	312,42 \pm 26,94
8	346,277	328,354	370,174	348,27 \pm 21,00
9	388,097	364,200	406,020	386,11 \pm 20,98
10	429,917	417,968	441,865	429,92 \pm 11,95
11	465,762	453,814	483,685	467,75 \pm 15,03
12	507,582	501,608	513,556	507,58 \pm 5,97
24	985,523	979,548	997,471	987,51 \pm 9,13

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

II y Epidermis Humana

Figura 6.8.- Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo II conteniendo 0,35% AS y Epidermis Humana en Celdas de Franz modificadas.

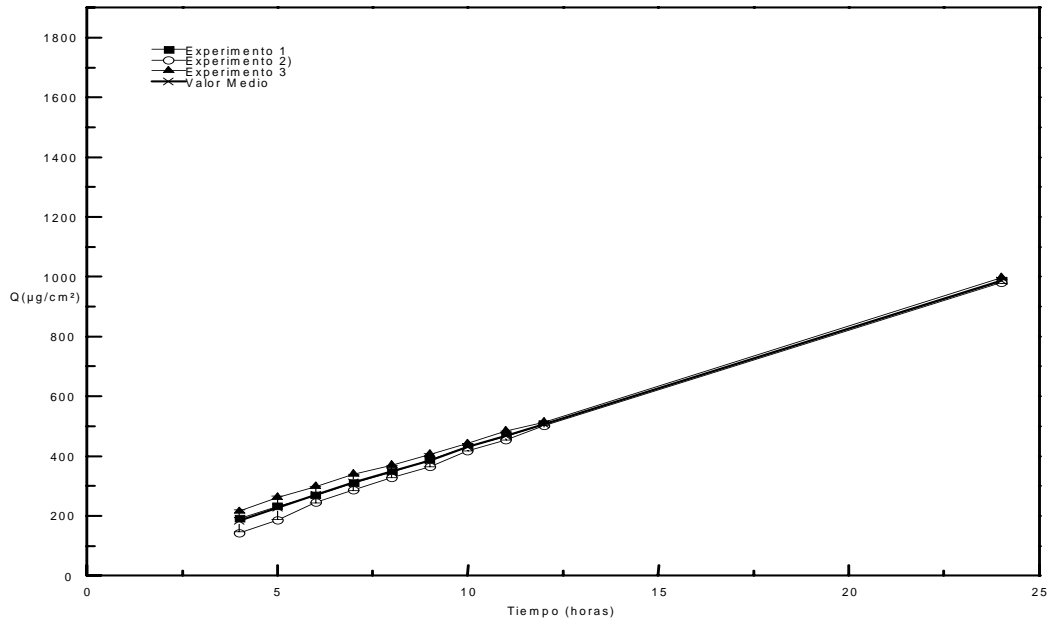


Tabla 6.9.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,50% de AS y Epidermis Humana utilizando Celdas de Franz modificadas

Tiempo (horas)	Q($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 1	Q($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 2	Q($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 3	Media \pm DE
4	238,741	214,843	256,663	236,75 \pm 21,01
5	286,535	262,638	304,457	284,54 \pm 20,98
6	340,303	292,509	358,226	330,35 \pm 33,97
7	388,097	358,226	400,045	382,12 \pm 21,54
8	441,865	423,942	453,814	439,87 \pm 15,03
9	495,634	477,711	513,556	495,63 \pm 17,92
10	543,428	525,505	555,376	541,44 \pm 15,03
11	597,196	585,247	609,144	597,20 \pm 11,95
12	650,964	639,016	656,939	648,97 \pm 9,13
24	1266,313	1260,339	1278,261	1268,30 \pm 9,14

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

II y Epidermis Humana

Figura 6.9.- Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo II conteniendo 0,50% AS y Epidermis Humana en Celdas de Franz modificadas.

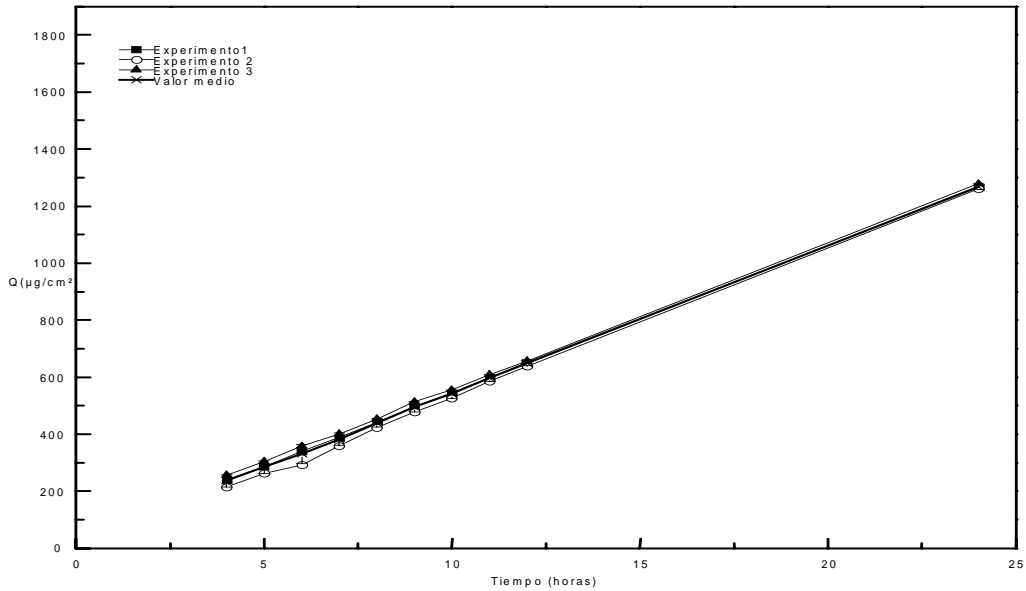


Tabla 6.10.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 0,75% de AS y Epidermis Humana utilizando Celdas de Franz modificadas.

Tiempo (horas)	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 1	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 2	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 3	Media \pm DE
4	334,329	280,560	364,200	326,36 \pm 42,38
5	400,045	376,148	441,865	406,02 \pm 33,26
6	477,711	447,840	507,582	477,71 \pm 29,87
7	549,402	513,556	567,325	543,43 \pm 27,38
8	621,093	597,196	650,964	623,08 \pm 26,94
9	698,758	674,861	722,655	698,76 \pm 23,90
10	770,449	740,578	782,398	764,48 \pm 21,54
11	848,115	836,166	860,063	848,11 \pm 11,95
12	925,780	919,806	937,729	927,77 \pm 9,13
24	1786,073	1780,099	1792,047	1786,07 \pm 5,97

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

II y Epidermis Humana

Figura 6.10.- Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesión utilizando membranas tipo II conteniendo 0,75% AS y Epidermis Humana en Celdas de Franz modificadas.

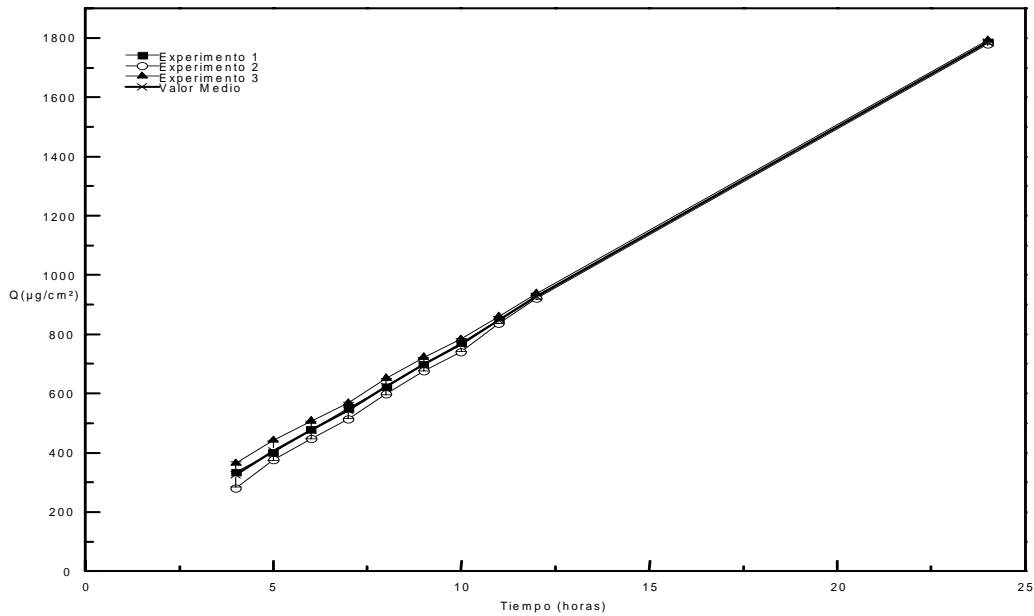


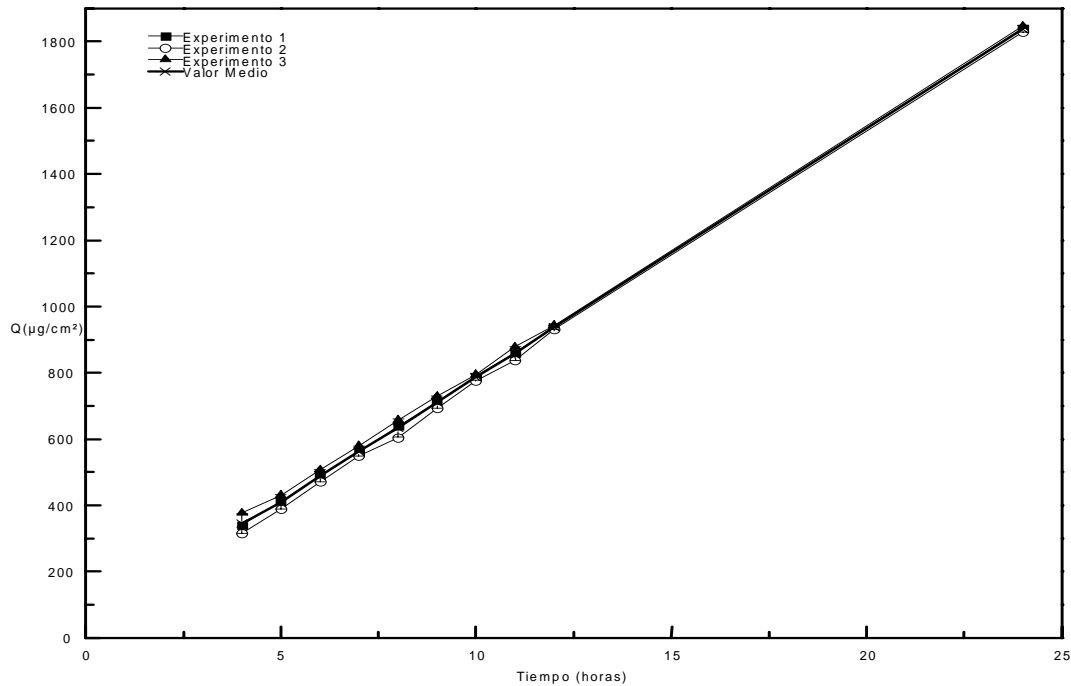
Tabla 6.11.- Cantidades acumuladas de AS en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra en los ensayos realizados con membranas tipo II conteniendo 1,00% de AS y Epidermis Humana utilizando Celdas de Franz modificadas.

Tiempo (horas)	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 1	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 2	$Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$ 3	Media \pm DE
4	340,303	316,406	376,148	344,29 \pm 30,07
5	411,994	388,097	429,917	410,00 \pm 20,98
6	489,659	471,737	507,582	489,66 \pm 17,92
7	561,350	549,402	579,273	563,34 \pm 15,03
8	639,016	603,170	656,939	633,04 \pm 27,38
9	710,707	692,784	728,630	710,71 \pm 17,92
10	788,372	776,424	794,346	786,38 \pm 9,13
11	860,063	836,166	877,986	858,07 \pm 20,98
12	937,729	931,754	943,703	937,73 \pm 5,97
24	1839,842	1827,893	1845,816	1837,85 \pm 9,13

DE: Desviación estándar de los datos obtenidos

II y Epidermis Humana

Figura 6.11.- Cantidades acumuladas Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS en Fase receptora en los ensayos de cesió utilizando membranas tipo II conteniendo 1,00% AS y Epidermis Humana en Celdas de Franz modificadas.



6.5. COMENTARIOS

6.5.1. Cesión de AS a través de membrana natural: epidermis humana

La representación gráfica de los resultados obtenidos al realizar los ensayos de cesión del AS, desde la emulsión O/A, a través de la epidermis humana aislada aparece recogida en la *Figura 6.1*.

Como se puede apreciar, el AS se transfiere rápidamente a través de la epidermis humana; no se aprecia periodo de latencia y al cabo de 12 horas de comenzar el ensayo ya se ha cedido un 32,54% de AS a fase receptora; después la cesión se hace más lenta y en las 12 horas siguientes sólo se cede un 10% más de AS.

Si se ajustan los datos experimentales de porcentaje de AS cedido a fase receptora a un trazado rectilíneo, la ecuación que definiría el proceso de transferencia de AS a través de epidermis humana sería (ecuación 6.1):

$$\% AS \text{ cedido} = 8,9748 + 1,6464 \text{ tiempo (horas)} \quad (r = 0,9394) \quad (\text{Ec. 6.1})$$

6.5.2. Cesión de AS a través de epidermis humana + una de las membranas de aceite de ricino Tipo I

Al representar los porcentajes de Ácido Salicílico liberado versus tiempo, a través de la epidermis humana más cada una de las cuatro membranas tipo I se observa que el trazado de los perfiles de cesión que se obtienen son similares; en todos los casos son curvas exponenciales (*figura 6.12*).

En la misma figura, se observa, que la cesión de AS a través de esas dos membranas (natural + artificial) es muy lenta en el inicio del ensayo presentando, en todos los casos, período de latencia, siendo más acusado en las membranas con menor contenido en AR; así por ejemplo, la membrana con 0,65g. de AR, ensayada conjuntamente con la epidermis, muestra el período de latencia más largo (6 horas), y el más corto (4 horas) se tiene con las membranas que se elaboran con 0,85 g. ó 1,00g de AR.

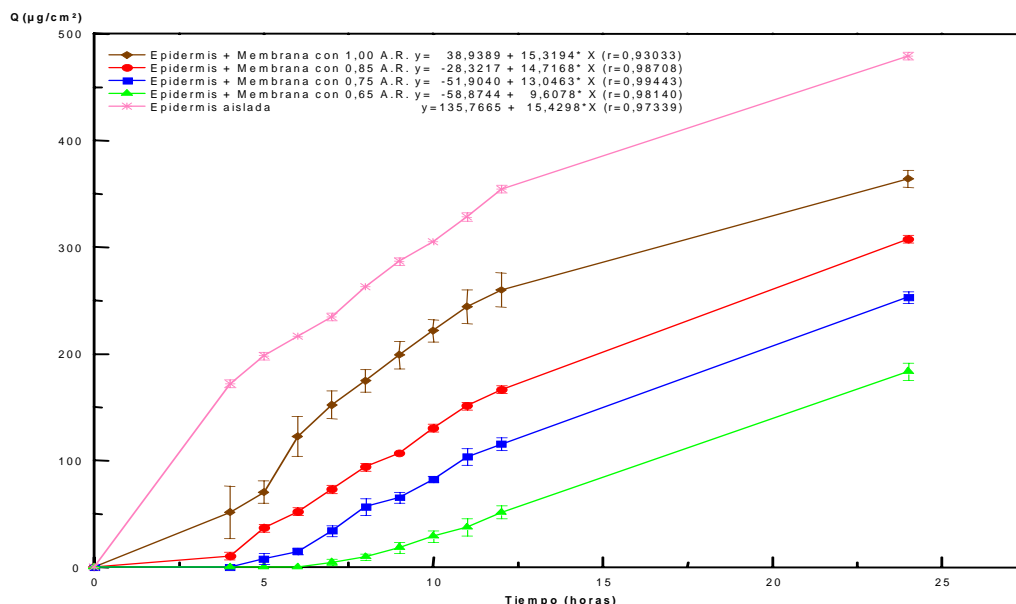


Figura 6.12 Perfiles de transferencia de AS a través de epidermis humana + cada una de las membranas de aceite de ricino tipo I

En la *figura 6.12* también se aprecia que las pendientes de las curvas que representan los porcentajes de cesión de AS a través del conjunto de membranas (epidermis + membrana tipo I de AR) se van incrementado a medida que se aumenta la cantidad de AR que compone la membrana; es decir, la transferencia del AS se incrementa al incrementarse la cantidad de AR en la membranas tipo I.

Si ajustamos esos datos experimentales a la ecuación de una recta se obtienen, para cada conjunto: epidermis humana + membrana tipo I, los parámetros que aparecen en la Tabla 6.12.

Tabla 6.12.- Parámetros obtenidos al ajustar a una recta los datos experimentales de porcentajes de AS cedidos a través de epidermis humana + membrana Tipo I de AR

<i>Cantidad de AR (g) en membranas tipo I</i>	<i>Ordenada en el origen</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Coefficiente de correlación</i>
0,65	-3,6746	0,7287	0,9380
0,75	-3,2411	1,0475	0,9774
0,85	-1,5537	1,2601	0,9866
1,00	2,4306	1,4362	0,9457

Al observar esos parámetros se ve que al ir incrementándose la cantidad de aceite de ricino en la membrana tipo I se produce un aumento paulatino, tanto de la pendiente como de la ordenada en el origen de esas rectas. Por tanto, *a priori*, parece que existe una relación entre cada uno de esos dos parámetros y la cesión del AS y de hecho, sí que existe, como se puede observar por las ecuaciones 6.2 y 6.3 donde se relacionan, respectivamente, las pendientes o las ordenadas al origen de esas rectas con la cantidad de AR en la membrana.

$$(\%)/\text{horas de AS cedido} = -0,4934 + 1,9834 \text{ AR (g)} \quad (r= 0,9730) \quad \text{Ec. 6.2}$$

$$(\%) \text{ AS cedido} = -16,0555 + 17,9026 \text{ AR (g)} \quad (r= 0,9609) \quad \text{Ec. 6.3}$$

Luego, en ambos casos ocurre que al aumentar la presencia de AR en la membrana tipo I aumenta significativamente la difusión de AS a través de ella y de la piel humana (epidermis humana).

Para ver si la relación entre cesión y contenido en AR de la membrana tipo I es estadísticamente significativa, se realiza el análisis estadístico de los datos de porcentaje de AS cedido a través de cada membrana tipo I y epidermis humana, mediante el análisis de la varianza (ANOVA).

El resultado del análisis estadístico ($p < 0.05$) nos indica que, en los ensayos de cesión del AS a través de la epidermis humana + cada una de las membranas tipo I estudiada sí existen diferencias, estadísticamente significativas, entre los valores de cesión de AS obtenidos con cada una de esas membranas + epidermis y el contenido en AR de la membrana, por lo que la cantidad de AR que lleve la membrana es un factor a tener en cuenta en los ensayos de cesión de AS puesto que dependiendo de la cantidad de AR con la que se haya elaborado la membrana, así será el porcentaje de AS liberado a través de ellas: a mayor cantidad de AR en la membrana tipo I, mayor es la cesión del fármaco a través de esas dos membranas (epidermis + membrana Tipo I).

También se observa, además de lo que ya se ha expuesto, que existe una relación lineal entre la cantidad de AR que compone la membrana y la cantidad de AS cedido. Esta relación lineal se recoge en la *figura 6.13* en la que se representan cantidades Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de AS cedidos tras 24 horas de ensayo, al utilizar cada una de las membranas, frente a las cantidades de AR (g) que llevan esas membranas. El trazado que se obtiene es una línea recta de ecuación 6.4:

$$Q (\mu\text{g}/\text{cm}^2) \text{ de AS} = -20,94766 + 47,76636 \text{ AR (g)} \quad (r = 0,9932) \quad \text{Ec. 6.4}$$

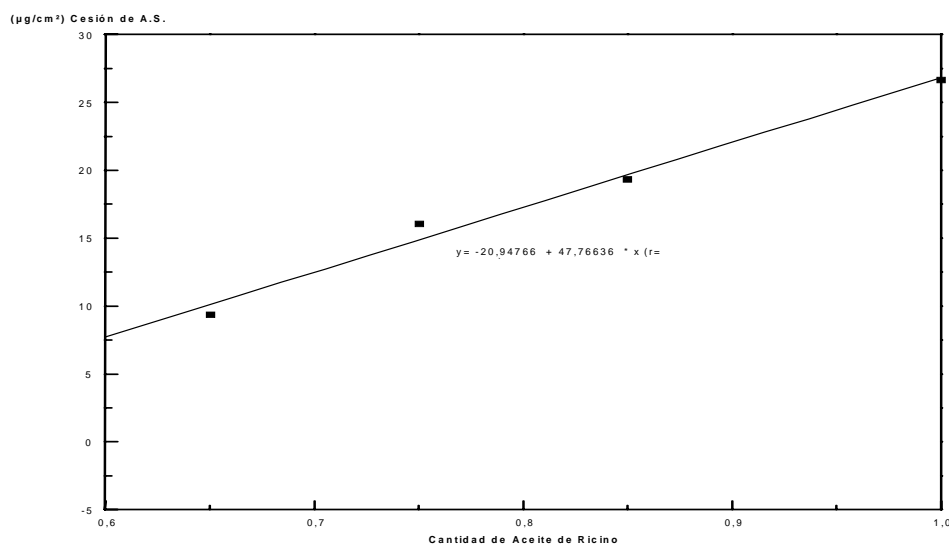


Figura 6.13 Relación entre cantidad de AS transferido a través de las dos membranas que forman el sistema a través del que se produce la cesión (epidermis humana +

***membrana Tipo I) y cantidad de aceite de Ricino que forma parte de la
membrana tipo I***

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores vemos que, por ejemplo, Murakami y col.,(1998) determinan por medio de microdiálisis, la concentración plasmática de AS en piel de rata (1cm^2), con y sin estrato córneo, durante 4 horas evaluando el efecto de cinco bases diferentes: base acuosoluble y oleaginosa, vaselina 100%, emulsión A/O y un ungüento absorbente (Vaselina 40%, laurmacrogol 0,5%, cera blanca 5%, sesquioleato de sorbitán 5%, cetanol 10%, parabeno 0,2% y agua purificada 39,3%). Los resultados indican que en piel intacta, la función barrera del estrato córneo en la base acuosoluble, es grande; moderada para la base oleaginosa y para la emulsión A/O y menor para el ungüento absorbente y la vaselina blanca; esto puede ser debido a que las bases de ungüentos forman un depósito o reservorio en el estrato córneo.

Cuando las bases de ungüentos son aplicados en la piel sin estrato córneo el AUC_{piel} para la base acuosoluble es muy grande, un pequeño incremento se observa para la base oleaginosa y para la emulsión W/O y, un insignificante incremento para la vaselina y el ungüento absorbente; esto puede ser debido a diferencias de liberación de AS desde ungüentos con fase acuosa y porque la actividad termodinámica del AS difiere según los diferentes ungüentos. Se obtienen relaciones lineales entre las concentraciones plasmáticas de AS y la raíz cuadrada del tiempo (por ejemplo para el ungüento absorbente r^2 es 0,9471 para un período de tiempo entre 0-2 horas)

Estos resultados implican que la liberación del AS desde esas formulaciones es básicamente explicada por una difusión tipo matriz, expresada por la ecuación de Higuchi.

Wester y col., 1998 comparan la absorción percutánea *in vitro* usando un sistema con piel de cerdo perfundida y aislada (IPPSF), con los alcanzados *in vivo* con estudios realizados en humanos. Después de 24 horas de ensayo, los porcentajes de dosis absorbidos son: $53,4 \pm 6,3\%$ en el hombre y $48,2 \pm 4,9\%$ en el sistema IPPSF. Al comparar estos valores con el porcentaje de AS liberado a través de epidermis humana en nuestro caso $42,83 \pm 0,70\%$ vemos como son valores similares. De lo anterior se deduce que el sistema IPPSF parece ser un buen modelo para predecir la absorción percutánea en el hombre.

II y Epidermis Humana

Singh P. y Roberts S., 1994, realizan experimentos con piel de cadáver separando la epidermis de la dermis, de la misma manera que lo hacemos nosotros y estudian la penetración del AS cuando el fármaco está completamente dissociado a pH 7,4 y cuando la ionización es un 50% (pH = pKa del compuesto). El máximo flujo encontrado para el A.S. es $352 \text{ mmol/cm}^2/\text{hr} \times 10^{-5}$ ($4,8576 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^2/\text{hr}$), al comparar este valor con nuestro flujo, que es $42,83\%/\text{hr}$ ($4,8389 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^2/\text{hr}$), vemos como los valores encontrados son similares. Para determinar la permeabilidad epidérmica de los compuestos se tiene en cuenta la lipofilidad y el tamaño molecular del compuesto

Esto mismos autores (Singh P y Roberts S., 1993a) han realizado experimentos in vitro en las mismas condiciones con A.S. y con epidermis humana; la penetración de solutos a través de la epidermis desde el producto aplicado, después de un período de latencia se produce con una velocidad constante. Los resultados que se obtienen son un coeficiente de permeabilidad de $0,015 \pm 0,003 \text{ cm/hr}$ (correspondiente a pH 3,1), un período de latencia de $0,42 \pm 0,11 \text{ hr}$, los cuales reflejan la difusión y el grosor de la epidermis. Aplicando el AS a pH 3,67 o 7,4 resulta disminución en el flujo y en el coeficiente de permeabilidad ($K_p = 0,007 \pm 0,001 \text{ cm/hr}$ a pH 3,67 y $0,0003 \pm 0,00005$ a pH 7,4). Dado que el A.S. es un ácido ($pK_a = 3,0$) en la forma no ionizada cualquier compuesto penetra mejor en la piel que la forma ionizada, los bajos flujos son obtenidos cuando el A.S. se aplica en una solución de pH 3,67 y 7,4. Estos autores concluyen que la absorción predominante del A.S. es en las primeras dos horas de aplicación y con un espesor de 3-4 mm. De esta explicación podemos ver como nuestros flujos son bajos ya que utilizamos un pH de 7,0, y que al igual que ellos nuestro perfil presentan un período de latencia.

Cheon y col., 1994 evalúan la permeabilidad de la piel in vitro de 16 fármacos con un amplio rango de lipofilidad, usando un vehículo binario etanol /agua (60/40) con y sin ácido láurico (A.L.), como promotor de absorción. En sus experimentos utilizan piel de ratón, $0,785 \text{ cm}^2$ de superficie, muestra de 5 ml, tampón fosfato pH 7,4, 37°C , las muestras las analizan por H.P.L.C.. Encuentran que la velocidad de permeación se incrementa cuando se produce un incremento en la hidrofiliidad del fármaco, ya que el A.L. ejerce un efecto en las regiones polares y no polares de los lípidos del estrato córneo y la interacción entre el etanol y el A.L. incrementan el reparto de la parte polar del fármaco.

Entre los fármacos ensayados está el A.S. cuyo porcentaje de permeación de la piel (%/hr) a las 24 horas con un vehículo etanol/agua es 16,7% y con un vehículo

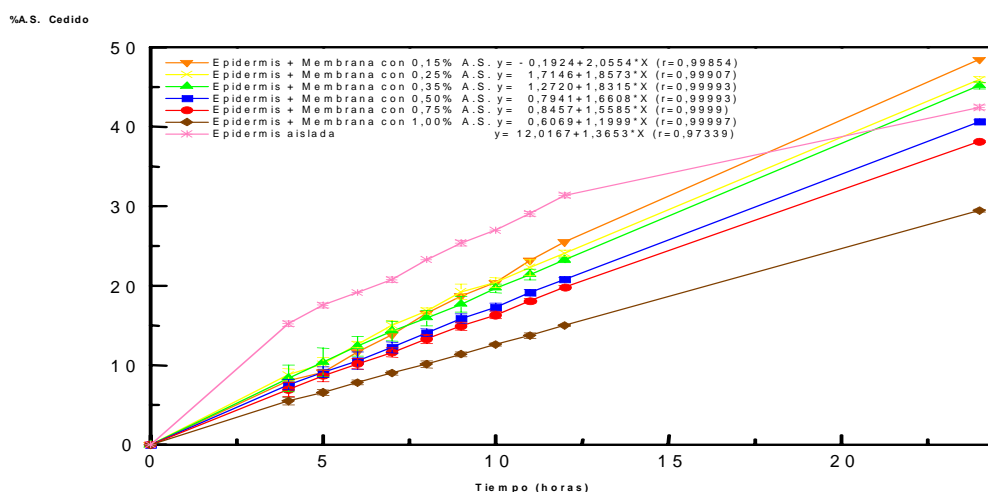
II y Epidermis Humana

etanol/agua/A.L. es 60,7%; con unos períodos de latencia de 2,0 h y 1,8 h respectivamente. La velocidad de penetración es $6,07/1,67 = 3,6$. En nuestros experimentos con epidermis humana encontramos que el % cedido al cabo de 24 horas es 42,83 con un período de latencia de 4 horas; como observamos nuestro valor de porcentaje esta en medio de los valores encontrados por Cheon y col., 1994, y el período de latencia es mucho mayor que el de ellos. De los anteriores resultados se puede concluir que el A.L. incrementa la permeabilidad de la piel y en consecuencia se reducen los tiempos de latencia, que a mayor reparto de los fármacos desde un vehículo binario etanol/agua mayor lipofilicidad del fármaco. Al comparar varias propiedades de los fármacos, la permeabilidad es más importante que la lipofilicidad. El vehículo ensayado etanol/agua/A.L. parece ser un buen candidato para sistemas transdérmicos con fármacos hidrofílicos.

Singh P. y Roberts M.S.; 1993b evalúan con Lidocaína y A.S. como fármacos tipo, la liberación pasiva en comparación con la liberación iontoforetica en epidermis intacta o en dermis de ratas. Se aplica una corriente de $0,38 \text{ mA/cm}^2$, se toman muestras de $10 \mu\text{l}$, durante 120 minutos los estudios se hacen in vitro en piel humana y en ratas. Se produce una gran pérdida de lidocaína porque un 25% no está ionizada a pH 7,4, mientras que el A.S. está completamente ionizado a este pH, los compuestos ionizados penetran mejor en el estrato córneo que los no ionizados. Los coeficientes de permeabilidad son similares in vitro usando dermis humana en comparación con dermis de rata luego se puede usar las ratas como modelo de comparación ($0,017$ y $0,013 \text{ cm/h}$ $r=0,998$). Sin embargo hay diferencias in vitro e in vivo por la contribución de la sangre cuando se aplican los compuestos. Con la lidocaína se encontraron concentraciones altas, por otra parte para el A.S. se encontraron concentraciones similares cuando se aplicó iontoforesis. Las concentraciones de A.S. en la piel, dermis y tejido subcutáneo bajo el sitio tratado son más altas que las de plasma estos resultados sugieren que el fármaco primero se absorbe en la sangre y luego se distribuye en los diferentes tejidos. En conclusión las concentraciones de A.S. son similares con y sin iontoforesis

6.5.3. Cesión de AS a través de epidermis humana + una de las membranas Tipo II: Tablas 6.6-6.11 y las correspondientes Figuras 6.6-6.11

Como se puede observar los perfiles que se obtienen para cada una de las 6 membranas no muestran período de latencia y en todos los casos son curvas exponenciales. La liberación del componente trazador, ácido salicílico es rápida. Así,



después de 24 horas de tiempo de experimentación, la máxima cantidad de ácido salicílico que se libera es de 48,46%, que se obtiene con la membrana que contiene el menor porcentaje de ácido salicílico (0,15% A.S.) en su composición. Mientras que la mínima liberación de A.S. (29,44%) se obtiene con la membrana que lleva 1,00% de A.S. en su composición (Figura 6.14)

Figura 6.14 Perfiles de transferencia de AS a través de epidermis humana + cada una de las membranas de ácido salicílico tipo II

Cuando se realiza al ajuste de los datos experimentales a una recta de regresión, los coeficientes de correlación que se obtienen son bajos (Tabla 6.13)), siendo en el peor de los casos de 0,9986 (membrana de 0,25% A.S.).

Tabla 6.13.- .- parámetros que se obtienen al ajustar los datos experimentales de las membranas tipo II con epidermis humana a una recta de regresión

<i>Porcentaje de AS (%) en membranas tipo II</i>	<i>Ordenada en el origen</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Coficiente de correlación</i>
<i>0,15</i>	19,266	8,243	0,9865
<i>0,25</i>	70,617	8,640	0,9729
<i>0,35</i>	116,890	25,508	0,9986
<i>0,50</i>	181,054	20,892	0,9841
<i>0,75</i>	1,015	45,314	0,9955
<i>1,00</i>	437,390	35,437	0,9223

También se observa que al incrementar la cantidad de ASm. que compone la membrana disminuye, igualmente, el porcentaje de AS transferido de la misma. Es decir, existe una relación lineal entre la cantidad de AS que compone la membrana y el porcentaje de AS cedido. El trazado que se obtiene es una línea recta de ecuación (6.5):

$$(\%)AS \text{ cedido} = 51,4166 - 20,6933 (\%)ASm \quad (r^2 = 0,9690) \text{ (Ec.6.5)}$$

En la *figura 6.15* se comparan mediante barras los porcentajes de A.S. que se liberan desde cada tipo de membrana, después de transcurrir las 6, 12 y 24 horas que dura el ensayo. Como se puede observar en las 6 horas primeras de ensayo no hay influencia en la composición de la membrana, pero al aumentar el tiempo de experimentación a 12 horas la influencia se nota y también después de las 24 horas del ensayo. Además el porcentaje de AS cedido desde las membranas a esos tiempos siguen una relación lineal al relacionarlo con el (%) de ASm presente en la membrana. Así, por ejemplo la ecuación que se obtiene a las 12 horas es (ecuación 6.6):

$$y = 27,1456 - 11,4778 * x \quad (r=0,9824) \text{ (Ec. 6.6)}$$

Al observar todos los resultados obtenidos parece existir una clara relación entre los datos de AS transferidos a través de la epidermis humana desde las membranas tipo II.

Al hacer el análisis estadístico de los datos (ANOVA), esa relación se confirma y además al ser $p < 0,05$, existen diferencias, estadísticamente significativas, en las cesiones obtenidas a partir de las distintas membranas tipo II. Existe una relación inversa entre porcentaje de AS transferido a fase receptora y % de ASm. A mayor porcentaje de ASM menor es la transferencia del fármaco a través de la epidermis humana.

Además de los datos obtenidos, también se observa, que en todas las membranas la cesión se produce con una cinética de orden cero.

CONCLUSIONES

RESPECTO A LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS MEMBRANAS

PRIMERA:

A) Tanto el espesor como la relación PESO/SUPERFICIE de la membrana tipo I (membranas de aceite de ricino), aumenta al aumentar la cantidad de AR en la membrana.

B) Del mismo modo, el espesor de las membranas tipo II , que contienen distintos %ASm , aumenta al aumentar el % de AS en la membrana. Además, como es lógico, las membranas tipo II, tienen mayor espesor que las membranas tipo I de las que se obtienen.

SEGUNDA

- A) En los ensayos de resistencia a la fractura, se ha constatado que, al aumentar la cantidad de aceite de ricino, las membranas tipo I son más resistentes a la fractura.
- B) Sin embargo, las membranas tipo II, conforme aumenta el % de AS en membrana, más frágil se vuelve la membrana, porque el AS le hace perder flexibilidad y elasticidad; por ello la membrana se rompe más fácilmente.

Comparados ambos tipos de membranas, se obtiene, en todos los casos ensayados

Más resistencia a la fractura con las membranas tipo I que las de tipo II.

TERCERA

- A) Las observaciones realizadas por microscopia electrónica de barrido nos muestra que las membranas tipo I tienen todas, independientemente del contenido de aceite de ricino, la misma estructura, solo se diferencian en el comportamiento que muestran frente a la energía del haz de electrones. A mayor energía mayor fragilidad muestra la membrana, se desgarran más fácilmente.
- B) Las membranas tipo II tienen estructura diferente dependiendo de la cantidad de ácido salicílico que lleve la membrana. Membranas con menos de 0,75% AS presentan pequeños puntos blancos en su superficie, pero por encima de ese contenido en AS se observa, claramente, cristales en su superficie, debido a que el AS al ser tan alto su contenido en la membrana, precipita después de disolverse en los solventes que se utilizan para preparar la membrana.

CUARTA

- La cesión del AS a través de las membranas tipo I se produce proporcionalmente a la cantidad de AR que lleve la membrana. A mayor cantidad de AR en membrana, mayor es la cesión de AS.

- Se observa un distinto comportamiento entre membranas humectadas y sin humectar

La cesión del AS es mayor a través de las membranas humectadas. La máxima cesión se obtiene con las membranas que permanecen en contacto con la formulación

_ El dispositivo de cesión no influye en la cesión del AS cuando se utilizan membranas tipo I: se puede utilizar, indistintamente, cualquiera de los dos.

QUINTA

- La velocidad de transferencia del AS a partir de las membranas tipo II decrece al incrementarse el %AS en membrana. Este hecho es fácilmente comprensible al observar por SEM las membranas. Al estar cristalizado el AS en las membranas con mayor %ASm el AS se cede más lentamente.
- El proceso se acelera, lógicamente, cuando se incrementa el volumen de fase receptora que se emplea en el ensayo
- Se encuentran diferencias significativas en los %AS que se ceden a fase receptora en función del tipo de dispositivo de diálisis se utilice en el ensayo: celda o placa.

SEXTA

La velocidad de transferencia de AS a través de epidermis humana y membranas tipo I es dependiente de la cantidad de AR que lleve la membrana. A mayor cantidad de AR en membrana, se produce mayor transferencia de AS a través de la piel.

SÉPTIMA

La velocidad de transferencia del AS a través de la piel a partir de membranas tipo II decrece al incrementarse el %AS en la membrana. En todos los casos, el proceso de transferencia a través de la piel sigue una cinética de orden cero.

OCTAVA

Con las membranas tipo II se podrían elaborar ST ya que tienen características adecuadas para controlar velocidad de paso a través de la piel de moléculas como el AS.

NOVENA y ULTIMA

Hay que resaltar el hecho de que, para realizar los ensayos de cesión con ambos tipos de membranas, el dispositivo a elegir, sería en todos los casos las celdas de Franz modificadas. En ningún caso se podría utilizar la placa como celda de difusión para ensayar membranas tipo II.

BIBLIOGRAFIA

- Adams J.; Watts F.;** "Regulation and development and differentiation by the extracellular matrix." *Development*, 117, 1183-1198, (1993).
- Aïache, J.M.** "Aspects Theoriques du passage à travers les membranes synthetiques en Biopharmacie." En: Galénica 2. Biopharmacie, Technique et Documentation, Paris, pp: 214-231, (1978).
- Aïache, J.M.;** "Aspects Theoriques du passage à travers les membranes synthetiques en Biopharmacie." En: Galénica 2. *Biopharmacie, Technique et Documentation*, Paris, pp: 214-231, (1978).
- Aiba S.; Katz S.I.;** "Phenotypic and functional characteristics of in vivo activated Langerhans cell." *J. Immunol.*, 45, 2791-2796, (1992).
- Akerman S.; Viinikka P.; Svarfvar B.; Järvinen K.; Kontturi K.; Näsman J.; Urtti A.; Paronen P.;** "Transport of drugs across porous ion exchange membranes". *Journal of Controlled Release*, 50, 153-166, (1998).
- Akerman S.; Viinikka P.; Svarfvar B.; Järvinen K.; Kontturi K.; Näsman J.; Urtti A.; Paronen P.;** "Transport of drugs across porous ion exchange membranes". *Journal of Controlled Release*, 50, 153-166, (1998).
- Atkins P.W.;** *Fisico Química*, Addison Wesley Iberoamericana, México, pp:26-27, 763-764, 791-792, (1991).
- Babor, J.A.; Ibarz J.;** "*Química General Moderna*". 7ª edición. Ed Marin, Barcelona, (1968).

- Bamio-Nuez, A.; Artalejo-Ortega B.; del Pozo Carrascosa A.; Faulí-Trillo C.;** "Validación analítica: aplicación a un método por cromatografía líquida de alta resolución para el análisis de benzodiazepinas." *Cir.Far.* , 316, 295-308, (1992).
- Bamio-Nuez, A.; Artalejo-Ortega B.; del Pozo Carrascosa A.; Faulí-Trillo C.;** "Validación analítica: aplicación a un método por cromatografía líquida de alta resolución para el análisis de benzodiazepinas." *Cir. Far.*, 316, 295-308, (1992).
- Barry B.W.;** "Mode of action of penetration enhancers in human skin." *J. Control. Rel.*, 6,85, (1987).
- Barry B.W.;** "Properties that influence Percutaneous Absorption". En: *Dermatological Formulations Percutaneous Absorption*, Ed Marcel Dekker, New York, pp: 160-172, (1983).
- Barry, B.W.;** "Cap 12: Transdermal drug delivery." En: *Drug Delivery Systems*, Ellis Horwood Ltd, Chichester, pp: 200-223, (1987).
- Barry, B.W.;** "Cap 22: Topical preparations." En: *Pharmaceutics the science of dosage form design*, Churchill Livingstone, New York, pp: 381-411, (1988).
- Berti, J.J.; Lipsky, J.J.;** "Transcutaneous Drug Delivery: A Practical Review". *Mayo Clin. Proc.*, 70(6), 581-586, (1995).
- Bialik, W.;** "Studies on the release of drugs from O/W emulsion- Ointments using the mathematicaal interpretation. Part 2: Influence of the onintment composition". *Pharmazie*, 40, 637, (1985b).
- Blank J.H.;** "Penetration of low-molecular-weight alcohols in to skin I. Effect of concentration of alcohol and type of vehicle." *J. Invest. Dermatol.*, 43, 415-420, (1964).
- Blank J.H.; Scheuplein R.J.; McFarlane J.;** "Mecanism of percutaneous absorption III The Effect of temperature on transport of non-electrolytes across the skin." *J. Invest. Dermatol.*, 49,582-589, (1967).
- Boddé H.E.; Brink Y. Van Den.; Koerten H.K.; Haan F.H.N.;** "Visualization of in vitro percutaneous penetration of mercuric chloride: transport through intercellular space versus cellular uptake through desmosomes." *J.Control Rel.*, 15, 227-236, (1991).
- Boletín Gattefossée NOTICE-OL 0050/3ª de.**
- Boletín UEE Unión Española de Explosivos, S.A. FICHA DE PRODUCTO Nitrocelulosa Industrial STS2696, 1996.**
- Borradori L.; Sonnenberg A.;** "Structure and fuction of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes." *J. Invest. Dermatol.*, 112, 411-418, (1999).
- British Pharmacopoeia. 3rd Edition.** The British Pharmacopoeia Comission, London, (1999).

- Brown L.; Langer R.;** "Transdermal Delivery of Drugs". *Annual review of Medicine*, 39, 221-229, (1988).
- Brubacher, J.R.; Hoffman, R.S.;** "Salicylism fom topical salicylates: review of the literature". *Journal-Toxicol-Clin-Toxicol*, 34(4), 431-436, (1996).
- Burge S.;** "Cohesion of the epidermis". *Br. J. Dermatol.*, 131, 153-159, (1994).
- Burgeson R.E.; Christiano A.U.;** "The dermal- epidermal Functions". *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 9, 651-658 (1997).
- Cadotte, J.E.;** *Materials science of Synthetic Membranes*. Editorial D.R. Lloyd Amer. Chem. Soc., Washington, (1985).
- Camacho- Sánchez M.A.; Torres-Suárez A.I.; Gil-Alegre M.E.; Obregon-Sánchez M.M.; Ruz-Palomar V.;** "Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products". *S.T.P. Pharma Pratiques*, 3(3), 197-202, (1993).
- Camacho- Sánchez M.A.; Torres-Suárez A.I.; Gil-Alegre M.E.; Obregon-Sánchez M.M.; Ruz-Palomar V.;** "Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products". *S.T.P. Pharma Pratiques*, 3(3), 197-202, (1993).
- Castaño, M.T.; Ruiz, L.; Vidal, J.L.;** *Monografías Farmacéuticas*. Gráficas Olmedilla, Alicante, (1998).
- Castro M.; Gascon S.; Pujol M.; Sans J.M.; Vicente L.;** Validación de Métodos analíticos. Monografía A.E.F.I., Barcelona, (1989).
- Castro M.; Gascon S.; Pujol M.; Sans J.M.; Vicente L.;** Validación de Métodos analíticos. *Monografía A.E.F.I.*, Barcelona, (2001).
- Cemeli J.;** "La validación una filosofía y un sistema." *C.I.F.*, 4 (2ª ép.), 220-226, (1985).
- Cherjan, M.;** "Cap 2: Ultrafiltration." En: *Handbook Technomic*, Public. Lancaster, Basel, pp: 27-51, (1986).
- Clarke's, E.C.G.;** "Isolation and identification of drugs", (3ª edición). The pharmaceutical press, Londres, 26 y 965, (2004).
- Coldman, M.F.; Poulsen, B.J.; Higuchi, T.;** "Enhacement of percutaneous absorption by the use of volatile nonvolatile systems as vehicle." *J. Pharm. Sci.*, 58, 1098, (1969).
- Cooper E.R.;** "Increased Skin permeability for lipophilic molecules." *J. Pharm. Sci.*, 73, 1153-1156, (1984).
- Corti P.; Dreassi E.; Mura P.; Peruccio P.L.;** "In vitro studies of simulated percutaneous absorption: Influence of various enhancers in the release of clonazepam

from 2-hydroxyethyl acetate patches". *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72, 263-269, (1998a).

Davis A.F.; Hadgraft J.; "Effect of supersaturation on membrane-transport. 1. Hydrocortisone acetate." *Int. J. Pharm.*, 76, 1-8, (1991).

Davis D.P.; Kraus A.L.; Thompson G.A.; Olerich M.; Odio M.R.; "Percutaneous Absorption of Salicylic Acid after Repeated (14-day) In vivo Administration to Normal, Acneogenic or Aged Human Skin". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(8), 896-899, (1997).

Denoel A.; Jaminet J.R.; "Cap I: Preparations Dermiques utilisées en Dermatologie." En: *Pharmacie Galenique*, Vol V, Les Presses Universitaires. Université de Liège, Liège, pp: 3-106, (1971).

Dias M; Raghavan S.L. y Haddgraft J.; "ATR-FTIR spectroscopic investigations on the effect of solvents on the permeation of benzoic acid and Salicylic acid through silicone membranes". *Int. J. Pharm.*, 216, (1-2), 51-59, (2001).

Diez Sales O.; Lopez Castellano A.; Maiques Llacer F.; Herraez Domínguez M.; "An "in vitro" percutaneous absorption study of non ionic compounds across human skin." *Pharmazie*, 48, 684-686, (1993)

Donbrow, M.; Friedman, M.; "Enhancement of permeability of ethyl cellulose films for drug penetration". *J. Pharm. Pharmacol.*, 27, 633, (1975).

Dowling J.; Yu Q.C.; Fuchs E.; "β4 integrin is required for hemidesmosome formation cell adhesion and cell survival". *J. Cell. Biol.*, 134, 554-572, (1996).

Downing D.T.; Stewart M.E.; Wertz P.W.; Strauss J. S.; "Lipids of the epidermis and sebaceous glandes". En: *Dermatology in general Medicine.*, Editores: Fitzpatrick T.B.; Eisen A.Z.; Wolff K., Friedberg I.M. y Austeim, Ed. McGraw-Hill, New York, pp: 210-220, (1993).

Esterowitz, D.; Greer, K.E.; Cooper, P.H.; Edlich, R.F.; "Plantar Warts in the athlete". *Am-J-Emergency-Med*, 13(4), 441-443, (1995).

European Pharmacopoeia. 5th edición. Council of Europe, Francia, (2004).

Farrell S.; Sirkar K.; "Mathematical model of a hybrid dispersed network membrane- based controlled release system." *J.Control. Reles.*, 70, (1-2), 51-61, (2001).

Farstasch M.; Bassukas I.D.; Diepgen T.L.; "Structural relationship between epidermal lipid lamellae, lamellar bodies and desmosomes in human epidermis: an ultrastructural study." *Br. J. Dermatolol.*, 128, 1-9, (1993).

Flórez, J.; *Farmacología Humana.* 3^a edición. Masson. Barcelona, (1997).

Flynn G.L.; "Mechanism of percutaneous absorption". En: *Percutaneous absorption*, Ed. Bronough RL y Maibach H.I.,(1989).

Flynn G.L.; Yalkowsky S.H.; "Correlation and prediction of mass transport across the membranes. I. Influence of alkyl chain length on flux determining properties of barrier and diffusant." *J. Phar. Sci.*, 61, 838-852, (1972).

Flynn, G.L.; Poseman, T.J.; "Membrane Diffusion II: Influence of Physical Absorption on Molecular Flux through Heterogeneous Dimethylpolysiloxane Barriers". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(12), 1788-1796, (1971).

Flynn, G.L.; Yalkowsky, S.H.; Roseman, T.J.; "Mass Transport Phenomena and Models:Theoretical Concepts". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63(4), 479-510, (1974).

Franquesa-Graner R.; "Descripción de un Programa de Ordenador para Validación de Métodos Analíticos". *Industria Farmacéutica*, Marzo/Abril, 101-105, (1990).

Fucus E.; "Epidermal differentiation and Keratin gene expression". *J. Cell Sci.*, 17, 197-208, (1993).

Garces J.; Marinea A.; Codony R.; "Evaluación y control de calidad de los métodos de análisis químico. IV Parámetros que caracterizan al método analítico: criterios de fiabilidad (exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad) y criterios de practicabilidad". *C.I.F.*, 7(2ª ép.), 182-189, (1988).

Garson J. Doucet J. L'faveque J.; Tsoucaris G. ; "Oriented Structure in human Stratum corneum revealed by X-Ray diffraction." *J. Invest. Dermatol.*, 96, 43-49, (1991).

Gennaro A.R.; *Remington Farmacia* (19ª edición). Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp:1292, 1535-1536;1309-1310; 2145; 2554-2555, (1995).

Germann, R.; Schindera, I.; Kuch, M.; Seitz, U.; Altmeyer, S.; Schindera, F.; "Life threatening salicylate poisoning caused by percutaneous absorption in severe ichthyosis vulgaris". *Hautarzt*, 47(8), 624-627, (1996).

Gibaldi, M.; *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*. Lea&Febiger. Malvern. pp:105-110, (1991).

Glombitza, B.W.; Schmidt, P.C.; "Comparasion of three new spectrophotometric methods for simultaneous determination of aspirin and salicylic acid in tablets without separation of pharmaceutical excipients". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(5), 751-757, (1994).

Golden G.M.; Mckie J.E.; Potts R.O.; "The role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux." *J. Phar. Sci.*, 76, 25-28 (1987).

Goldstein, A.; Aronow, L.; Kalman, S.M.; *Farmacología*. Editorial Limusa. México, pp: 158-160; 172-173, (1978).

- Gomez-Lechón M.J.** "Citocromo P-450 extrahepático". En: *Citocromo P-450*. Editado Cascales Angosto M^a y Gómez-Lechón M^a. Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid. 2004. pp. 272-273.
- Goodman & Gilman** ; *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Vol II. Mc Graw Hill Interamericana, México, (1996).
- Goth, A.**; *Farmacología Médica*. Undécima edición. Ediciones Doyma. Barcelona. (1986).
- Grandjean P.; Berlin A.; Gilbert M.; Penning W.**; "Preventing percutaneous absorption of industrial chemical the "Skin denotation". *Am. J. Ind. Med.*, 1, 97-107, (1988).
- Gurny, R.; Mordier, D.; Buri, P.**; "Réalisation et Développement théorique de formes médicamenteuses à libération contrôlée par des films méthacryliques. I.: Fabrication et évaluation de films plans libres". *Pharm. Acta Helv.*, 51, 384, (1976).
- Guy, R.H.**; "A sweeter life for diabetics?". *Nature Med.*, 1, 1132-1133, (1995).
- Guy, R.H.; Hadgraft, J.**; "Transdermal drug delivery: A perspective". *Journal of Controlled Release*, 4, 237-251, (1987).
- Hadgraft J.; Walters K.A.; Wotton P.K.**; "Facilitated transport of Sodium salicylate across an artificial lipid membrane by Azones.". *J. Pharm. Pharmacol.*, 37, (10), 725-727, (1985).
- Hadgraft, J.**; "Recent developments in topical and transdermal delivery". *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics.*, 21(2), 165-173, (1996).
- Handbook of Pharmaceutical Excipients**, Second edition, Edited by Ainley Wade and Paul J. Weller, The Pharmaceutical Press American Pharmaceutical Association, Londres, (2000).
- Hatanaka T.; Inuma M.; Subigayashi K.; Morimoto Y.**; "Pediton of Skin Permeability of drugs. I.- Comparasion with artificial membranes." *Chem. Pharm. Bull.* Tokyo, 38(12), 3452-3459, (1990).
- Hearing V.J.**; "Biochemical Control of melanogenesis and melanosomas organization". *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 4, 24-28, (1999).
- Higa O.Z.; Rogero S.O.; Machado L.D.B.; Mather M.B.; Lugão B.**; "Biocompatibility study for PVP wound dressing obtained in different conditions". *Radiat Phys. Chem.*, 55, 45(6), 705-707, (1999).
- Higuchi T.**; "Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments". *J. Soc. Cosmetic Chem.*, 11, 85-97, (1960).
- Higuchi T.**; "Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(10), 874-875, (1961).

- Hosny E.A.; Abdel-Hady S.S.; Niazy E.M.;** "Effect of film composition and various penetration enhancers concentrations on prazosin release from acrylic polymeric films". *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72, 247-254, (1998).
- Hunt D.M.; Sahota V.K.; Taylor K.; Simrak D.; Hornigold J.; Arnemann J.; Wolfe J.; Buxton R.S.;** "Clustered Cadherin genes: a sequence-ready contig for the desmosomal cadherin locus on human chromosome 18." *Genomics*, 62, 445-455, (1999).
- Idson, B.;** "Percutaneous Absorption". *Journal of Pharmaceutical Sciences* , 64(6), 901-924, (1975).
- Imanidis G.; Helbing-Strausak S.; Imboden R.; Leuenberger H.;** "Vehicle dependent in situ modification of membrane- Controlled drug release". *J. Control. Reles.*, 51, 23-34, (1998).
- Jennifer, K.;** "Understanding transdermal medication". *Professional Nurse*, 10(2), 121-125, (1994)
- Joshi H.N.; Stella V.J.; Topp E.M.;** "Drug release from membranes hyaluronic acid and its esters." *J. Control. Reles.*, 20, 109-122, (1992).
- Joshi H.N.; Stella V.J.; Topp E.M.;** "Drug release from membranes of hyaluronic acid and its esters". *Journal of Controlled Release*, 20, 109-122, (1992).
- Kaiser H.W.; Ness W.; Junglut I., Briggaman R.A.; Kreysel H.W.; O'Keefe E.J.;** "Adherens junctions: demonstration in human epidermis". *J. Invest. Dermatol.*, 100,180-185, (1993).
- Kalia Y.N.; Nonato L.B.; Lund C.H.; Guy R.H.;** "Development of Skin Barrier Function in Premature Infants." *The Journal of Investigative Dermatology*, 11(2), 320-326, (1998).
- Karnes H.T.; Shiu G.; Shah V.P.;** "Validation of Bioanalytical Methods." *Pharmaceutical Research*, 8(4), 421-426, (1991).
- Kitajima Y.; Aoyama Y.; Seishima M.;** "Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes and for cell-cell detachment induced by femphigns Ig G in cultured Keratinocytes: involvement of protein Kinase C." *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 4, 137-144, (1999).
- Kligman A.M., Christophers E.;** "Preparation of isolated sheets of stratum corneum". *Archives of Dermatology*, 88, 702-705, (1963).
- Knulst, A.C.; De-La-Faille, H.B.; Van Vloten, W.A.;** "Topical 5-fluorouracil in the treatment of Darier's disease". *Br-J-Dermatol.*, 133(3), 463-466, (1995).

- Kornreich, C.; Zheng, Z.S.; Xue, G.Z.; Prystowsky, J.H.;** "A simple method to predict whether topical agents will interfere with phototherapy". *Cutis*, 57(2), 113-118, (1996).
- Kornreich, C.; Zheng, Z.S.; Xue, G.Z.; Prystowsky, J.H.;** "A simple method to predict whether topical agents will interfere with phototherapy". *Cutis*, 57(2), 113-118, (1996).
- Korolkovas, A.; Burckhalter, J.H.;** *Compendio Esencial de Química Farmacéutica*. Editorial Reverté, Barcelona, (1978).
- Kristensen, B.; Kristensen, O.;** "Salicylic acid and ultraviolet B for psoriasis". *Lancet*, ii, 1109-11010, (1989).
- Kubota K. Y Maibach H.I.;** "Significance of viable skin layers percutaneous permeation and its implication in Mathematical Models: Theoretical considerations Based on parameters for Betamethasone 17-valerate". *J. Pharm.Sci.*, 83, 1300-1306, (1994).
- Lavker R.M.; Sun T.;** "Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morfological and functional correlations". *Science*, 215, 1239-1241, (1982).
- Lázaro-Ochaita P.;** *Dermatología Texto y Atlas*, Gráficas Reunidas, Madrid, pp:1-17, (1993).
- Lee, A.J.; King, J.R.; Barrett, D.A.;** "Percutaneous absorption: a multiple pathway model". *Journal of Controlled Release*, 45, 141-151, (1997).
- Leforet del Ylouses, D.; Seiller, M; Duchener, D.;** "Enrobage IV. Etude de solutions et de films celulosiques. Influence des plastifiants". *Pharm. Acta Helv.*, 52, 65, (1977).
- Li K.; Tama I.K.; Tan E.M.L.; Uitto.;** "Cloning of type XVII Collagen. Complementary and genomic DNA sequences of mouse 18akDa bullons pemphigoid antigen (B PAG2) predict an interrupted collagenous domain, a transmembrane segment, and unusual features in the 5'-end of the gene and the 3'-untranslated region of mRNA." *J. Biol. Chem.*, 268, 8825-8834, (1993).
- Liebowitz S.M.; Ichuzuka K.; McGinity J.W.;** "Cap 1: Physiocochemical factors influencing drug release from acrylic resin films." En: *Pharmaceutical Technology: Controlled Drug Release*, Vol. 1, Ellis Horwood Limited, Chichester, (1987).
- Litter, M.;** *Farmacología*. Libreria "El Ateneo" Editorial. Buenos Aires. pp: 1367-1396, (1996).
- Lopérgolo L.C.; Catalani L.H.; Machado L.D.B.; Rela P.R.; Lugão A. B.;** "Development of reinforced hydrogels- I. Radiation induced graft copolymerization of methylmethacrylate on non- woven polypropylene fabric". *Radiant. Phys. Chem.*, 57, (3-6), 451-454, (2000).

- Loweday D.E.;** "An in vitro method for studying percutaneous absorption." *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 12, 224-239 (1961).
- Lugão A. B.; Machado L.D.B.; Miranda L.F.; Alvarez M.R.; Rosiak J.M.;** "Study of wound dressing structure and hydration, dehydration properties". *Radiat. Phys. Chem.*, 52, (1-6), 319-322, (1999).
- Lund C.H.; Nonato L.B.; Kuller J.M.; Franck L.S.; Cullander C.; Durand D.J.;** "Disruption of barrier function in neonatal skin associated with adhesive removal". *The Journal of Pediatrics*, 131(3), 338-340; 367-372, (1997).
- Mackee G.M.; Herrmann F.; Baer R.L.; Sulzberger M.B.;** "Demonstrating the presence of sulfonamides in the tissues." *Science*, 98, 65, (1943).
- Maibach H.I.; Feldmann R.J.;** "Effect of applied concentration on percutaneous absorption in man." *J. Invest. Dermatol.*, 52, 382-388, (1969)
- Mao- &iang M.; Jain M.; Feingold K.R.; Elias P.M.;** "Secretory phospholipase A₂ activity is required for permeability barrier homeostasis." *J. Invest. Dermatol.*, 106, 57-63, (1996).
- Marekov L.N.; Steiner P.M.;** "Ceramide are bound to structural proteins of human foreskin epidermal cornified cell envelope." *J. Biol. Chem.*, 273, 17763-17770, (1998).
- Martín A.;** "Cap 13: Diffusion and Dissolution." En: *Physical Pharmacy*, 4ª edición., Editorial Lea & Febiger, Philadelphia, 324-361, (1993).
- Martindale,** The Extra Pharmacopeia, 31 edition. Edited by James E.R.; Reynolds, London. The pharmaceutical press, (2002).
- Marzulli F.N. Callahan J.F.; Brown D.W.C.;** "Chemical Structure and skin penetrating capacity of a short series of organic phosphates and phosphoric acid." *J. Invest. Dermatol.*, 44, 339-344, (1965).
- Mattison, D.R.;** "Transdermal drug absorption during pregnancy." *Clin. Obstet. Gynecol.*, 33, 718-727, (1990).
- Mauro T, Graysons S.; Gao W.N.; Man M.Q.; Krieleuber E.; Behne M.; Feingold K.R.; Elias P.M.;** "Barrier recovery is impeded at neutral pH, independent of ionic effects: implications for extracellular lipid processing". *Arch. Dermatol. Res.*, 290, 215-222, (1998).
- Melendres J.L.; Bucks D.; Camel E.; Wester R.C.; Maibach H.I.;** "In vivo percutaneous absorption of hydrocortisone multiple application dosing in man". *Pharmaceutical Research*, 7(9), S-248, (1990).
- Mérida-Cortijo M.;** "Cap 26: Transporte de materia." En: *Fisicoquímica para Farmacia y Biología*, 26 edición, Ediciones Científicas y Técnicas S.A., Barcelona, 699-706, (1992).

Merk H.F.; Abel J.; Baron J.M.; Krutmann J. "Molecular pathways in dermatotoxicology." *Toxicology Appl. Pharm.*, 195, 267-277, (2004).

Meyer J.C.; Grundmann H.P.; Knappnhan S.; Properties of acid phosphatase in human stratum Corneum." *Dermatologica*, 180, 24-29, (1990).

Nakano, M.; Patel, N.K.; "Release, uptake and permeation behaviour of Salicylic acid in ointment bases". *J. Pharm. Sci.*, 59, 985, (1970).

Nogueira-Prista L.; Correia-Alves A.; Morgado-Rui M.R.; *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*, 3ª edição, Volumen II, Fundação Calouste Goulbenkian, Lisboa, (1990).

ORDEN MINISTERIAL de 19 de Abril de 1985. B.O.E. núm 103 de 30 de Abril de 1985.

Pajor, Z.; Pandula, E.; Peres, T.; "Elektronenmikroskopische Untersuchung der Salbenstruktur I: Untersuchung von Vaseline". *Fette- Seifen-Anstrichmittel*, 69, 855, (1967).

Panizzon,R.; "Psoriasis: diagnosis and therapy". *Schweiz-Rundsch-Med-Prax*, 84(22), 649-653, (1995).

Parra-Juez J.L.; Pons-Gimier L.; "Cap I: La piel y sus anejos como sustrato vivo de la cosmetología". En: *Ciencia Cosmética*, Heliotipia Artística, S.L., Madrid, (1995).

Pellett M.A.; Davis A.F.; Hadgraft J.; "Effect of supersaturation on membrane-transport. 1. Piroxicam." *Int. J. Pharm.*, 111, 1-6, (1994).

Pellett M.A.; Watkinson A.C.; Hadgraft J.; Brain K.; "Comparison of permeability data from traditional diffusion cells and ATR-FTIR spectroscopy Part II. Determination of diffusional pathlengths in synthetic membranes and human stratum corneum". *Int. J. Pharm.*, 154, 217-227, (1997a).

Pellett M.A.; Watkinson A.C.; Hadgraft J.; Brain K.; "Comparison of permeability data from traditional diffusion cells and ATR-FTIR spectroscopy Part I Synthetic membranes." *Int. J. Pharm.*, 154, (2), 205-215, (1997b).

Peltonen S.; Hentula M.; Hägg P.; Väli-Outinen H.; Trukkamen J.; Lakkakorpi J.; Rehn M.; Pihlajaniemi T.; Peltonen J.; "A novel component of epidermal cell-matrix and cell-cell contacts: Transmembrane protein type XII collagen." *J. Invest. Dermatol.*, 113, 635-642, (1999).

Peppas N.A.; "Analysis of Fickian and Non-Fickian Drug Release from Polymers". *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 60(4), 110-111, (1985).

Peppas N.A.; Sundaran N.; "An Analysis of drug and solute transport through membranes based on potential barriers". *J. Control. Reles.*, 34,37-42, (1995).

Ponnighaus, J.M.; Gooskens, V.; Clayton, Y.; Mkandawire, P.; Sterne, J.; "Treatment of superficial mycoses in the tropics. Results of a double-blind study in the Karonga District, Malawi". *Mycoses*, 37 Suppl 1, 101-104, (1994).

Potten C.S.; Allen T.D.; "A model implicating the Langerhans cell in Keratinocyte proliferation control." *Differentiation*, 5, 43-47, (1976).

Potts, R.O.; Francoeur, M.L.; "The influence of stratum corneum morphology on water permeability." *J. Invest. Dermatol.*, 96, 495-499, (1991).

Pouliot R.; Germain L.; Auger F.A.; Tremblay N.; Juhasz J.; "Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro human skin equivalent produced by tissue engineering and its comparison with normal human skin by ATR-FTIR spectroscopy and thermal analysis (DSC)." *Biochim. Biophys. ACTS*, 1439, 341-352, (1999).

Prota G.; "Melanins and Melanogenesis." *Cosmet Toiletr.*, 111, 43-51, (1996).

Real Farmacopea Española. 2ª ed. Ministerio de Sanidad, Madrid, (2002).

Roberts M.S.; Pugh W.J.; Hadgraft J.; "Epidermal permeability. Penetrant structure relations 2.- The effect of H -bonding groups in penetrants on their diffusion through the stratum corneum." *Int. J. Pharm.*, 132, 23-32, (1996).

Roberts, M.S.; Horlock E.; "Effect of repeated skin application on Percutaneous Absorption of Salicylic acid." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67, 1685, (1978).

Rodríguez Bayón A.M.; "Difusion "in vitro" y envejecimiento de pomadas-emulsión. Tesis doctoral. Departamento de Galénica. Facultad de Farmacia. Ed Universidad Complutense de Madrid. Madrid, (1989). p 242.

Rodríguez Bayón A.M.; Cadórniga Carro R.; "Estudio de la cesión de medicamentos a través de membranas artificiales. I. Membranas lipídicas no porosas." *Ciencia e Industria Farmacéutica*, 8 (2ª época), 48-55, (1989a)

Rodríguez Bayón A.M.; Cadórniga Carro R.; "Estudio de la cesión de medicamentos a través de membranas artificiales. II. Membranas lipídicas no porosas." *Ciencia e Industria Farmacéutica*, 8 (2ª época), 48-55, (1989b)

Rodríguez Bayón A.M.; Corish J.; Corrigan O.I. "Estudio de la cesión de medicamentos a través de membranas artificiales. II. Membranas lipídicas no porosas." *Ciencia e Industria Farmacéutica*, 8 (2ª época), 48-55, (1993)

Samuelov, Y.; Donnrow, M.; Friedman, M.; "Sustained release of drugs from Ethycellulose-Polyethylene glycol films and Kinetics of drug release". *J. Pharm. Sci.*, 68, 325, (1979).

Sawamura D.; Li K.; Chu M-L.; Uitto J.; "Human bollons pemphigoid antigen (BPAAG1): aminoacid sequeces deduced from cloned cDNA predict biologically

- important peptide segments canal protein domains." *J. Biol. Chem.*, 266, 17784-17790, (1991).
- Scheuplein R.J.;** "Mechanism of percutaneous absorption I. Routes of penetration and the influence of solubility." *J. Invest. Dermatol.*, 45, 334-346, (1965).
- Scheuplein R.J.;** "Mechanism of percutaneous absorption II Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration." *J. Invest. Dermatol.*, 48(1), 79-88, (1967).
- Scheuplein R.J.; Blank I.H.;** " Mechanism of percutaneous absorption IV penetration of non electrolytes (alcohols) from aqueous solutions and from pure liquids." *J. Invest. Dermatol.*, 60, 286-296, (1973).
- Sckückler F.; Lee G.;** "Measuring the uptake of Azone into excised human stratum corneum from thin polymer film". *J. Pharm. Pharmacol.*, 45,162-165, (1993).
- Seabra y De Oliveira 2004
- Shen, W.W.; Danti, A.G.; Bruscato, F.;** "Effect of nonionic surfactants on percutaneous absorption of salicylic acid and sodium salicylate in the presence of Dimethyl sulfoxide". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65, 1781,(1976).
- Shing P.; Roberts M.J.;** " Local deep tissue penetration of compounds after dermal application: structure-tissue penetration relationship." *J. Pharmaco. Experim. Therap.*, 279, 908-917, (1996).
- Singh P.; Roberts M.S.;** "Iontophoretic Transdermal Delivery of Salicylic Acid and Lidocaine to local Subcutaneous Structures". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82 (2), 127-131, (1993).
- Singh P.; Roberts M.S.;** "Skin Permeability and Local Tissue Concentrations of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs after Topical Application". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 268(1), 144-151, (1994).
- Smith J.C.; Irwin W.J.;** "Ionisation and the effect of absorption enhancers on transport of Salicylic acid through silastic rubber and human Skin." *Int. J. Pharm.*, 210, (1-2), 69-82, (2000).
- Spang-Brunner, B.H.; Speiser, P.;** "Release of a drug from homogeneous ointments containing the drug in solution". *J.Pharm.Pharmacol.*, 28, 23, (1976).
- Steen, K.H.; Reeh, P.W.; Kreysel, H.W.;** "Dose-dependent competitive block by topical acetylsalicylic and salicylic acid of low pH-induced cutaneous pain". *Pain*, 64, 71-82, (1996).
- Steinert P.M.; Candi E.; Tarosa E.; Marekov L.N.; Sette M.; Paci M.; Ciani B.; Guerrieri P.; Melino G.;** "Tranglutaminase crosslinking and structural studies of the human small proline rich 33 protein." *Cell Deaten Differ.*, 6, 916-930 (1999).

- Steinert P.M.; Marekov L.N.;** "Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keranholyte cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.*, 272, 2021-2030 (1997).
- Stoughton R.B.;** "Percutaneous Absorption of drugs." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 29, 55-69, (1989).
- Suarez-Fernández, R.; Martín-Rodríguez, F.; López-Bran, E.; Nuñez-Alonso, C.; Sánchez-De-Paz, F.; Sánchez-Yus, E.;** "Norwegian scabies in a patient with AIDS: report of a case". *Cutis*, 56(1), 57-60, (1995).
- Tachibana T.;** "The Merkel cell: recent finding and unresolved problem ." *Arch. Histol. Cytol.*, 58,379-396, (1995).
- Tachibana, K.;** "Transdermal delivery of insulin to alloxan-diabetic rabbits by ultrasound exposure." *Pharmaceutical Research*, 9, 952-954, (1992).
- Takahashi K.; Tamagawa S.; Katagi T.; Yoshitomi H.; Kamada A.; Howard J.; Nishihata T.; Mizuno N.;** "In Vitro Transport of Sodium Diclofenac across Rat Abdominal Skin: Effect of Selection of Oleaginous Component and the addition of Alcohols to the Vehicle". *Chem. Pharm. Bull.*, 39(1),154-158, (1991).
- Takamashi M.; Tekuza T.; Katunuma N.;** "Phosphorilated Cystein alpha is a natural substrate of epidermal transglutaminase for formation of skin cornified cell envelope." *FEBS Lett.*, 308, 79-82 (1992).
- Teunissen M.B.M.;** "Dynamic nature and fuction of epidermal Langerhans cells in vivo and in vitro: a review, with emphasis on human Langerhans cells." *Felstochem. J.*, 24, 697-716, (1992).
- Thacharodi D.; Panduranga-Rao K.;** "Development and in vitro evaluation of chitosan-based transdermal drug delivery systems for the controlled delivery of propranolol hydrochloride". *Biomaterials*, 16 (2), 145-148, (1995).
- Thacharodi D.; Panduranga-Rao K.;** "Release of nifedipine through crosslinked chitosan membranes". *International Journal of Pharmaceutics*, 96, 33-39, (1993a).
- Thacharodi D.; Rao P.;** "Release of nifedipine through crosslinked chitosan membranes". *Int. J. Pharm.*, 96, 33-39 (1993b).
- The Merck Index**, an enciclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 11^a edition, Merck & Co, Inc Rahway Nueva York, (2001).
- Tregear R.T.;** *Physical Functions of Skin*, Academic Press, New York, (1966).
- Treherne J.E.;** "The permeability of skin to some non- electrolytes." *J. Physiol.*, 133, 171-175, (1956).
- Tuma M.C.; Gelfand V.I.;** "Molecular mechanisms of pigment transport in melanophores pigment." *Cell Res.*, 12, 283-294, (1999).

- U.S.P. 26.** The United States Pharmacopoeial Convention, Inc., USP. 26. Mack Printing Company, Rocksville, (2003).
- U.S.P. DI.** The United States Pharmacopoeial Convention, Inc, Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud y el Ministerio De Sanidad y Consumo de España. Einsa, Madrid, (1989).
- Velasco, A.;** "Medicación Tópica (Capítulo 45)". En: *Velazquez Farmacología*. (16ª edición). Interamericana McGraw-Hill, Madrid, (1993).
- Wallwork S.C.; Grant D.J.W.;** "Propiedades de mezclas y disoluciones." En: *Química y Física para estudiantes de farmacia y biología*, 1ª edición, Editorial Alhambra, Madrid, 234-235, (1987).
- Walters H.;** "Dermatological & transdermal formulations." En: *Drugs and Pharmaceutical Sciences*, vol 119, 4ª edición, Marcel Dekker Inc, New York , (2002).
- Wang D.M.; Lin F.C.; Chen L.Y.; Lai J.Y.;** "Application of asymmetric TPX membranes to transdermal delivery of nitroglicerín". *Journal of Controlled Release*, 50, 187-195, (1998).
- Wertz P.W.; Berg B. Van der.;** "The physical chemical and funcional properties of lipids in the skin and other biological barriers." *Chem. Phys. Lipids.*, 91, 85-96, (1998).
- Wertz P.W.; Downing D.T.;** "Cap 1: Stratum Corneum: Biological and Biochemical considerations." En: *Transdermal Delivery of Drugs*, Editado por J. Hadgraft y R.H. Guy, Marcel Dekker Inc, New York ,1-17,(1989).
- Wester R.C.; Maibach H.I.;** "Percutaneous Absorption of Drugs". *Clin. Pharmacokine.*, 23(4), 253-266, (1992).
- Whitworth, C.W. y Asker, A.F.;** "Effect of small-scale preparation techniques on diffusion of Salicylic acid from various ointment bases". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, 1619, (1974).
- Whitworth, C.W.;** "Effect of various liquids on the diffusion of Salicylic Acid from ointment bases". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57,1540, (1968).
- Wiechers J.W.;** "The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs". *Phar. Weekbl. Sci.*, 6, 185-283, (1989).
- Wilkes G.L.; Brown I.A.; Widnauer R.H.;** "The biochemical properties of skin". *Crit. Rev. Bioeng.*, 453-458, (1973).
- Williams A.C.; Barry B. W.;** "Terpenes and the lipid protein partitioning. Theory of skin penetration enhacement". *Pharm. Res.*, 8(1), 17-24, (1991).

- Williams A.C.; Barry, B.W.;** "Skin Absorption Enhancers". *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 9(3,4), 305-353, (1992).
- Williams P.L.; Warwick R.;** *Gray Anatomía*, Tomo II, Editorial Alhambra Longman, Madrid, pp:1332-1344, (1992).
- Williams R.L.; Thakker K.M.; John V.; Lin E.T.; Gee W.L.;** "Nitroglycerin absorption from transdermal systems: formulation effects and metabolite concentrations". *Pharmaceutical Research*, 8, 744-749, (1991).
- Woolfson A.D.; McCafferty D.F.; McClelland K.; Boston V.;** "Concentration-response analysis of percutaneous local anaesthetic formulations." *Br. J. Anaesth.*, 5, 589-681, (1988).
- Worlen L.; Engblom J.; Andersson M.; Forslind B.;** "A new computer-based evaporimeter system for rapid and precise measurement of water diffusion through Stratum Corneum in vitro." *J. Invest. Dermatol.*, 113, 533-540, (1999).
- Yasunori, M.; Kenji, S.; Hideshi, N.;** "The Transdermal Drug Delivery Systems and Transcutaneous Absorption." *Acta-Derm-Venereol-Suppl-Stockh*, 74,15-17, (1994).
- Yuspa S.H.;** "The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis." *Cancer Res.*, 54, 1178-1189, (1994).
- Zuber, M.; Chemtob, C.; Chaumeil, J.C.;** "Disponibilité à partir des formes dermiques. IV. Utilisation de membranes et de phases réceptrices de natures différentes". *Sci. Techn. Pharm*, T.9, 241, (1980).

