

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL



Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Tesis para optar por el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas

Laboratorio de Química Fina (INTEC)

ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS POR VÍA TRANSDÉRMICA

Lic. Luciano Nicolás Mengatto

Dr. Julio LUNA
Director de Tesis

Dra. María Inés CABRERA
Co-directora

Año 2010

***A mi familia
A mis amigos***

***Hay un momento para todo y un tiempo para cada cosa bajo el sol
(Libro del Eclesiastés)***

Agradecimientos y otras palabras

Aquí estoy a casi 11 años de haber entrado por primera vez en esta Facultad escribiendo los agradecimientos de la tesis de doctorado. Seguramente ese día no imaginé este momento y menos aún todo lo que pasó durante estos años.

Ahora que los resultados están discutidos y las conclusiones escritas, quiero tomarme el tiempo de escribir sobre lo que particularmente este trabajo de tesis dejó en mi persona. Los resultados y las conclusiones que quedan para mí, para mis recuerdos de estos años de becario doctoral. Empecé, terminé y volví a empezar muchas veces. En ciertas ocasiones me sentí desanimado pero nunca dejé de creer en mí. Esa confianza en mi mismo, es lo que se transformó en voluntad e impulsó el trabajo hacia delante. Sin embargo, ese impulso también recibió el inestimable aporte de todos los que de una u otra manera participaron de este trabajo de tesis. De aquellos que me reconfortaron con sólo preguntar; “tus cosas como van”, “te puedo ayudar en algo”; cuando me veían naufragar en el mar de las ciencias o de la vida sin saber hacia donde estaba el norte. Es difícil expresar en pocas palabras mi agradecimiento a las personas que he tenido cerca no sólo en lo profesional, sino también y por sobre todas las cosas, en lo personal. En las ocasiones en que he tenido la oportunidad de leer otras tesis, muchos comparan el trabajo realizado con un largo camino recorrido; que en algunos casos presentó una pendiente empinada. Para otros, la imagen de un viaje resultó útil al momento de contar su experiencia. En mi caso, me tomo una licencia, y utilizaré las palabras de un poeta para expresar mis sensaciones:

“Si no creyera en la balanza, en la razón del equilibrio, si no creyera en la esperanza /

Si no creyera en lo que agencio, si no creyera en mi camino, si no creyera en mi sonido, si no creyera en mi silencio / Si no creyera en lo más duro, si no creyera en el deseo, si no creyera en lo que creo, si no creyera en algo puro / Si no creyera en cada herida, si no creyera en lo que esconde hacerse hermano de la vida / Si no creyera en quien me escucha, si no creyera en lo que duele, si no creyera en lo que quede, si no creyera en lo que lucha / qué cosa fuera la maza sin cantera” S.R.

Como ya mencioné hubo un aporte muy importante a mi voluntad, para que no dejara de creer, que vino desde ustedes. Quiero agradecer:

A mi familia: por enseñarme a ser perseverante, a superarme. Gracias porque sé que no es fácil aguantarme con mis cambios de ánimo. Gracias por acompañarme siempre, cuidarme y ocuparse de mí. Gracias a los que lo hacen en este mundo y a los que ya lo hacen desde otro lugar. Siéntanse todos partícipes de este logro.

A mis amigos, a mi gente de San Justo, por estar en las cosas de la vida, por interesarse continuamente sobre el desarrollo de esta tesis y brindarme palabras de aliento.

A Julio Luna por haber confiado en mí para llevar adelante este proyecto y haberme tenido paciencia. Por continuar confiando en mis ideas de trabajo y por sus recomendaciones.

A María Inés Cabrera y Ricardo Grau, por sus recomendaciones y recibimiento en este grupo de trabajo.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL) por haberme aceptado como tesista para llevar a cabo mis estudios de postgrado y realizar el seguimiento académico de mi doctorado.

Muy especialmente, a todos mis compañeros - amigos de trabajo, a los que están aún en el grupo y a los que no. Les agradezco las largas horas de laboratorio compartidas, las risas, las charlas, el apoyo, porque hicieron que el trabajo de investigación sea más agradable sobre todo en las ocasiones en las que no lo era. Gracias también por los momentos compartidos fuera del ámbito laboral. Les digo gracias entonces a: Andrea, Laura, Luciana, Patricia, Sonia M., Victoria, Alejandro, Alexis, Juan Pablo y Marcelo, que estuvieron desde el primer minuto de inicio de este trabajo. Gracias a mis compañeros de laboratorio por su constante interés en la evolución de mi trabajo y por sus colaboraciones: Jesica, Ludmila, Marianela, Sonia B., Daniel, Franco, Ignacio H., Nicolás, Mariano y Santiago.

A Susana Gervasio, María Laura Olivares e Ignacio Rintoul, dispuestos siempre a ayudarme a solucionar los problemas, darme ánimo y responder de manera incansable a todas mis preguntas.

A Graciela Ferreyra por su trabajo en espectroscopia RMNp y aportes para poder explicar y entender los resultados de los estudios de difusión.

A los Dres. Orozco y Zanetta, por mostrarse tan disponibles en el suministro de material de experimentación.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y al Laboratorio Industrial Farmacéutico S.E. (LIF S.E.), que financiaron mi trabajo de tesis. En particular agradezco la buena predisposición y constante interés de los miembros del Directorio del LIF S.E., y de Ma. Cecilia Selis y Oscar Prendes.

A los becarios, profesionales e investigadores de los Grupos: Ingeniería de los Fotorreactores, Ingeniería en Alimentos y Biotecnología y Polímeros y Reactores de Polimerización, pertenecientes al INTEC.

A todos los que sin querer he omitido vuestros nombres pero espero se sientan aludidos en algunas de las citas anteriores.

La presente tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a reuniones científicas:

Publicaciones

✓ *Influence of cross-linking density on swelling and estradiol permeation of chitosan membranes.* Luciano Mengatto, Julio A. Luna, María I. Cabrera. Journal of Materials Science, 45(4): 1046-1051 (2010).

✓ *Use of chitosan membranes as a mimic of human epidermis for the development of an estradiol delivery system.* Luciano Mengatto, Julio A. Luna, María I. Cabrera. Enviado a la revista European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, EJPB-D-10-00323.

✓ *Factorial design to study the influence of thermal treatment on estradiol permeation in chitosan membranes.* Luciano Mengatto, María I. Cabrera, Julio A. Luna. Enviado a la revista Advances in Polymer Technology, ADV-08-10-112 .

Reuniones Científicas

✓ 1º Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos-BIOMAT 2009. Rosario, 25, 26 y 27 de Agosto de 2009.

Presentación del Póster: *“Estudios de permeabilidad de estradiol en membranas de quitosano. Efecto del tiempo de entrecruzamiento.”* Luciano Mengatto, Julio A. Luna, María I. Cabrera.

Resumen publicado en Biocell, 33(3), 2009.

✓ XVIIº Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo. Concordia, 27, 28 y 29 de Octubre de 2009.

Presentación del Póster: *“Estudio del efecto del tratamiento con calor seco sobre el flujo de estradiol en membranas de quitosano.”* Luciano Mengatto, Julio A. Luna, María I. Cabrera.

✓ 1º Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas - RICiFa 2010. Córdoba, 24 y 25 de Junio de 2010.

Presentación del Póster: *“Desarrollo y evaluación in vitro de films de quitosano para liberación de estradiol.”* Luciano Mengatto, Julio A. Luna, María I. Cabrera.

El resumen será publicado en la revista AAPS Pharm Sci Tech.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1: DESARROLLO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN	1
1. PIEL Y ADMINISTRACIÓN TRANSDÉRMICA DE MEDICAMENTOS	1
1.1 Anatomía e histología cutánea	2
1.2 Transporte de fármacos a través de la piel	6
1.2.1 Farmacología General: Farmacocinética	7
1.2.2 Farmacología Dermatológica	9
1.2.2.1 Factores Biológicos	10
1.2.2.2 Factores Físicoquímicos	11
1.2.2.3 Vías de penetración de drogas	13
1.3 Sistemas de liberación de drogas para terapia hormonal	15
1.4 Ensayos de absorción transdérmica <i>in vitro</i>	18
2. QUITINA – QUITOSAN	22
2.1 Características físicoquímicas del quitosan	25
2.2 Aplicaciones del quitosan	27
2.3 Propiedades funcionales del quitosan	28
2.3.1 Utilidad de las membranas de quitosan	31
3. HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS	33
3.1 Diseño y análisis de experimentos	34
3.1.1 Diseño Experimental	35
3.1.1.1 Diseño Factorial Fraccionado	38
3.1.1.2 Metodología de superficie de respuesta	39
3.1.1.2.1 Optimización	42
3.1.1.2.2 Metodología para el cálculo de la función deseabilidad	42
4. CONCLUSIONES	44

CAPÍTULO 2: DESARROLLO EXPERIMENTAL GENERAL

1. CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSAN	46
1.1 Introducción y objetivos	46
1.2 Materiales y métodos	49
1.2.1 Equipamiento	49
1.2.2 Reactivos y materiales	49

1.2.3 Determinación del contenido de cenizas	49
1.2.4 Identificación por espectroscopía infrarroja	50
1.2.5 Determinación del grado de desacetilación	50
1.2.6 Determinación viscosimétrica de masas moleculares	50
1.3 Resultados y discusión	50
2. CARACTERIZACIÓN DEL ESTRADIOL Y DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	56
2.1 Introducción y objetivos	56
2.2 Materiales y métodos	57
2.2.1 Equipamientos y programas de computación	57
2.2.2 Reactivos y materiales	57
2.2.3 Identificación por espectroscopía infrarroja	57
2.2.4 Desarrollo de un método de cuantificación de estradiol mediante cromatografía líquida de alta resolución	58
2.3 Resultados y discusión	58
3. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE SEPARACIÓN DE EPIDERMIS A PARTIR DE UN FRAGMENTO DE PIEL COMPLETA	62
3.1 Introducción y objetivos	62
3.2 Materiales y métodos	63
3.2.1 Reactivos y materiales	63
3.2.2 Separación de epidermis	63
3.2.3 Determinación de la transmisión de vapor de agua	64
3.3 Resultados y discusión	64
4. CONCLUSIONES	66
CAPÍTULO 3: CELDA VERTICAL DE FRANZ	
1. CELDA VERTICAL DE FRANZ: ENSAYOS DE ABSORCIÓN <i>IN VITRO</i> DE ESTRADIOL	68
1.1 Introducción y objetivos	68
1.2 Materiales y métodos	72
1.2.1 Equipamiento y programas de computación	72
1.2.2 Reactivos y materiales	73

1.2.3 Preparación y entrecruzamiento de membranas de quitosan	73
1.2.4 Caracterización de las membranas de quitosan	74
1.2.4.1 Ensayos de absorción de estradiol en celda de Franz	74
1.2.4.2 Evaluación del contenido de agua	75
1.2.4.3 Ensayos de espectroscopía de absorción atómica por llama para determinación de sodio	75
1.2.4.4 Caracterización por espectroscopía infrarroja	76
1.2.4.5 Determinaciones de movilidad molecular con espectroscopía de resonancia magnética nuclear pulsada	76
1.2.4.6 Observación por microscopía electrónica de barrido	77
1.3 Resultados y discusión	77
1.3.1 Ensayos de absorción de estradiol en celda de Franz utilizando epidermis	77
1.3.2 Ensayos de absorción de estradiol en celda de Franz utilizando membranas de quitosan	79
1.3.2.1 Selección de factores	79
1.3.2.2 Análisis de los factores	81
1.3.2.3 Optimización de la variable respuesta	82
1.3.2.4 Modelado y optimización de la variable respuesta	83
1.3.2.5 Caracterización de membranas de quitosan	85
1.4 CONCLUSIONES	97
CAPÍTULO 4: EQUIPO PARA ENSAYOS DE DISOLUCIÓN	
1. EQUIPO PARA ENSAYOS DE DISOLUCIÓN: ENSAYOS DE LIBERACIÓN – ABSORCIÓN <i>IN VITRO</i> DE ESTRADIOL	98
1.1 Introducción y objetivos	98
1.2 Materiales y métodos	101
1.2.1 Equipamiento y programas de computación	101
1.2.2 Reactivos y materiales	101
1.2.3 Preparación y entrecruzamiento de membranas de quitosan	102
1.2.4 Ensayos de liberación – absorción de estradiol desde parche comercial	102
1.2.5 Preparación de un film de quitosan para liberación	103

de estradiol	
1.2.5.1 Ensayos de liberación – absorción de estradiol desde film de quitosan	103
1.2.5.2 Caracterización por espectroscopía infrarroja	103
1.2.5.3 Observación por microscopía electrónica de barrido	104
1.3 Resultados y discusión	104
1.3.1 Ensayos de liberación – absorción de estradiol	104
1.3.1.1 Desde parche comercial	104
1.3.1.2 Desde parche comercial y a través de epidermis	104
1.3.1.3 Desde parche comercial y a través de membranas de quitosan	106
1.3.1.3.1 Modelado y optimización de la variable respuesta	107
1.3.1.3.2 Aplicación de la membrana optimizada al desarrollo de un sistema de liberación de estradiol	111
1.4 CONCLUSIONES	115
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES - PERSPECTIVAS FUTURAS	116
REFERENCIAS	121

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: DESARROLLO TEÓRICO

Figura 1.1: Detalle morfológico de la piel (figura extraída de Villarino y Landoni, 2006).	2
Figura 1.2: Representación de la estructura microscópica de la EPD (figura extraída de Kielhorn y col., 2005).	3
Figura 1.3: Modelo “ladrillo y cemento” descriptivo de la organización del estrato corneo.	5
Figura 1.4: Difusión a través de: (1) la capa córnea, (2) el folículo piloso, (3) la glándula sudorípara (figura extraída de Barry, 2001).	14
Figura 1.5: Diagrama simplificado del estrato corneo y 2 microrutas para la penetración de drogas (figura extraída de Barry, 2001).	15
Figura 1.6: Estructura de la celulosa, la quitina y el QUI (figura extraída de Ravi Kumar, 2000).	24
Figura 1.7: Reacción por la cual se obtiene QUI a partir de la desacetilación de la quitina (figura extraída de Ravi Kumar, 2000).	24
Figura 1.8: Variación en la microdureza con el tratamiento térmico (60.0 °C) para membranas de QUI con alto peso molecular (QO ₁) y bajo peso molecular (QO ₂) (figura extraída de Retuert y col., 2000).	31
Figura 1.9: Superficie de respuesta tridimensional y su gráfica de contorno en donde se observa la respuesta (eje z) en función de la variable 1 y la variable 2 (plano x, y) (figura extraída de Myers y Montgomery, 1995).	40
Figura 1.10: Diseño central compuesto para 3 factores x_1 , x_2 y x_3 . Punto central (○), puntos factoriales (●) y puntos axiales (x) (figura extraída de Lundstedt y col., 1998).	41
Figura 1.11: Curvas de la función deseabilidad individual cuando se desea ajustar la respuesta a un valor fijo (T) (figura extraída de Myers y Montgomery, 1995).	43

CAPÍTULO 2: DESARROLLO EXPERIMENTAL GENERAL

Figura 2.1: Monómeros de QUI, (a) desacetilado, (b) acetilado.	47
Figura 2.2: Espectro IR del QUI.	51
Figura 2.3: Espectro ¹ H RMN de QUI obtenido a 70.0 °C.	52
Figura 2.4: Espectro ¹ H RMN de QUI obtenido a 70.0 °C (a) 87.0 % de GD, (b) 100.0 % de GD (figuras extraídas de Lavertu y col., 2003), y (c) QUI utilizado en esta tesis.	53

Figura 2.5: Espectro ^1H RMN de QUI obtenido a 70.0 °C con el agregado de ácido acético (a) figura extraída de Lavertu y col., 2003 y (b) QUI utilizado en esta tesis.	54
Figura 2.6: Viscosidad en función de la concentración de QUI.	55
Figura 2.7: Estructura química de E2.	56
Figura 2.8: Espectro IR de E2 y E2 estándar.	59
Figura 2.9: Espectro UV de una solución de E2 de 50.0 ppm en mezcla etanol:PBS.	59
Figura 2.10: Recta de ajuste de los datos experimentales.	60
Figura 2.11: Fragmento de piel humana completa.	65
Figura 2.12: Fragmento de EPD humana.	65
Figura 2.13: Recipiente con CaCl_2 y EPD humana utilizado para determinar la transmisión de vapor de agua.	66

CAPÍTULO 3: CELDA VERTICAL DE FRANZ

Figura 3.1: Perfil de concentraciones a través de una membrana en el EE.	69
Figura 3.2: Perfil representativo de las cantidades acumuladas de soluto en el compartimento receptor en función del tiempo (figura extraída de Kielhorn y col., 2005).	70
Figura 3.3: Flujo y cantidad acumulada en función del tiempo para condiciones de dosis infinita y finita (figura extraída de Kielhorn y col., 2005).	71
Figura 3.4: Cantidad de E2 acumulado en función del tiempo para pacientes, a) A y b) B.	78
Figura 3.5: a) Celda vertical de Franz y b) Fragmento de EPD.	79
Figura 3.6: Gráfico de Probabilidad Normal y Diagrama de Pareto. A) Concentración de QUI, B) Concentración de TPP, C) Tiempo de EC y D) Tratamiento Térmico.	81
Figura 3.7: Membrana de QUI.	82
Figura 3.8: Estructura química del TPP.	85
Figura 3.9: Cantidad de E2 acumulado en función del tiempo para 3 replicas de membranas de QUI.	86
Figura 3.10: Contenido de agua para distintos tiempos de EC (tEC) a) Grupo 1 y b) Grupo 2.	87
Figura 3.11: Espectros de IR de membranas no entrecruzadas, con distintos tiempos de EC y de TPP.	88

Figura 3.12: Micrografías de secciones transversales, a y b) Membranas preparadas con solución de polímero al 1.59 % p v⁻¹, c y d) con solución al 3.5 % p v⁻¹. **94**

Figura 3.13: Micrografías de superficie, a) Membranas preparadas con solución de polímero al 1.59 % p v⁻¹ y b) con solución al 3.5 % p v⁻¹. **95**

CAPÍTULO 4: EQUIPO PARA ENSAYOS DE DISOLUCIÓN

Figura 4.1: Sistema *sandwich*. **98**

Figura 4.2: Esquema sistema tipo matricial. **99**

Figura 4.3: Cantidad de E2 acumulado en función del tiempo. **104**

Figura 4.4: Cantidad de E2 acumulado en función del tiempo para la Paciente B **105**

Figura 4.5: a) Equipo para ensayos de disolución SR8-Plus, b) Parche adherido al fragmento de EPD y c) Sistema *sandwich* en el vaso durante un ensayo de liberación-absorción. **105**

Figura 4.6: Superficies de respuesta correspondientes a la función deseabilidad para un par de factores manteniendo el otro fijo en su valor óptimo. QUI: concentración de la solución de QUI (% p v⁻¹), TPP: concentración de la solución de TPP (% p v⁻¹) y tEC: tiempo de EC (min). **109**

Figura 4.7: Cantidad de E2 acumulado en función del tiempo para Parche-EPD y Parche-Membrana Optimizada. **109**

Figura 4.8: a) Sistema A: film para liberación de E2, Sistema B: film para liberación de E2 más membrana optimizada, b y c) Sistemas A y B, respectivamente durante un ensayo de liberación – absorción. **111**

Figura 4.9: Cantidad de E2 acumulado en función del tiempo, a) Sistema A: film para liberación de E2 y b) Sistema B: film para liberación de E2 más membrana optimizada. **112**

Figura 4.10: Espectros de IR de films sin E2, con E2 y de E2. **112**

Figura 4.11: Micrografías de, a y b) Films de QUI sin E2, c y d) Films con E2. **113**

Figura 4.12: Micrografía de film de QUI con E2, detalle de micropartícula de E2 recubierta de poloxamer. **114**

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1: DESARROLLO TEÓRICO

Tabla 1.1 Ejemplos de valores de α	41
--	-----------

CAPÍTULO 2: DESARROLLO EXPERIMENTAL GENERAL

Tabla 2.1: Frecuencias de absorción características del espectro IR del QUI.	51
---	-----------

Tabla 2.2: Viscosidad de las soluciones de QUI.	55
--	-----------

Tabla 2.3: Parámetros estadísticos obtenidos del ajuste de las variables concentración de analito y área de pico.	61
--	-----------

CAPÍTULO 3: CELDA VERTICAL DE FRANZ

Tabla 3.1: Valores de flujo y coeficientes de permeabilidad.	78
---	-----------

Tabla 3.2: Combinaciones de los factores evaluados en el diseño y resultados experimentales.	80
---	-----------

Tabla 3.3: Resultados del test ANOVA aplicado a los datos experimentales del diseño Factorial Fraccionado.	80
---	-----------

Tabla 3.4: Combinaciones de los factores evaluados en el diseño y resultados experimentales.	83
---	-----------

Tabla 3.5: Resultados de experiencias adicionales.	86
---	-----------

Tabla 3.6: Valores de parámetros correspondientes a la fracción de protones rígidos.	89
---	-----------

Tabla 3.7: Valores de parámetros correspondientes a la fracción de protones móviles.	90
---	-----------

Tabla 3.8: Moléculas de agua en cada fracción.	92
---	-----------

CAPÍTULO 4: EQUIPO PARA ENSAYOS DE DISOLUCIÓN

Tabla 4.1: Combinaciones de los factores evaluados en el diseño y resultados experimentales.	106
---	------------

Tabla 4.2: Resultados del test ANOVA aplicado a los datos experimentales del diseño central compuesto.	107
---	------------

LISTA DE ABREVIACIONES

Quitosan	QUI
17 β -estradiol	E2
Tripolifosfato de sodio	TPP
Entrecruzamiento	EC
Epidermis	EPD
Grado de desacetilación	GD
Temperatura	T
Terapia hormonal	TH
Estado estacionario	EE
Coefficiente de permeabilidad	<i>K_p</i>
Coefficiente de difusión	<i>D</i>
Infrarrojo	IR
Resonancia magnética nuclear	RMN
Resonancia magnética nuclear pulsada	RMNp
Ultravioleta	UV
Sodio	Na
Coefficiente de variación	CV %
Análisis de la varianza	ANOVA
Tiempo de relajación	T ₂
Tiempo de relajación para membranas con x minutos de tiempo de entrecruzamiento	T _{2iEC: xmin}
Intensidad de señal	A
Segundo momento	M ₂
Segundo momento para membranas con x minutos de tiempo de entrecruzamiento	M _{2iEC: xmin}

RESUMEN

El estudio de los procesos de absorción – liberación de 17β -estradiol a través de fragmentos de epidermis humana y a través de membranas de quitosan, fue la base para el desarrollo de un sistema de administración transdermal de estradiol. Para realizar los estudios de estos procesos se trabajó con la celda vertical de Franz y un equipo para ensayos de disolución conforme a normas USP/NF y FDA.

✓ Se caracterizaron los 2 reactivos claves para el desarrollo de esta tesis. Quitosan: Se identificó el polímero mediante el uso de espectroscopia de infrarrojo. Se determinó su grado de desacetilación mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear y su masa molecular viscosimétrica a través de la ecuación de Mark-Houwink utilizando el valor de viscosidad intrínseca.

17β -estradiol: Se identificó la droga mediante el uso de espectroscopia de infrarrojo y determinación del punto de fusión y comparación con un estándar. Se desarrolló un método de cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución.

✓ Se obtuvieron fragmentos de epidermis humana a partir de piel completa mediante tratamiento con solución de tripsina, siendo los mismos aptos para estudios de difusión. Los ensayos de absorción en celda de Franz y de liberación – absorción en el equipo para ensayos de disolución, permitieron la determinación de los valores de flujo de 17β -estradiol en los fragmentos de epidermis.

✓ Se construyeron diseños experimentales Factoriales Fraccionados con el objetivo de realizar experiencias de una manera eficiente y programada. Con ellos se estudió el efecto de variables que afectan el flujo de 17β -estradiol a través de membranas de quitosan. Mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta, a través de la construcción de Diseños Central Compuesto, se determinaron las condiciones experimentales óptimas donde el sistema genera los resultados esperables: una membrana con propiedades de permeabilidad similares a epidermis humana.

✓ Las membranas de quitosan utilizadas fueron caracterizadas mediante ensayos de: absorción de 17β -estradiol, evaluación del contenido de agua, espectroscopias de absorción atómica, infrarrojo y de resonancia magnética nuclear pulsada, y observación por microscopía electrónica de barrido. Se obtuvo información sobre la

interacción quitosan - 17β -estradiol con el objeto de comprender el o los mecanismos de transporte de la droga a través o desde membranas del polímero. En las membranas con distintos tiempos de entrecruzamiento se identificaron dos tipos de microporos, hidrofílicos e hidrofóbicos.

✓ Se prepararon films de quitosan como prototipos de sistemas de administración transdermal. Se realizaron ensayos de liberación con estos sistemas, solos y junto con la membrana que simula epidermis humana, presentando una equivalencia con el parche comercial.

SUMMARY

The study of 17β -estradiol absorption - release processes through human skin epidermis and chitosan membranes, was the basis for the development of an estradiol transdermal delivery system. Experiments were conducted using vertical Franz diffusion cell and dissolution test equipment.

✓ The most important reagents were characterized.

Chitosan: the polymer was identified by using infrared spectroscopy. Deacetylation degree was evaluated by nuclear magnetic resonance spectroscopy. The intrinsic viscosity was evaluated and average molecular weight was determined based on the Mark-Houwink equation.

17β -estradiol: the drug was identified by using infrared spectroscopy and comparison with a standard. Melting point was also evaluated. A high performance liquid chromatography method was developed for the determination of 17β -estradiol.

✓ Full skin was immersed in a solution containing trypsin, then, the intact epidermis was easily separated from the dermis. Diffusion studies with epidermis allowed to the 17β -estradiol flux determination.

✓ Fractional factorial designs were performed in order to identify active formulation variables influencing estradiol flux through chitosan membranes. Central composite design was carried out in order to find out the combination of independent factors that allowed the preparation of the optimized membrane: a chitosan membrane as a mimic of human epidermis.

✓ Chitosan membranes were characterized by: estradiol diffusion studies, water content evaluation, infrared spectroscopy, atomic absorption spectroscopy, pulsed nuclear magnetic resonance and scanning electron microscopy. Information about chitosan – 17β -estradiol relationship was obtained in order to understand mass transport phenomena through or from polymer membranes. Hydrophilic and hydrophobic micropores were identified in cross-linked membranes prepared with different cross-linking times.

✓ Chitosan films were prepared as a prototype of transdermal delivery system. These films were tested alone and attached to the optimized chitosan membrane. Results were comparable to that obtained with a commercial patch.

OBJETIVOS

El propósito general de esta tesis fue poner a punto un modelo experimental *in vitro* que pueda utilizarse como plataforma para el diseño de un sistema de administración transdermal. A fin de lograr este objetivo se trabajó en la tecnología de membranas, utilizando membranas de quitosan, y la droga 17 β -estradiol fue seleccionada para el desarrollo de los estudios de liberación – absorción debido a su uso extensivo y a la alta relevancia en la terapia hormonal.

Objetivos específicos

- ✓ Contribuir al diseño de membranas que simulen la permeabilidad de epidermis humana, controlando variables factibles de ser modificadas en la práctica, tales como concentración de biopolímero, concentración de agente de entrecruzamiento y tiempo de la reacción de entrecruzamiento.

- ✓ Contribuir a la tecnología de liberación controlada de drogas y generar conocimientos para el diseño de sistemas matriciales.

- ✓ Desarrollar prácticas y productos que faciliten las maniobras terapéuticas, junto con criterios para el diseño de dispositivos mejorados para la liberación de drogas utilizadas en terapia hormonal. Por mejorados se entiende que cumplan con los requerimientos señalados y que presenten una bioequivalencia con dispositivos comerciales.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Para lograr los objetivos planteados y explorar racionalmente en el desarrollo de una plataforma de trabajo que permita realizar las experiencias y extraer conclusiones correctas, se debe conocer el estado del arte del tema. A continuación se realiza una descripción de las 3 grandes áreas involucradas en esta tesis. Para introducir al lector en el campo de la administración de fármacos a través de la piel, se describe a la misma en cuanto a su anatomía, histología y funciones; para abordar luego lo que corresponde a la farmacología dermatológica y los sistemas de liberación de drogas para terapia hormonal. Seguidamente se hace referencia al polímero utilizado, quitosan; explicando sus características, propiedades y funciones, haciendo hincapié en la formación de membranas que es la propiedad funcional que interesa. Finalmente se presentan las herramientas quimiométricas a utilizar, para llevar adelante un diseño planificado de experimentos.

1. PIEL Y ADMINISTRACIÓN TRANSDÉRMICA DE MEDICAMENTOS

Estructuralmente la piel está compuesta principalmente por 2 capas, la más externa denominada *epidermis* (EPD) y una capa subyacente más gruesa, la *dermis*. Ambas en conjunto forman una membrana compacta, que descansa sobre una capa de tejido más laxo, el *tejido celular subcutáneo*. A la piel se asocian distintos anexos (pelo, uñas, glándulas sebáceas y sudoríparas). La piel y sus anexos se denominan en conjunto *sistema tegumentario*.

La piel tiene diversas funciones. Representa una barrera contra la invasión de microorganismos y actúa como protector ante acciones mecánicas, químicas, térmicas y osmóticas. Es de gran importancia en la regulación térmica y el mantenimiento del equilibrio hídrico. Es capaz de secretar y absorber, y es un importante órgano de comunicación.

La piel no sólo cubre toda la superficie corporal sino que continúa a nivel de los orificios naturales, con el epitelio de los aparatos digestivo, respiratorio y genitourinario.

1.1 Anatomía e histología cutánea

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, tiene una superficie media de 1.8 m^2 y un peso de aproximadamente 4 Kg, en un hombre adulto de 70 Kg; puede llegar a contener hasta 1.8 L de sangre o sea un 30 % del total de la sangre circulante. Este último es uno de los factores que junto con la existencia de pigmentos melánicos, y el grosor del estrato córneo determinan la coloración del tegumento. La superficie cutánea no es lisa sino que presenta pliegues y orificios (Geneser, 1993).

La piel posee una compleja estructura. En su disposición se diferencian 3 capas (Figura 1.1): *EPD* que consta de cuatro tipos celulares: queratinocitos, melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans; *dermis* cuyo principal tipo celular son los fibroblastos, e *hipodermis* que es tejido graso o adiposo subcutáneo.

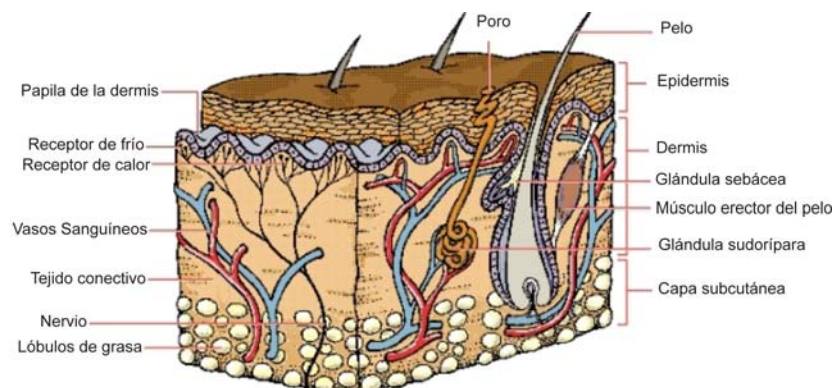


Figura 1.1: Detalle morfológico de la piel (figura extraída de Villarino y Landoni, 2006).

Epidermis: Las células de Langerhans tienen una distribución constante en toda la piel, son elementales en la presentación de antígenos y están involucradas en una gran variedad de respuestas inmunes por medio de la activación de las células T (Kanitakis, 2002), mientras que las células de Merkel se ubican en la región basal y tienen una función mecano-receptora. Estos receptores responden a estímulos de origen variado (dolor, calor, presión) (Boulais y Misery, 2007). Los melanocitos son células productoras de pigmentos que no sólo se encuentran en la piel sino también en el pelo y los ojos, su función en la determinación del color depende esencialmente de su actividad más que del número de células presentes. Por ejemplo la exposición de la piel a los rayos del sol, aumenta la producción de pigmento causando el “bronceado”. Estas células se localizan en la membrana basal en contacto con dicha membrana (Geneser, 1993; Kanitakis, 2002).

Los queratinocitos son las células más abundantes en la EPD (representan el 80 %) y están dispuestos en 4 capas. El espesor (0.1-1 mm aproximadamente) y la estructura

de la EPD son diferentes para cada zona del cuerpo, siendo más gruesa y compleja en la piel lampiña de la palma de la mano y en la planta del pie, mientras que en otros sectores como los párpados es muy fina y sensible.

La descamación normal de los corneocitos más superficiales requiere una renovación celular constante y controlada que tiene su origen en el estrato basal de la EPD. Esta situación supone la existencia de un equilibrio entre los tres compartimientos implicados: el proliferante, situado en la zona más profunda de la EPD; el de las células en tránsito, sometidas a un proceso de diferenciación; y el de las células queratinizadas (Elias, 1981; Villarino y Landoni, 2006). Por tanto en función del grado de diferenciación celular, dentro de la EPD se pueden distinguir varios estratos, que se describen brevemente a continuación y que aparecen esquematizados en la Figura 1.2.

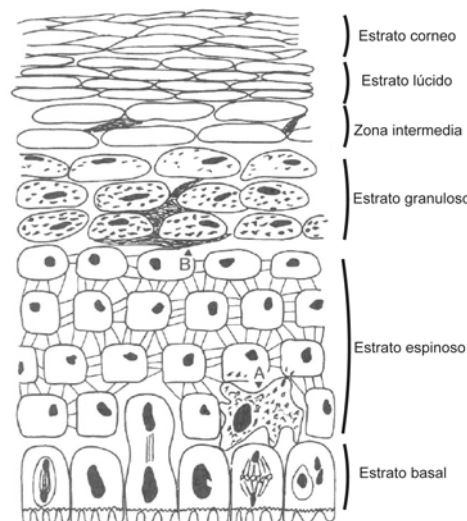


Figura 1.2: Representación de la estructura microscópica de la EPD (figura extraída de Kielhorn y col., 2005).

Estrato germinativo o basal: se encuentra en contacto con una membrana constitutiva de la unión dermoepidérmica en la zona de separación entre la EPD y la dermis, presenta una intensa actividad mitótica. Las células son cilíndricas y están regularmente ordenadas en forma vertical, son indiferenciadas, es decir carecen de marcadores bioquímicos característicos de las células más diferenciadas de las capas superiores (Geneser, 1993). Tras su proliferación las células del estrato basal ascienden, pierden su capacidad proliferativa e inician el complejo proceso de diferenciación que, finalmente, dará lugar a las células queratinizadas.

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 que unen células adyacentes (Elias, 1981).

Estrato Granuloso: El proceso de diferenciación de las células del estrato espinoso conduce a la formación del estrato granuloso, aquí las enzimas comienzan con la degradación del núcleo y las organelas. En ellas abundan unas estructuras ovoides bien delimitadas y de reducido tamaño que poseen un elevado contenido lipídico, denominadas cuerpos lamelares. Cuando las células entran en la última fase de su proceso de diferenciación los cuerpos lamelares son secretados hacia el espacio intercelular y además las células se llenan de agregados densos de contorno irregular, llamados gránulos de queratohialina, que contienen proteínas.

El espacio citoplasmático de la célula granulosa se convertirá en un entramado proteico denso, fundamental en la función barrera que realiza el estrato córneo.

La célula granulosa se transforma en corneocito a través de un complejo proceso que supone una transformación cualitativa y cuantitativa de los componentes proteicos y lipídicos. El primer paso consiste en el desplazamiento de los cuerpos lamelares y su fusión con la membrana plasmática. Esto permite el vertido de lípidos y proteínas al espacio intercelular y la reducción del volumen celular (Elias, 1981).

Estrato córneo: Es la parte más externa o superficial de la EPD. Esta capa no es homogénea en todo el organismo, existen diferencias significativas en su estructura y en su composición química en las diferentes zonas del cuerpo. Se presenta más grueso en las zonas palmar y plantar (aquí existe un estrato adicional denominado estrato lúcido); más delgado en párpados, prepucio, mejillas, abdomen y cara de flexión de las articulaciones.

El estrato córneo constituye la principal barrera cutánea al paso de sustancias procedentes del medio ambiente (Scheuplein y Blank, 1971). Este hecho se explica por su peculiar organización, una estructura biológica especial muy diferente de otras barreras biológicas como las membranas celulares. La organización del estrato córneo puede simplificarse con el modelo denominado “ladrillo y cemento” (del inglés, *brick and mortar*) (Elias, 1981). Este concepto (Figura 1.3) describe la presencia de dos zonas: la primera (representada por los “ladrillos”), de composición fundamentalmente proteica, correspondiente a los corneocitos; la segunda representada por el “cemento”, correspondiente a los lípidos intercelulares. El estrato córneo está entonces constituido por células muertas que poseen en su interior una proteína insoluble, amorfa y rica en sulfuro llamada *queratina*. Estas células están rodeadas de una capa lipídica continua constituida por ceramidas, ácidos grasos y colesterol, a la que se denomina *bicapa lipídica intercelular*. Esta estructura funciona como una barrera, la cual evita la pérdida

excesiva de agua y previene la penetración de moléculas (Potts y Francoeur, 1991). Cualquier alteración cualitativa o cuantitativa de estos lípidos puede repercutir en la eficacia de la función barrera.

Sin embargo, la permeabilidad excepcionalmente baja del estrato córneo, no es debido sólo a la composición lipídica, sino también, a su morfología única que genera un camino tortuoso para la difusión. Como consecuencia, las moléculas en algunos casos deben migrar mayores distancias que el respectivo espesor.

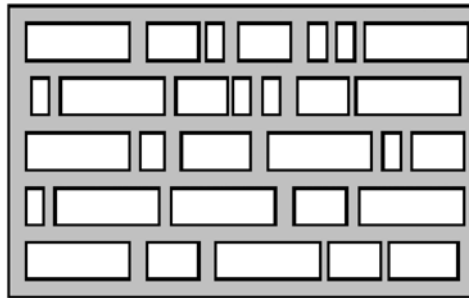


Figura 1.3: Modelo “ladrillo y cemento” descriptivo de la organización del estrato córneo.

El estrato córneo contiene aproximadamente un 15% de agua, 70% de proteínas y 15% de lípidos. El escaso nivel de hidratación se debe a la hidrólisis y degradación de ácidos nucleicos, proteínas, fosfolípidos y otros compuestos con capacidad higroscópica (Barry, 1983). Niveles fisiológicos de agua superiores (30-40%) ocasionan un hinchamiento de los corneocitos, reduciendo progresivamente la capacidad de barrera de la piel.

Como se mencionó anteriormente, no presenta una estructura homogénea, sino que existe un gradiente que refleja los diferentes estadios de maduración de los corneocitos que varían tanto en composición como en la estructuración de sus capas. Los corneodesmosomas son otro tipo de estructura proteica encargada de la comunicación entre los distintos corneocitos a la vez que contribuyen al soporte mecánico de los mismos. Su degradación precede a la descamación (Hou y col., 1991).

Dermis: es la gruesa capa de tejido conectivo sobre la que está asentada la EPD, consta de una matriz que contiene proteínas fibrosas entrelazadas (colágeno, elastina y reticulina) embebidas en una sustancia fundamental amorfa de mucopolisacáridos. Esta sustancia fundamental es un material traslúcido, extensamente hidratado y de consistencia gelatinosa, en el que están inmersas las células y las fibras tisulares. Los nervios, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos atraviesan la matriz; la dermis necesita un aporte sanguíneo eficiente para transportar nutrientes, eliminar los productos de desecho, regular la presión y la temperatura, movilizar las fuerzas de

defensa y contribuir al color de la piel. Este riego sanguíneo (0.05 mL min^{-1} por cm^3 de piel) asegura la absorción y llegada hasta la circulación sistémica de la mayoría de los compuestos que atraviesan la EPD. Debido a lo irregular de la superficie limitante dermoepidérmica, y a la profundidad poco determinada de toda la dermis es difícil fijar exactamente su espesor. Varía desde aproximadamente 0.5 mm en los párpados y el prepucio hasta aproximadamente 2.5 mm en el abdomen y en la región dorsal del tórax, con un promedio de 1-2 mm. La dermis se compone de dos capas: *estrato papilar o superficial* más fino, localizado por debajo de las papilas dérmicas (concavidades de la parte inferior de la EPD), y la *dermis reticular o media*, más gruesa que se encuentra en lo más profundo (Barry, 1983; Kanitakis, 2002). Las células más frecuentes son fibroblastos y macrófagos, aunque también se observan numerosos mastocitos. El fibroblasto tiene como función la elaboración de los elementos fibrosos de la dermis, especialmente colágeno, la enorme cantidad de esta proteína es lo que le confiere a la dermis gran fortaleza mecánica; mientras que la presencia de elastina otra proteína fibrosa contribuye a las propiedades elásticas de la piel (Geneser, 1993).

En la parte inferior de la dermis se originan los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y sudoríparas, que forman junto con las uñas, los anexos cutáneos.

La *unión dermoepidérmica* es una membrana compleja formada por queratinocitos basales y fibroblastos de la dermis, y desempeña un papel fundamental como apoyo mecánico para la adherencia de la EPD a la dermis, regula el intercambio de productos entre estos dos compartimentos y, además participa como soporte a la migración de queratinocitos durante la cicatrización de heridas y de varios tipos de células (células de Langerhans, linfocitos) durante procesos inmunológicos.

Hipodermis: es un tejido graso que representa la parte más profunda de la piel, se extiende bajo la superficie de la dermis a lo largo de todo el cuerpo, con excepción del aparato genital masculino y los párpados, desempeña un papel importante en la termorregulación, aislamiento, provisión de energía y protección contra daño mecánico. Los adipocitos son grandes células redondas con el citoplasma saturado de lípidos (triglicéridos, ácidos grasos) y son las principales células de este tejido (Kanitakis, 2002).

1.2 Transporte de fármacos a través de la piel

El conocimiento de los mecanismos desarrollados por las drogas en su paso por el organismo es de gran importancia en terapéutica.

Un tratamiento racional y seguro para el paciente implica que el médico conozca con claridad los mecanismos por los cuales una droga determinada se absorbe, circula en sangre y se distribuye, las formas como cumple su efecto farmacológico en el sitio de acción, los mecanismos de biotransformación y como se eliminan y excretan sus metabolitos o la misma droga inalterada.

La farmacología otorga al médico las bases necesarias para llevar a cabo una terapéutica eficaz. El efecto perjudicial que eventualmente ocurra, puede ser debido a una terapéutica farmacológica incorrecta, ocasionando la persistencia de la patología que afecta al paciente o la demora en obtenerse la curación. O directamente pueden ocurrir efectos tóxicos en el paciente por la aplicación de una prescripción irracional.

1.2.1 Farmacología General: Farmacocinética

La *farmacocinética* estudia el curso temporal de los fármacos a través del organismo. Sus dimensiones fundamentales se expresan en términos de tiempo y concentraciones. La forma gráfica de expresar este curso temporal es por tanto, la curva de concentraciones plasmáticas del fármaco en función del tiempo que es clave para: conocer la cinética de un fármaco y poder relacionarla con la forma en que se producen sus efectos, saber cuanto va a durar la presencia del fármaco en el organismo, tener elementos de juicio para establecer las pautas de dosificación (determinación de la dosis terapéutica efectiva de los fármacos en uso clínico) y por último para poder explicar muchas reacciones adversas y cuadros de toxicidad.

La *farmacocinética clínica* tiene como objetivo alcanzar y mantener la concentración plasmática del fármaco necesaria para conseguir el efecto terapéutico, sin llegar a producir efectos tóxicos. El curso temporal de las concentraciones plasmáticas de un fármaco depende de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación, que se producen de forma simultánea.

Desde el ingreso del fármaco en el organismo hasta su eliminación, el mismo está en solución y debe atravesar una serie de barreras más o menos difíciles de franquear dependiendo de sus características fisicoquímicas, de la vía por la que se administre y del procedimiento de su eliminación. Estas barreras son membranas celulares formadas por una doble capa lipídica.

Se conoce como *absorción* al proceso que sufren los fármacos desde su administración hasta su acceso al torrente sanguíneo por lo que esto no es aplicable a los medicamentos de uso tópico o a los que se administran directamente en su sitio de acción. Dentro de los procesos de absorción de drogas los más significativos

comprenden, filtración, transporte activo, difusión facilitada, pinocitosis y transporte pasivo. Este último es el más frecuente y la difusión se realiza a favor de un gradiente de concentración, la velocidad de difusión depende de la concentración a ambos lados de la membrana, de las características del fármaco (hidrofilia o lipofilia) y de la membrana (superficie, espesor, composición lipídica). Sólo la fracción no ionizada de un fármaco es soluble en lípidos; la fracción ionizada, soluble en agua difícilmente atraviesa una barrera lipídica.

La *biodisponibilidad*, nos dice la cantidad del fármaco que realmente está disponible para llegar a los tejidos e interactuar sobre sus receptores produciendo su efecto. En algunas circunstancias, no depende sólo de los procesos de absorción sino también de los procesos de liberación del fármaco, de su forma farmacéutica y de la eliminación presistémica que se puede producir. Otro parámetro importante es la *velocidad de absorción*, que se define como el número de moléculas de un fármaco que se absorbe en la unidad de tiempo.

Una vez que el fármaco alcanzó la circulación sistémica, parte se liga a proteínas del plasma y el resto circula en forma de moléculas libres. La fracción ligada a las proteínas guarda siempre un equilibrio con la fracción libre. Cuando moléculas de la fracción libre salen del plasma y se distribuyen en el organismo, una fracción equivalente de moléculas se desliga de las proteínas y pasa a reemplazar a las moléculas de la fracción libre.

La *vida media plasmática* depende parcialmente de la unión del fármaco a las proteínas plasmáticas ya que la fracción ligada no puede atravesar las membranas, no filtra por los glomérulos y no está expuesta a los mecanismos de la biotransformación. La *biotransformación* del fármaco se inicia luego de estabilizado el proceso de distribución. Es un proceso dinámico e irreversible a través del cual diversos sistemas enzimáticos modifican las moléculas de los fármacos dando lugar a otros productos de transformación llamados metabolitos. El metabolito formado, generalmente es un compuesto polar, más hidrosoluble y fácilmente desechable. La mayor parte de los sistemas metabólicos que intervienen en la biotransformación de los fármacos se encuentran en el hígado.

La *eliminación* del fármaco del organismo puede realizarse por diversas vías. Todas las vías de eliminación de líquidos son potencialmente vías de eliminación; es decir que un fármaco puede excretarse por orina, lágrimas, saliva, leche materna, sudor, etc.. También pueden eliminarse a través de las heces cantidades más o menos importantes del fármaco que no se ha absorbido. De todas estas posibles vías de eliminación, la más importante es la vía renal (Malgor y Valsecia, 2000).

1.2.2 Farmacología Dermatológica

La piel como membrana para la administración de sustancias, puede tener un uso tópico o sistémico. El *tratamiento local o tópico* que se aplica directamente sobre la piel, tiene tres objetivos fundamentales: el tratamiento local de alteraciones de la piel, el mantenimiento de las condiciones estéticas y la protección contra agentes externos como las radiaciones solares. El *tratamiento sistémico* implica ingresar a la circulación general de la sangre y distribuirse por todo el cuerpo, lo que implica una acción generalmente más intensa y rápida.

De acuerdo, entonces al tipo de actividad terapéutica, al fármaco y a los excipientes involucrados en la formulación, se pueden desarrollar diferentes preparaciones farmacéuticas: tópicas, endodérmicas y transdérmicas.

En cuanto a las *preparaciones transdérmicas*, el fármaco difunde desde el estrato córneo y alcanza la circulación sistémica. Los *parches* son una de las formas de administración transdérmica más populares y se pueden clasificar en dos grupos principales, *los sistemas de reservorio* y *los sistemas matriciales*. En los primeros, el fármaco se mantiene dentro de un reservorio con una membrana de permeabilidad selectiva, la cual controla la liberación y la difusión a través de la piel (el estrato córneo no es el factor limitante de la penetración y la membrana crea un sistema de liberación controlado de orden cero). En los sistemas matriciales el fármaco está uniformemente disperso en la matriz, la liberación es controlada mediante el entramado polimérico y el estrato córneo es la barrera que limita el paso de las sustancias.

Se define entonces para esta tesis a la *administración transdermal de drogas* (del inglés, *Transdermal Drug Delivery*), como la administración de agentes terapéuticos a través de la piel intacta para lograr un efecto sistémico. Esta administración ofrece las siguientes ventajas sobre la vía oral que es la más común:

- Evita el metabolismo hepático de primer paso, por lo tanto se requiere una dosis menor del fármaco, lo que conlleva a una disminución de la cantidad de metabolitos y de la síntesis de proteínas hepáticas.
- Capacidad de discontinuar la administración por remoción del sistema.
- Capacidad de controlar la entrega de la droga por períodos más largos que el usual tránsito gastrointestinal de las formas orales.
- Capacidad de modificar las propiedades biológicas de la barrera.
- Capacidad de evitar un ambiente fisiológico cambiante, y de degradación (pH variable, microflora intestinal, etc.).

Una de las principales ventajas, es que permite obtener niveles constantes del fármaco en la sangre, evitando así las reacciones adversas asociadas a las fluctuaciones en las concentraciones sanguíneas. Como desventajas, se pueden mencionar: irritación de la piel, preocupaciones cosméticas y en el caso particular de parches, fallas en la adherencia. La liberación del principio activo desde la formulación aplicada en la superficie de la piel y su transporte hacia la circulación incluye diversos pasos: 1) disolución del principio activo y liberación desde la formulación, 2) primer proceso de partición desde la formulación hacia la capa más externa de la piel (estrato córneo), 3) difusión dentro del estrato córneo, 4) segundo proceso de partición desde el estrato córneo hacia la EPD viable y 5) difusión desde la EPD viable hacia los capilares sanguíneos de la dermis e ingreso a la circulación sistémica (Villarino y Landoni, 2006).

Posteriormente a la administración, las drogas pueden penetrar la piel por diferentes vías, y concentrarse localmente o llegar hasta el torrente sanguíneo.

Cuando una molécula alcanza la piel intacta entra en contacto con restos celulares, microorganismos, sebo y otros materiales que forman el factor de hidratación natural, todos en conjunto funcionan como una película que afecta poco a la absorción transdérmica. Entre los factores que si afectan la absorción y la velocidad de absorción encontramos; los factores biológicos y fisicoquímicos.

1.2.2.1 Factores Biológicos

Uno de los aspectos a tener en cuenta es el estado de la piel; las lesiones cutáneas que alteran el estrato córneo hacen que aumente el grado de absorción. El grado de hidratación de la piel también influye; cuando el agua satura la piel, ésta se ablanda y se arruga y su permeabilidad aumenta mucho. En cuanto a la temperatura (T) de la piel, al aumentar ésta se incrementa la vasodilatación y, visto que la difusión a través del estrato córneo es un proceso pasivo, entonces al aumentar la T se incrementará el coeficiente de difusión (D) del permeante (para un gradiente de concentración fijo). El cuerpo humano mantiene un gradiente de T corporal a través de la piel de $37.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el interior y $32.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ fuera, en la superficie. La edad del paciente es otro factor a considerar; la piel de los niños es más permeable que la del adulto.

La región cutánea en la que se aplicará el parche es otro aspecto a considerar debido a que el grosor del estrato córneo y el contenido de anexos son variables en función de la región anatómica. La absorción varía según la zona de aplicación; zonas de alta absorción son la ingle, axilas y cara; zonas de baja absorción son codos, rodillas,

palma de manos y plantas de pies. El tronco es el sitio seleccionado a menudo, por conveniencia, fácil remoción del parche y conformidad del paciente.

El metabolismo cutáneo puede modificar en alguna medida los efectos farmacológicos de las sustancias absorbidas, produciendo metabolitos inactivos o activos. No obstante, la actividad metabólica de la piel es escasa (entre el 2 y el 5 % de los compuestos absorbidos).

Las diferencias entre especies, el espesor y el contenido de lípidos del estrato córneo, la densidad de glándulas sudoríparas y folículos pilosos, el riego sanguíneo, cuestiones bioquímicas que hacen a las reacciones entre las sustancias penetrantes y la piel, son algunos de los puntos en los que las pieles de los seres humanos difieren de aquellas de los animales de laboratorio usados frecuentemente. La piel de los animales se ha utilizado y se utiliza aún para obtener información, pero es mejor utilizar piel humana siempre que sea posible (Barry, 1983).

1.2.2.2 Factores Fisicoquímicos

El vehículo no debe ser un mero soporte del fármaco, sino un sistema de cesión del mismo que permita el arribo hacia el lugar de acción. Un vehículo debe ser fácil de aplicar y retirar, no tóxico ni irritante, químicamente estable, cosméticamente aceptable y farmacológicamente inerte. Los líquidos y sustancias en solución son absorbidos más fácilmente que los materiales secos, los cuales deberán disolverse en la humedad superficial de la piel antes de que la absorción pueda comenzar. En alguno de los sistemas de liberación controlada, la velocidad de liberación puede estar afectada por las propiedades del polímero del que está compuesto el vehículo/transportador.

En cuanto al principio activo los aspectos a considerar en la práctica clínica son: su concentración, extensión de superficie a la que se aplica el preparado, frecuencia de aplicación y tiempo de exposición. La difusión de una molécula en una membrana viene determinada por la resistencia que oponga el medio a su migración. Esta resistencia depende de las características de la sustancia, de las posibles interacciones, de la viscosidad y T del medio. Si se asume que las moléculas son similares entre sí en cuanto a su tamaño, y que adoptan una conformación más o menos esférica, se puede obtener la siguiente ecuación conocida como ley de Stokes-Einstein para el D ($\text{cm}^2 \text{s}$)

Ecuación 1.1

$$D = \frac{K \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

Donde K es la constante de Boltzmann ($J K^{-1}$), r el radio de la molécula (m) y η la viscosidad del medio ($Kg m^{-1} s^{-1}$).

La influencia del pH debe ser tenida en cuenta, ya que la proporción en la que se encuentra ionizada la molécula depende tanto de su pKa como del pH del medio, y si bien de acuerdo a una hipótesis de partición de pH, sólo la forma no ionizada de la droga es capaz de atravesar la membrana lipídica en cantidades significativas, la forma ionizada también puede hacerlo aunque en menor grado.

La lipofilidad/hidrofiliidad de un compuesto influye en la afinidad relativa que presenta un soluto por el vehiculo que lo contiene y la membrana a través de la cual difundirá, y puede evaluarse mediante el coeficiente de partición (P). Experimentalmente algunos autores (Díez-Sales y col., 1993) trabajan con un sistema bifásico para la determinación de tal coeficiente que viene dado por:

$$\text{Ecuación 1.2} \quad P = \frac{C_d}{C_a}$$

En donde C_d es la concentración de la sustancia en el disolvente orgánico (en general octanol) y C_a lo es en agua o un buffer. Otros autores (Cordero y col., 1997) proponen evaluar el coeficiente mediante estudios de distribución del soluto entre la fase acuosa y el tejido a través del cual se estudiará la difusión, de esta manera se determina la concentración del soluto en la solución una vez que se alcanzó el equilibrio, y se estima la concentración en la membrana por diferencia con la concentración inicial de la fase acuosa

$$\text{Ecuación 1.3} \quad P = \frac{(C_0 - C_e) / V_m}{C_0 / V_a}$$

Donde C_0 es la concentración inicial de soluto, C_e es la concentración en el equilibrio, V_m es el volumen de membrana y V_a es el volumen de solución donde se realiza el ensayo. Un coeficiente de partición elevado no siempre es indicativo de una mayor permeabilidad. Sustancias altamente lipofílicas pueden acumularse en las capas superiores de la dermis, dado que la misma se comporta principalmente como una fase acuosa mientras que el estrato córneo es un medio más complejo que posee propiedades hidrofílicas y lipofílicas, y además la presencia de queratina puede llevar a la unión de moléculas y por lo tanto a la formación de reservorios. En general las drogas que difunden más fácilmente son moléculas pequeñas con lipofiliidad moderada.

Las mezclas de solventes polares, pueden producir soluciones de fármaco saturadas y maximizar así el gradiente de concentración a través del estrato córneo. Pero el coeficiente de partición de un fármaco entre la membrana y una mezcla de disolventes generalmente se reduce a medida que aumenta la solubilidad del sistema disolvente. Por consiguiente, estos dos factores (solubilidad y coeficiente de partición) pueden oponerse entre sí en su efecto sobre el flujo a través de la membrana, cuando el sistema no está saturado. En cuanto al tamaño y forma molecular, la absorción está relacionada de forma inversa con ambos; las moléculas más pequeñas penetran más rápido que las grandes (Barry, 1983).

1.2.2.3 Vías de penetración de drogas

El proceso de absorción transdérmica o percutánea es un término global que refiere al pasaje de un compuesto desde la superficie externa de la piel hacia la circulación sistémica. Este proceso puede ser descrito en tres pasos (Kielhorn y col., 2005):

- penetración: es la entrada de una sustancia en una capa o estructura particular, tal como la entrada de un compuesto al estrato córneo;
- permeación: es la penetración a través de una capa en una segunda que es funcional y estructuralmente diferente a la primera;
- resorción: es la entrada de una sustancia al sistema vascular y a la circulación sistémica.

Los estudios de penetración *in vitro* involucran la determinación de una droga aplicada tópicamente, en varias capas de la piel. El objetivo de un estudio de permeación es determinar un perfil cinético que refleje cómo la concentración de un compuesto cambia en el tiempo a medida que difunde a través de la piel.

El pasaje de las drogas a través del estrato córneo es un proceso lento y se lleva a cabo por difusión pasiva, la cual está determinada por las leyes de Fick. Ésta establece que el flujo de moléculas a través de una membrana es directamente proporcional a la concentración de dichas moléculas a ambos lados de la membrana. En situaciones en las que existen gradientes de concentración de una sustancia, se produce un flujo de partículas que tiende a homogeneizar y uniformizar la concentración. El flujo homogeneizador es una consecuencia estadística del movimiento azaroso de las partículas. El flujo de la sangre, alrededor de 0.05 mL min^{-1} por cm^3 de piel, es muy eficiente para el retiro de las moléculas que han atravesado las capas externas de la piel. Los capilares sanguíneos llegan a 0.2 mm de la

superficie de la piel. Para la entrega transdérmica de la mayoría de las drogas, el flujo de la sangre mantiene un gradiente de concentración entre la formulación aplicada en la superficie de la piel y el sistema vascular. Es este gradiente de concentración el que proporciona la fuerza impulsora para la absorción de la droga (Barry, 1983).

Una molécula puede usar dos rutas para penetrar la piel humana normal e intacta, los apéndices cutáneos o el estrato córneo continuo. La primera comprende el transporte vía los conductos sudoríparos y los folículos pilosos con sus glándulas sebáceas asociadas. Aunque ofrezcan una alta permeabilidad se consideran de menor importancia debido a su relativamente pequeña área, aproximadamente el 0.1-1.0 % del área total de la piel. Sin embargo, pueden ser esenciales al principio después de la aplicación de la droga, y las glándulas sebáceas pueden actuar como reservorio para algunos materiales (Kielhorn y col., 2005). Esta vía, sí es significativa para iones y moléculas polares grandes que apenas penetran por el estrato córneo. La Figura 1.4 ilustra estas vías de ingreso.

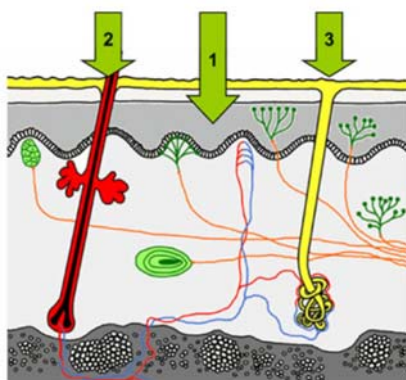


Figura 1.4: Difusión a través de: (1) la capa córnea, (2) el folículo piloso, (3) la glándula sudorípara (figura extraída de Barry, 2001).

En lo que respecta entonces a la vía epidérmica (a través del estrato córneo continuo) se han podido identificar dos posibles vías: la intercelular donde la sustancia química pasa entre los corneocitos en la región extracelular rica en lípidos, y la transcelular a través de los corneocitos donde existe un fenómeno de partición entre las dos caras de la membrana celular (Figura 1.5).

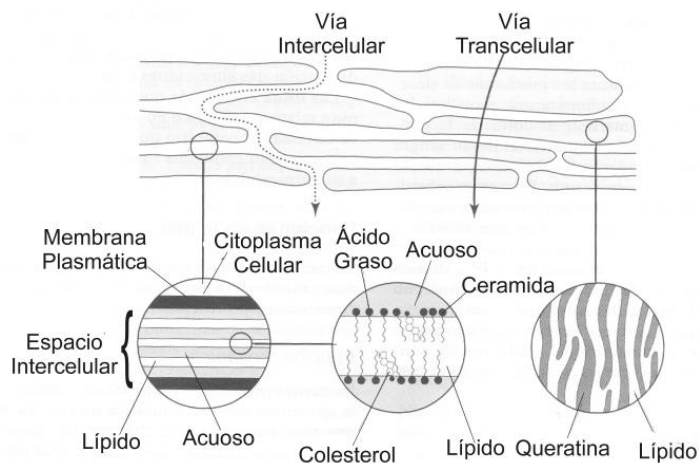


Figura 1.5: Diagrama simplificado del estrato córneo y 2 microrutas para la penetración de drogas (figura extraída de Barry, 2001).

La vía principal por la cual difunde una molécula está determinada entre otros factores, por el coeficiente de partición. Drogas hidrofílicas se reparten preferentemente en los dominios intracelulares, mientras que las lipofílicas (logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua, $\text{Log } P_{o/w} > 2$) atraviesan el estrato córneo vía la ruta intercelular. Una manera de seleccionar una droga con las propiedades fisicoquímicas adecuadas de modo que difunda a una velocidad aceptable es verificar que la misma cumpla con los siguientes requisitos (Barry, 2001):

- Peso molecular bajo, preferiblemente menos de 600 Da.
- Adecuada solubilidad en solvente orgánico y acuoso de modo de lograr un gradiente de concentración alto.
- Coeficiente de partición de la droga entre el vehículo y la membrana ($\text{Log } P_{o/w}$) entre 1-4.
- Punto de fusión bajo, aconsejable menor a 200.0 °C (la solubilidad de una droga está inversamente relacionada con el punto de fusión.)

1.3 Sistemas de liberación de drogas para terapia hormonal

Dentro de las distintas formulaciones para administración de medicamentos a través de la piel y particularmente de hormonas, las más populares son los *parches*. A finales de 1970 aparecieron los primeros Sistemas Terapéuticos de Administración Transdermal: sistemas de soporte de principios activos de acción sistémica, con liberación programada, constante y sostenida del fármaco, de manera que se podía mantener la concentración plasmática dentro del margen terapéutico durante un

tiempo prolongado. El primero en llegar al mercado en 1981 fue un parche de liberación de escopolamina.

La administración de hormonas puede ser utilizada con fines de, anticoncepción o de terapia hormonal de sustitución. La *terapia hormonal de sustitución* (TH) es utilizada para mejorar la calidad de vida de las mujeres que se encuentran transitando el período correspondiente a la menopausia y postmenopausia. La interrupción definitiva de las menstruaciones producto de la pérdida de actividad folicular del ovario define la *menopausia*. En términos estrictos se trata de un suceso puntual, y corresponde al último ciclo menstrual. Por lo tanto, *postmenopausia* concierne al período que transcurre desde el último ciclo. Los términos climaterio y menopausia aunque tienen un significado diferente son, a menudo, utilizados indistintamente. Cabe aclarar entonces que el término *climaterio* define el período de la vida de la mujer que se extiende desde 2-8 años antes de la fecha de la menopausia hasta 2-6 años después de la última menstruación. La edad de presentación de la menopausia espontánea se sitúa entre los 45 y 55 años, con una media en torno a los 50-51 años. La menopausia se considera precoz cuando aparece antes de los 40 años. Alrededor del período de la menopausia, algunas mujeres presentan síntomas que pueden resultar molestos y en ocasiones limitan la actividad cotidiana, además de la presencia de algunos problemas de salud. Los síntomas son: *vasomotores o sofocos* que se definen como una sensación subjetiva de calor que habitualmente se asocia a una vasodilatación cutánea y sudoración que se sigue de un descenso de la T corporal y aceleración transitoria de la frecuencia cardíaca. Pueden durar desde unos pocos segundos hasta varios minutos y su intensidad y frecuencia son muy variables. Cuando los sofocos tienen lugar durante la noche y son intensos pueden alterar el sueño. Las alteraciones del sueño, cefaleas y vómitos han mostrado una asociación con la presencia de síntomas vasomotores intensos. Los síntomas *vaginales* implican una reducción de la actividad de las glándulas vaginales y del grosor del epitelio vaginal. En cuanto a los problemas de salud, la *osteoporosis* caracterizada por una baja masa ósea y alteraciones de la microarquitectura del tejido óseo conllevan a una disminución de la resistencia del hueso y un incremento de la fragilidad y de la susceptibilidad de fractura. La *enfermedad cardiovascular*, el incremento de riesgo coronario está ligado sobre todo al incremento de factores de riesgo que aparecen con la edad. La hipertensión, la dislipemia, la diabetes, el sedentarismo, la obesidad y los antecedentes familiares son los factores más importantes y se potencian entre sí. De todos modos es controvertida la relación entre la enfermedad cardiovascular y la disminución de estrógenos en la menopausia.

La TH incluye distintas formas de estrógenos con o sin progestágenos, así como los progestágenos de forma aislada y la tibolona. La respuesta individual al tratamiento con hormonas es variable y las mujeres requieren diferentes dosis. Cuando los estrógenos se administran solos existe un riesgo aumentado de hiperplasia endometrial, cuando se añaden progestágenos disminuye el riesgo de hiperplasia. Las mujeres que no puedan recibir TH o prefieran otro tratamiento pueden optar por; tratamientos no hormonales, fitoestrógenos, medicamentos homeopáticos, hierbas medicinales u otras técnicas como acupuntura (Grupo de trabajo de menopausia y postmenopausia, 2004).

Existen riesgos asociados a la TH como el cáncer de mama o de endometrio. No obstante algunos autores afirman que con dosis bajas se pueden alcanzar beneficios, y a la vez disminuir los riesgos. A su vez en muchos casos, el desarrollo de algún tipo de cáncer durante o luego de la TH puede asociarse a antecedentes familiares previos o a un período prolongado de TH (Warren, 2004). Actualmente existen 3 situaciones que contraindican la TH: todos los tumores hormonodependientes, función hepática muy comprometida y antecedentes de tromboembolismo. Por consiguiente hay que individualizar el tratamiento mediante una evaluación clínica detallada por parte del médico, para descubrir los factores de riesgo y las posibles contraindicaciones y además, explicar a la paciente los beneficios y riesgos del tratamiento. Posteriormente, de forma periódica se evalúa el tratamiento pudiéndose cambiar el fármaco, la dosis, la vía o el régimen. Existen dos grandes grupos de tipos de TH. El primero de ellos es el que se realiza únicamente con estrógenos y el segundo es el que se efectúa con estrógenos y progestágenos. Cada uno de estos grupos, a su vez se subdivide en pautas continuas, en las que la paciente recibe tratamiento todos los días, y en cíclicas, en las cuales existen ciclos o días sin tratamiento. En las pacientes que reciben progestágeno además de estrógeno, aún cabe una subdivisión más, en relación a los días en los que éstas reciben el progestágeno. Así distinguimos pautas secuenciales, que se caracterizan porque el progestágeno se administra con el estrógeno sólo unos días (en general de 10 a 14), existiendo otros en los que únicamente se administran estrógenos, y pautas combinadas, en las que el progestágeno está combinado permanentemente con el estrógeno.

Los principios activos más utilizados en TH son; dentro de los *estrógenos*: estriol, estrógenos equinos conjugados y estradiol (valerato o 17 β -estradiol); *progestágenos*: progesterona y derivados de la progesterona (acetato de medroxiprogesterona) o incluso *derivados de la testosterona* (acetato de noretisterona, levonorgestrel)

La absorción transdérmica de estrógenos ocurre por un lento proceso de difusión a través de los lípidos del estrato córneo, seguido por una rápida difusión a través de la EPD viable y dermis, y luego un ingreso a la circulación.

Como se mencionó, una de las formas de administrar hormonas a través de la piel es mediante *parches*. El primer *parche transdérmico* para TH fue Estraderm® (Novartis, Suiza), el cual fue lanzado al mercado en Europa en 1985, y era un sistema tipo reservorio. En cuanto a los sistemas matriciales el primero en aparecer fue Climara® (Berlex, EEUU) en 1995. En ambos casos el sistema liberaba 17β-estradiol (Yoo y Lee, 2006).

Por lo mencionado anteriormente, el 17β-estradiol (E2) fue seleccionado como droga modelo para el desarrollo de este trabajo de tesis, debido a su uso extensivo y a la alta relevancia en la TH. El estudio de los procesos difusivos de esta droga a través de fragmentos de piel humana y a través de membranas poliméricas, pretende ser la base para el desarrollo de Sistemas de Administración Transdermal de E2.

1.4 Ensayos de absorción transdérmica *in vitro*

Es notorio que no existen lineamientos generales en las farmacopeas (por ejemplo en la Farmacopea de EEUU y la Farmacopea Británica) en relación con protocolos para ensayos de absorción transdérmica de medicamentos. Razón por la cual muchos investigadores tienen la opción de desarrollar sus propios sistemas. Sí existen guías que pueden servir como puntos de partida, pero que están relacionadas con ensayos de toxicidad por exposición cutánea a algún agente contaminante. Estas guías surgieron luego de consensos entre distintos organismos a medida que crecía la necesidad de contar con estudios sobre exposición cutánea a contaminantes ambientales, incluso esta necesidad cobró relevancia debido a la falta de información que existía en otros campos como la cosmética y farmacéutica. Algunas de estas guías provienen de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (una de las más completas porque hace un estudio detallado ya que tiene en cuenta contaminantes provenientes desde el agua, aire y tierra) (Bronaugh, 1992), de Comisiones Europeas (European Commission, 2004; OECD, 2004a), e incluso de la Organización Mundial de la Salud (Kielhorn y col., 2005).

Para los estudios de difusión en general se usan celdas (las más comunes son las celdas de Franz) de uno o dos compartimientos (Franz, 1975). En las primeras se suelen imitar mejor las condiciones de exposición a una cierta sustancia, dado que sólo cuentan con un compartimiento y encima de este la piel expuesta al ambiente.

Las celdas de dos compartimientos tienen dos cámaras, separadas por la membrana en la que se evalúa la difusión. Para este tipo de celdas tenemos dos opciones, las estáticas en las cuales se van tomando muestras en el compartimiento receptor y se determina la masa acumulada, o las continuas en las se mantiene un flujo a través del compartimiento receptor, permitiendo este reemplazo una mejor simulación de las condiciones fisiológicas (Barry, 1983). El empleo de celdas continuas ayuda a prevenir altas concentraciones de la droga debido a su acumulación, lo que puede reducir la absorción o llevar a una saturación y generar problemas de solubilidad. El muestreo manual con las celdas estáticas restringe el mismo al horario de trabajo en el laboratorio, también puede llevar a la formación de burbujas cuando se realiza la toma de muestra o se restituye el volumen. Esto último se evita en las celdas con flujo de solución receptora. En las celdas estáticas es necesaria además una agitación constante para mantener un medio homogéneo, y sólo se mantiene la T constante en el compartimiento receptor no así en el donante (Bosman, 1996).

Se puede trabajar con dos tipos de dosis, uno implica un régimen de concentración *finita* en el que la solución se aplica en un volumen suficiente para cubrir la piel y normalmente permanece no ocluida para los cuales se utilizan celdas de un compartimiento. El otro procedimiento involucra dosis *infinita* y la solución se aplica en exceso y es ocluida durante toda la duración de la experiencia para evitar evaporación. Los parámetros evaluados con dosis finita son, porcentaje absorbido y cantidad absoluta penetrada, en ambos casos por área de difusión. Para dosis infinita, flujo en estado estacionario (EE) o velocidad de penetración y coeficiente de permeabilidad (K_p) (Kielhorn y col., 2005).

La mayoría de los autores proponen que la recuperación total de masa al final de la experiencia debe ser entre 85.0 – 115.0 %, aunque algunos creen que debe ser entre 80.0 – 120.0 % para sustancias volátiles y para el resto de 90.0 – 110.0 % (van de Sandt y col., 2004).

En cuanto a la composición de la solución receptora, para compuestos solubles en agua, una solución salina es suficiente; para compuestos lipofílicos se puede adicionar albúmina sérica bovina, polietilenglicol o algún solvente orgánico, siempre y cuando este aditivo no provoque daños sobre el fragmento de piel (OCDE, 2004a).

En cuanto a la T de trabajo, la mayoría de los autores coincide en trabajar a 37.0 °C. No obstante en algunos estudios la T usada es de 32.0 °C porque a menudo se afirma que esa es la T de la piel. Sin embargo esto puede ser un error porque lo que se designa como T de la piel es la de la superficie. La T de las capas inferiores de la piel se aproxima a la del cuerpo o sea 37.0 °C. Por lo que una T de 37.0 °C en el compartimiento receptor refleja mejor la situación *in vivo* (Franz, 1993). Córdoba Díaz

y col. (2000) reportaron en su trabajo que la T de la superficie de la membrana fue mantenida en 32.5 ± 0.5 °C a lo largo del experimento cuando una T de 37.0 °C fue programada para el compartimiento receptor. Cuando se intentan hacer correlaciones *in vitro-in vivo*, trabajando *in vitro* con fragmentos de piel humana, pueden aparecer diferencias las cuales pueden adjudicarse al tiempo que se deja reposar la piel antes de iniciar el estudio, ya que esto puede repercutir en el grado de hidratación que tenga la piel al momento de entrar en contacto con la droga, diferencia en la procedencia de la piel (lugar anatómico), si *in vivo* se hizo en el brazo e *in vitro* se hizo con piel procedente del abdomen por ejemplo (Franz, 1975). Los estudios *in vitro* en general se hacen con concentraciones infinitas de droga, de modo tal que ni la droga ni ninguno de los componentes del vehículo disminuyen considerablemente durante el curso del experimento, por lo tanto se obtiene un EE. El problema de los ensayos con dosis infinitas, es que no simulan bien las situaciones reales de absorción de sustancias a través de la piel, y además grandes cantidades de la droga pueden dañar la membrana y afectar su función barrera. En los estudios con dosis finitas hay una disminución del compuesto que comienza ni bien se inicia el proceso de absorción (Franz, 1993). No obstante el flujo de soluto es proporcional al gradiente de concentración a través de la membrana. Una premisa para el flujo máximo en una situación termodinámicamente estable es que la solución donante debe estar saturada. Aunque la concentración diferencial suele considerarse una fuerza impulsora de la difusión, el gradiente del potencial químico o gradiente de actividad es en realidad el parámetro fundamental.

Como se mencionó al no existir protocolos estandarizados, muchos investigadores tienen la opción de desarrollar sus propios sistemas, lo que crea dificultades en el momento de comparar resultados obtenidos por distintos autores. No obstante, existen trabajos realizados por conjuntos de laboratorios con el fin de comparar los resultados y estudiar los factores que generan variabilidad, y que pueden servir de gran ayuda al momento de las conclusiones. La absorción *in vitro* de ácido benzoico, cafeína y testosterona fue estudiada, a través de piel humana en nueve laboratorios y en piel de rata en un laboratorio, en un trabajo multicéntrico (van de Sandt y col., 2004). Todos los laboratorios realizaron sus estudios de acuerdo con protocolos detallados: dosis, tiempo de exposición, vehículo, fluido receptor, preparación de las membranas, análisis, y cada laboratorio realizó entre 3-5 experimentos independientes para cada sustancia estudiada. El rango de absorción transdérmica de las tres drogas fue el mismo para todos los laboratorios participantes. No hubo relación entre el tipo de celda de difusión utilizada y la absorción de los compuestos, ya que algunos laboratorios utilizaron celdas estáticas y otros con flujo continuo, y además tenían distintas áreas

de difusión y volúmenes de los compartimientos. La variación observada entre los laboratorios puede ser atribuida a la variabilidad de la piel humana (sexo y edad del donante), a la fuente de la cual proviene la piel (postmortem o quirúrgica) y al sitio de extracción. Y en el caso de la testosterona (hormona de características similares al E2), el más lipofílico de los 3 compuestos, el espesor de la piel fue una variable crítica. El coeficiente de variación entre los laboratorios para el flujo máximo fue del 110.8 %, para testosterona. La variación intralaboratorio que se vio influenciada por la propia piel, estuvo en el rango 6.3-111.0%, para testosterona. Dado que las determinaciones *in vitro* de absorción a través de la piel están afectadas por la variabilidad de la piel, Chilcott y col. (2005) determinaron la variación inter e intra laboratorio causadas por otros factores distintos a la piel humana. Los 18 laboratorios participantes utilizaron para los estudios de difusión una membrana artificial de silicona, metilparabeno como sustancia difusora y un mismo protocolo. El coeficiente de variación entre los laboratorios fue aproximadamente del 35%, mientras que la variación intralaboratorio promedió el 10%.

En cuanto al origen de la piel (postmortem o procedente de una cirugía) como fuente de variabilidad, Swarbrick y col. (1982) reportaron que muestras de piel removidas postmortem luego de 72-96 hs tendían a exhibir velocidades de permeación más altas y más variables, sugiriendo posibles cambios estructurales en el estrato córneo luego de las 48 hs. Además de que la forma de almacenamiento (congelada seca o húmeda) y el tiempo de almacenamiento pueden influir también en las propiedades de la piel. En este último asunto algunos trabajos que utilizaron piel humana reportaron que el congelado no tiene efecto sobre la permeabilidad de agua. Sin embargo otros estudios han mostrado que el congelado induce incrementos significativos en la permeabilidad de la piel tanto hacia compuestos lipofílicos como hidrofílicos, particularmente para largos tiempos de almacenamiento. La divergencia entre estos resultados deja en evidencia una vez más la variabilidad en los diseños experimentales. Ahlstrom y col. (2007) aclaran que el congelado de muestras de piel a una T de -20.0 °C incrementa la permeación de hidrocortisona *in vitro* y la extensión del incremento aumenta con el tiempo de almacenamiento. No obstante la forma de los perfiles no se altera, lo que sugiere que la piel continua comportándose como una membrana limitante al paso de las sustancias cumpliendo con su función barrera.

En cuanto a la obtención de EPD, la bibliografía describe diversos métodos tanto para el tratamiento de piel humana como animal. La dermatomización de la piel permite justamente, obtener piel exenta de dermis idónea para estudios *in vitro*. Este proceso puede realizarse con un dermatóomo, el cual permite obtener piel de un determinado grosor, o a través de tratamiento con: agua a 60.0 °C durante 1.0 o 2.0 minutos (Scott

y col., 1987; Cross y col., 2003), con una solución de tripsina 0,1 % p v⁻¹ a 60.0 °C durante 2.0 minutos (Rana y col., 2005) o con solución de bromuro de sodio 2 M 24 hs a T ambiente (Scott y col., 1986). Nuevamente hay discrepancias en cual método es mejor y cual produce menos daño a la piel, y en como deben almacenarse los fragmentos de EPD y durante cuanto tiempo hasta que dejan de ser viables.

En cuanto a modelos animales propuestos cuando no es posible trabajar con piel humana, la piel de cerdo puede usarse como modelo de experimentación por tratarse de la especie animal cuya piel presenta mayor analogía con la humana, lo que llevaría a poder extrapolar después los resultados al hombre. Esto puede verse en un trabajo de Schmook y col. (2001) en el cual utilizaron piel de cerdo y humana, y los flujos e incluso las concentraciones en la piel fueron del mismo orden de magnitud para ambos tejidos.

Lo mencionado corresponde a estudios de absorción realizados en celdas de difusión. Como se indicó, no hay disponibles en las farmacopeas protocolos para este tipo de experimentos mientras que, sí se encuentran monografías para estudios de liberación desde formulaciones transdérmicas (*parches*). Exponiéndose en dichas monografías los dispositivos que se deben utilizar, volúmenes y medios, T y velocidades de agitación y demás requerimientos. Pero sólo se evalúa la liberación no la absorción. Mientras que para absorción se utilizan celdas de difusión, para liberación se utilizan Equipos para Ensayos de Disolución. Dichos equipos, permiten establecer la velocidad y la T del baño requeridas, incluso visualizar sus valores junto con el tiempo transcurrido del ensayo. La precisión en el control de la velocidad y la T excede las especificaciones de la Farmacopea de EEUU. Los vasos utilizados y las paletas son de fácil colocación y además se incluyen los topes de altura para las paletas. Posee también un kit de sondas de muestreo manual a las que se adosan las sondas de T que permiten monitorear la T individual de cada vaso. Como puede observarse todas las ventajas que presentan este tipo de equipamientos junto con los requerimientos especificados en la Farmacopea de EEUU permiten diseñar o poner a punto una metodología según las necesidades del investigador, basándose en protocolos reconocidos.

2. QUITINA - QUITOSAN

La *quitina* (Figura 1.6) fue aislada por primera vez en 1811 por el químico francés Henri Braconnot cuando estudiaba las sustancias derivadas del *Agaricus volvaceus* y otros hongos, y nombrada como “fungina”. Posteriormente en 1823 Odier reportó que

había encontrado un complejo insoluble aislado de escarabajos, al cual denominó “quitina”, un vocablo que proviene del griego y que significa cubierta o envoltura (Lárez Velásquez, 2003).

En la actualidad sabemos que la quitina es un polisacárido que forma parte del exoesqueleto de crustáceos e insectos, y también se encuentra en algunos hongos. Después de la celulosa (Figura 1.6), es el segundo polímero más abundante en el planeta. Es un polisacárido, compuesto de unidades de acetilglucosamina (exactamente, N-acetil-D-glucos-2-amina). Éstas están unidas entre sí con enlaces β -1,4, de la misma forma que las unidades de glucosa componen la celulosa. Así, puede pensarse en la quitina como en celulosa con el grupo oxhidrilo de cada monómero reemplazado por un grupo de acetilamina (Ravi Kumar, 2000; Veiga Ochoa y Ruiz Caro, 2004).

La fuente natural de obtención de la quitina es la cubierta de los crustáceos, donde se encuentra estrechamente vinculada con sales inorgánicas, proteínas y lípidos. Los primeros pasos en la purificación de la quitina involucran la separación y el aislamiento de estos materiales, usualmente por extracciones sucesivas. Comprende 3 operaciones básicas: Desproteización (separación de la proteína), Desmineralización (eliminación de la materia inorgánica) y Decoloración (separación de los pigmentos lipídicos). Por lo general los métodos de obtención afectan la calidad de la quitina haciendo necesario pasos adicionales de purificación (del Río Armas, 2002).

La quitina se clasifica generalmente de dos formas dependiendo de su estructura cristalina: α - y β -quitina. La forma más abundante y de fácil accesibilidad es la α -quitina (Kurita, 2006).

En cuanto al *quitosan* (QUI) (Figura 1.6) su historia comienza en 1859 cuando el profesor Rouget observó que tratando quitina con hidróxido de sodio, obtenía un producto al que denominó “quitina modificada” y que era soluble en ácidos orgánicos. Más tarde en 1894, Hoppe-Seyler designó a este producto “quitosan” (Lárez Velásquez, 2003).

El QUI es entonces un polisacárido natural, biodegradable, biocompatible, no tóxico y un excelente formador de películas (filmógeno). Su campo de aplicación se extiende desde su uso en el tratamiento de aguas residuales hasta la producción de productos especiales en la medicina. Así pues, el QUI es un copolímero de N-acetilglucosaminas y glucosaminas. Bajo el epígrafe QUI se incluye una serie de polímeros de diferentes pesos moleculares (50 KDa a 2000 KDa) y grado de desacetilación (GD) (70-98 %). Entre los usos farmacéuticos más comunes se pueden citar su acción aglutinante, disgregante, como polímero de recubrimiento, excipiente capaz de proporcionar

liberación controlada de fármacos, antimicrobiano y cicatrizante de heridas (Ravi Kumar, 2000; Veiga Ochoa y Ruiz Caro, 2004).

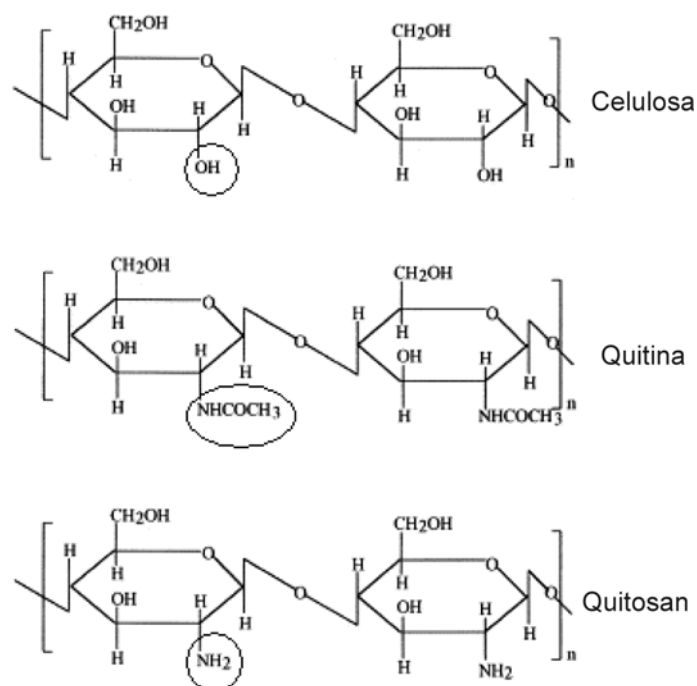


Figura 1.6: Estructura de la celulosa, la quitina y el QUI (figura extraída de Ravi Kumar, 2000).

La obtención de QUI a partir de quitina es a través de un proceso de des-N-acetilación parcial alcalina. La reacción de desacetilación (Figura 1.7) es la pérdida del grupo acetilo del grupo amida del carbono 2, dando lugar a un grupo amino en esa posición. La desacetilación completa de la quitina produce un material totalmente soluble en medio ácido conocido como quitano; sin embargo, cuando la desacetilación es incompleta se crea una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades 2-acetoamida-2-deoxi- β -D-glucosa y 2-amida-2-deoxi- β -D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -1,4. La relación de estas unidades depende de las condiciones de reacción y genera materiales con distintas propiedades (Lárez Velásquez, 2003).

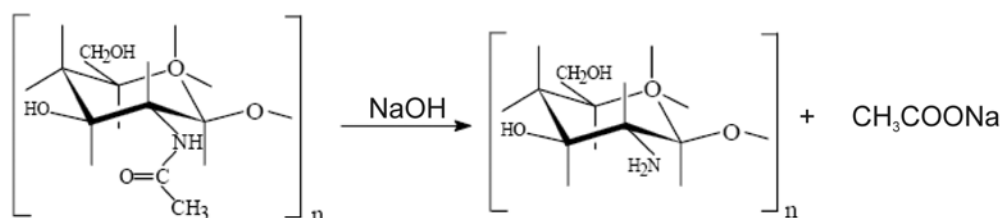


Figura 1.7: Reacción por la cual se obtiene QUI a partir de la desacetilación de la quitina (figura extraída de Ravi Kumar, 2000).

La desacetilación puede realizarse mediante procesos químicos o enzimáticos. El proceso químico puede llevarse a cabo de dos formas, homogénea o heterogénea. La desacetilación homogénea ocurre a T cercanas a la del ambiente durante periodos largos de tiempo. Esto permite que la reacción no se localice en determinados lugares de la cadena y por lo tanto que el ataque a los grupos amida sea más uniforme. La desacetilación heterogénea se lleva a cabo en soluciones acuosas concentradas de bases (NaOH, KOH, 50 % p v⁻¹) bajo condiciones severas (100.0 – 160.0 °C). Estas condiciones hacen que pueda ocurrir una reducción en la longitud de la cadena, por lo que es conveniente repetir varias veces el tratamiento alcalino durante periodos cortos de tiempo y aislar el producto en cada etapa. En cuanto al método enzimático, es la quitina desacetilasa la enzima que cataliza la conversión de quitina en QUI. Desde el punto de vista químico, los procesos para obtener QUI son relativamente sencillos, aunque el tratamiento con álcali concentrado y T relativamente altas implica ciertos riesgos para los operadores y para el ambiente. En lo que respecta al método enzimático la principal ventaja frente al químico es la obtención de un material uniforme en sus propiedades físicas y químicas, y su limitación es que la enzima no es muy efectiva (Vílchez Maldonado, 2005; Lárez Velásquez, 2006).

La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho del QUI un material muy versátil, por la posibilidad de realizar reacciones de anclaje de enzimas, obtención de películas entrecruzadas, una amplia variedad de reacciones químicas (alquilación, formación de sales cuaternarias, sulfatación, tiosilación, etc.). El material obtenido posee propiedades adecuadas para aplicaciones inmediatas y futuras en biotecnología, biomedicina y agricultura.

2.1 Características fisicoquímicas del quitosan

Los principales parámetros que determinan las características del QUI son su peso molecular y el grado de acetilación.

El peso molecular representa una media de los pesos de las moléculas presentes en la muestra. Algunos de los métodos utilizados para determinar el peso molecular son viscosimetría, dispersión de luz y cromatografía de permeación en gel. La viscosimetría es el método más utilizado. El grado de acetilación se define como el contenido en residuos de N-Acetilglucosamina (GlcNAc) presentes en la cadena polimérica. Existen numerosos métodos para determinar el grado de N-acetilación del QUI. Entre estas técnicas podemos citar las espectroscopias de infrarrojo (IR), de ultravioleta (UV), de resonancia magnética nuclear (RMN), la potenciometría y la

conductimetría. De todos los métodos el más utilizado es la espectroscopia de IR por su simplicidad. El grado de acetilación también puede encontrarse como GD. Estos parámetros son determinados por las condiciones de preparación durante la obtención del QUI. Sin embargo luego pueden modificarse, por ejemplo, el GD puede disminuir por reacetilación y el peso molecular puede disminuir por depolimerización ácida (Lárez Velásquez, 2003; Vílchez Maldonado, 2005).

Debido a su alto peso molecular y a su estructura lineal no ramificada, el QUI es un potente agente viscosizante en medio ácido y se comporta como un material pseudo plástico, con viscosidad dependiente de la agitación. Además la viscosidad de las soluciones de QUI aumenta al aumentar la concentración de éste, mientras que disminuye al elevar la T y el GD. En cierta manera un factor que limita la aplicación del QUI puede ser su alto peso molecular y por lo tanto su alta viscosidad, que dificulta la manipulación de las soluciones de QUI cuando estas se preparan a altas concentraciones (superiores al 3% p v⁻¹). El peso molecular también influye sobre las propiedades físicas de las membranas. Por ejemplo la cristalinidad en la membrana aumenta con el peso molecular, debido a un mayor “enredo” que resulta del uso de un QUI de peso molecular alto, aunque también puede deberse a la pequeña distancia intermolecular por trabajar con soluciones concentradas, lo que facilita las interacciones intermoleculares. De esta manera las estructuras que se forman son mas ordenadas llevando a mayores cristalinidades (Chen y Hwa, 1996).

Por otro lado, los productos obtenidos de la depolimerización del QUI, esto es moléculas de bajo peso molecular (del inglés, *low molecular weight chitosan*) y los oligómeros de QUI, solucionan el inconveniente de la alta viscosidad de la soluciones y tienen también muchas aplicaciones. Con un peso molecular de 5 a 10 kDa, presentan actividad bactericida, fungicida, y efectos hipolipidémicos e hipocolesterolémicos, entre otros usos (Vishu Kumar y col., 2004).

La presencia de grupos aminos permite la disolución del QUI en soluciones acuosas de ácidos (ácido fórmico, acético, cítrico, láctico, clorhídrico, sulfúrico), por medio de la protonación de esos grupos. Al adquirir carga positiva el grupo amino, el QUI aumenta su capacidad hidrofílica. Debido a que el pKa del grupo amino en el QUI es 6.5, el polímero estará cargado positivamente en soluciones ácidas diluidas, actuando como un polication por lo que podrá formar complejos electroestáticos con especies cargadas negativamente tales como proteínas, polielectrolitos aniónicos, aniones de bajo peso molecular y drogas (Neto y col., 2005; Kurita, 2006). Como se mencionó anteriormente, existen varios parámetros que pueden afectar las propiedades de las membranas de QUI, incluso el tipo de disolvente utilizado. Acerca de este parámetro, aunque son muchos los ácidos orgánicos e inorgánicos que son solventes del QUI, las

soluciones acuosas diluidas de ácido acético son las más comunes porque son “buenas y suaves” solventes, en las cuales las moléculas de QUI sufren un menor proceso de degradación. Esto se debe a las diferentes configuraciones espaciales de las cadenas poliméricas producto de las interacciones del polisacárido con el ácido en solución (Yamamoto y col., 1997). Asimismo, los porcentajes de absorción de agua y de disolución de la membrana (en medios ácidos o neutros) aumentan a medida que la molécula del ácido, usado para disolver el polímero, tiene más grupos oxhidrilos y carboxilos y menos grupos alquilo (Ritthidej y col., 2002).

2.2 Aplicaciones del quitosan

Dada la versatilidad del QUI y sus derivados, la aplicación de estos materiales es muy amplia e incluye áreas tales como, química analítica, biomedicina, cosméticos, agricultura, ganadería, tratamientos de aguas, industria del papel, textil y alimentaria.

En cuanto a su aplicación en química analítica las membranas de QUI pueden utilizarse en procesos de filtración para la retención de compuestos orgánicos, colorantes como azul de metileno y proteínas tales como hemoglobina y albúmina sérica bovina (Mello y col., 2006), desarrollo de biosensores enzimáticos (Wu y col., 2007), sistemas para la absorción de metales (Webster y col., 2007).

Entre los usos médicos y farmacéuticos podemos mencionar la confección de hilos de sutura que no precisan ser retirados, productos de la depolimerización del QUI utilizados como potentes inhibidores de la angiogénesis en tumores (Harish Prashanth y Tharanathan, 2005), actividad antimicrobiana de QUI y complejos QUI-metales contra bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y hongos como *Candida albicans* y *C. parapsilosis* (Wang y col., 2005), diseño de bandas adhesivas para prevenir infecciones sistémicas en heridas contaminadas (Burkatovskaya y col., 2006), sistemas para la liberación controlada de fármacos (Tacharodi y Panduranga Rao, 1995; Berger y col., 2004; Thein-Han y Stevens, 2004; Dhanikula y Panchagnula, 2004). Una aplicación prometedora es el uso de complejos del biopolímero para la introducción de material genético en el interior de células (Jiang y col., 2007), también se ha utilizado para el tratamiento de quemaduras (Alemdaroglu y col., 2006), y para simulación de piel humana y animal en estudios de permeabilidad de drogas (Dureja y col., 2001; Rana y col., 2004 y 2005).

De acuerdo a propiedades particulares del biopolímero en cuanto a tratamiento de afecciones de la piel y las mucosas, y a su capacidad hidratante, lo cual disminuye la

pérdida transepidérmica de agua, éste es incorporado en distintas formulaciones cosméticas, cremas protectoras para las manos con efecto restaurador y antioxidante, cremas para el cuerpo, gel antiacné, lápiz labial, crema para después del bronceado con el fin de reducir los efectos secundarios luego de una exposición al sol (Kim y col., 2006).

Por su actividad antimicrobiana, cicatrizante y hemostática, también tiene aplicaciones en medicina veterinaria (Senel y McClure, 2004). Se ha reportado que patógenos tanto del suelo como de los cultivos pueden ser controlados por aplicaciones de QUI pre o postcosecha, no sólo por la actividad antimicrobiana del polímero sino además porque éste activa varios mecanismos de defensa, induciendo y/o inhibiendo diferentes actividades bioquímicas durante la interacción planta-patógeno (Bautista-Baños y col., 2006); por otro lado dentro de lo que es el uso en agricultura, la aplicación de QUI permitiría a los cultivos un mayor rendimiento en la utilización del agua ya que ejercería una eficaz acción antitranspirante (Bittelli y col., 2001).

También se evaluó con éxito la factibilidad del QUI en los procesos de coagulación para el pretratamiento de aguas residuales de industrias lácteas para la eliminación de proteínas y grasas, y de esa manera reducir la carga de la unidad de biotratamiento (Chi y Cheng, 2006); para la absorción y recuperación de metales pesados de efluentes acuosos y de esa manera disminuir la contaminación de medios naturales (Rhazi y col., 2002)

En la industria textil se ha estudiado el uso de QUI en los baños de tinción de tejidos de algodón, observando que el polisacárido incrementa la intensidad y la fuerza característica del color (Gupta y Haile, 2007).

En la industria alimentaria se observó que cubiertas comestibles de QUI pueden ser una alternativa para prevenir el deterioro y conservar la calidad de alimentos aumentando la vida útil (Sathivel y col., 2007), también se evalúa el uso del polímero en la confección de sistemas QUI-vitaminas para la suplementación de comida humana. El agregado de QUI a la dieta podría tener incluso efectos hipolipidémicos e hipocolesterolémicos.

2.3 Propiedades funcionales del quitosan

Se sabe que el QUI es no antigénico, biocompatible, permitiendo su uso en varias aplicaciones médicas y, además, como es metabolizado por enzimas humanas se lo considera biodegradable. Dentro de sus propiedades funcionales este biopolímero

puede formar membranas, tiene capacidad de gelación, como así también de adsorción de metales, adhesión de células y proteínas.

En algunas aplicaciones médicas y farmacéuticas el QUI es utilizado como componente de hidrogeles. Por hidrogel se entiende “una red macromolecular hinchada con agua o fluido biológico” (Berger y col., 2004). Para el caso particular del QUI los hidrogeles se clasifican en químicos (formados por uniones covalentes irreversibles) y físicos (formados por varias uniones reversibles, como las interacciones iónicas).

En los hidrogeles de QUI unidos covalentemente, los agentes de entrecruzamiento (EC) más comunes son los dialdehídos tales como glioxal y el glutaraldehído. Dentro de las aplicaciones médicas de estos tipos de geles encontramos sistemas para liberación de drogas (riboflavina, rifampicina) y soportes para cultivos de células (soporte para adhesión de hepatocitos). La biocompatibilidad de estos hidrogeles no ha sido asegurada debido a que pueden permanecer moléculas de agentes de EC libres, las cuales serían potencialmente tóxicas y por lo tanto la administración de estos sistemas en humanos podría resultar problemática. Para poder superar este inconveniente y evitar los pasos de purificación y verificación antes del uso, se pueden preparar hidrogeles mediante uniones iónicas reversibles.

Dado que el QUI es un polímero policationico, las reacciones con compuestos cargados negativamente, iones o moléculas, pueden permitir la formación de redes entre cadenas de polímeros por uniones iónicas. Las redes de QUI ligadas iónicamente (pueden ocurrir otro tipo de interacciones adicionales como hidrofóbicas o puentes de hidrogeno intercatenarios) pueden ser clasificadas en dos grupos según el tipo de entrecruzador utilizado, aniones o moléculas aniónicas. Entre los agentes de EC más usados están Mo (IV) o Pt (II) (iónicos) y tripolifosfato o β -glicerolfosfato (moléculas iónicas), o incluso otro polímeros (poliacrilato de sodio).

La densidad de EC es el principal parámetro que influye en las propiedades (dureza mecánica, hinchamiento y liberación de drogas) de hidrogeles unidos iónicamente. Por lo tanto es necesario determinar las condiciones de reacción que influyen en la densidad de EC. La reacción es principalmente afectada por el tamaño del agente de EC y la carga global del QUI y del agente. A menor tamaño molecular del agente, la reacción es más rápida. Con respecto a las cargas, la densidad de carga del ión depende del número de oxidación y es independiente del pH, mientras que para las moléculas iónicas la densidad de carga depende de su pKa y éste a su vez del pH de la solución de reacción. La densidad de cargas del QUI y del agente de EC debe ser suficientemente alta como para permitir las interacciones y la formación de la red. Es importante pensar en el uso de agentes que permitan tener alta densidad de cargas,

asegurando una alta densidad de EC, tal como el tripolifosfato. Además el uso de este agente, implica la liberación de grupos oxhidrilos permitiendo monitorear el proceso mediante mediciones de pH (Berger y col., 2004). Los hidrogeles de QUI unidos iónicamente se pueden hinchar tanto en medio ácido, neutro o básico.

En relación con este trabajo de tesis, la formación de membranas es la propiedad funcional que interesa.

Como se ha mencionado, el QUI tiene la capacidad de formar membranas con buenas propiedades mecánicas y de permeabilidad; esta posibilidad de preparar membranas fue uno de los primeros campos de aplicación estudiados de este biopolímero.

Las membranas de QUI pueden prepararse por secado a T ambiente durante 24-48 horas luego de verter la solución del polímero en un recipiente, generalmente una placa de petri, bien nivelada para que la película sea uniforme. Otra forma de preparar las membranas es por secado en horno, o por exposición del material a radiación electromagnética infrarroja, lo cual reduce el tiempo necesario para la evaporación del solvente.

Las películas secadas a T ambiente contienen pequeñas cantidades de ácido acético ligado por uniones salinas a los grupos aminos del QUI de modo que esta forma del polímero se llama forma salina (S-form, del inglés *salt form*). Para remover el ácido acético y convertir el QUI en la forma insoluble (B-form, del inglés *polybase form*), pueden tratarse las membranas con una solución de NaOH (Vikhoreva y col., 2002) o como se mencionó, con algún otro agente de EC que tenga carga negativa neta.

El tratamiento térmico de los films conteniendo el polímero en la S-form puede ser un método alternativo para alterar la estructura, disminuir la solubilidad y aumentar la resistencia de las membranas. Varios procesos toman lugar durante el tratamiento térmico incluyendo amidación, degradación y EC del polímero (Zotkin y col., 2004). Otros trabajos han sido reportados en la bibliografía sobre tratamientos térmicos con calor seco o húmedo, y cómo éstos afectan propiedades físicas de las membranas, capacidad de absorción de agua y la permeabilidad (Lim y Wan, 1995; Nogales y col., 1997; Srinivasa y col., 2004). En un trabajo realizado por Retuert y col. (2000), se estudiaron los efectos de tratamientos térmicos sobre la microdureza en membranas de QUI. Utilizaron dos tipos de QUI, de diferentes pesos moleculares pero con similar GD. Encontraron que la dureza de las membranas preparadas con ambos tipos de QUI fue similar, lo que sugiere que esta propiedad no depende del peso molecular en un amplio rango; mientras que si depende del GD el cual también determina la estabilidad térmica y las propiedades mecánicas. Los valores de microdureza aumentaron notablemente (Figura 1.8) con un calentamiento moderado (60.0 °C) alcanzando valores constantes de aproximadamente 450 mPa tras 60 minutos a esa

T. Esto se atribuyó a la pérdida de agua y a la formación de nuevos enlaces intermoleculares que consolidan una red más compacta. El QUI, contiene grupos oxhidrilos, aminos y amidas que pueden promover interacciones intermoleculares, a través de puentes de hidrogeno, las cuales son interacciones reversibles. El aumento de la dureza estuvo acompañado por un aumento en la fragilidad de las membranas.

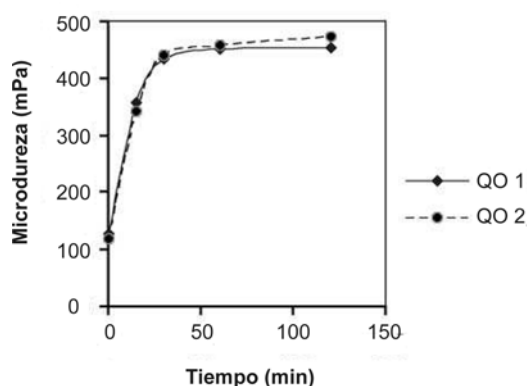


Figura 1.8: Variación en la microdureza con el tratamiento térmico (60.0 °C) para membranas de QUI con alto peso molecular (QO₁) y bajo peso molecular (QO₂) (figura extraída de Retuert y col., 2000).

Como puede observarse en la Figura 1.8 existe un importante incremento en la microdureza durante los primeros 15 minutos. Luego la microdureza se incrementa pero gradualmente después de 30 minutos de tratamiento térmico y luego permanece prácticamente constante, alcanzando valores mayores a 450 mPa.

Por lo tanto, las propiedades de las membranas de QUI pueden modificarse mediante tratamientos térmicos o tratamientos con soluciones de aniones o moléculas iónicas (EC iónico).

2.3.1 Utilidad de las membranas de quitosan

Son varios los estudios de difusión/liberación realizados con membranas sintéticas, no sólo de QUI sino de otros polímeros, dado que se presentan como una alternativa prometedora para reemplazar, en estudios de difusión *in vitro*, la manipulación de fragmentos de piel humana o animal. Además se estudia su empleo en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de drogas; por ejemplo la irritación de la piel, un problema común en la aplicación de sistemas de administración transdermal puede ser minimizado cuando el QUI es usado como membrana de contacto en la fabricación de estos sistemas. A continuación a modo de ejemplo, se hace una revisión de algunos de los trabajos reportados.

Tacharodi y Panduranga Rao (1995) diseñaron sistemas de liberación transdermal de propanolol-HCl controlados por membrana, utilizando membranas de QUI con distintas densidades de EC covalente como membrana que controla la liberación de la droga y un gel de QUI como reservorio de la droga. La velocidad de liberación dependió en forma inversa con la densidad de EC. La cantidad de droga liberada también dependió del área de liberación del dispositivo, para dispositivos con membranas de igual densidad de EC, la liberación fue mayor a mayor área.

Thein-Han y Stevens (2004), trabajaron con un sistema similar conformado por una membrana de QUI que controló la velocidad de liberación de la droga (EC iónico) y un gel de QUI que contenía droga actuando como reservorio.

El QUI también ha sido utilizado en el desarrollo de sistemas de liberación de medicamentos antineoplásicos tales como 5-fluorouracilo y paclitaxel. De esta manera, luego de la remoción quirúrgica del tumor, estos dispositivos podrían implantarse en el mismo sitio donde estaba el tumor de modo de lograr una respuesta localizada y eficaz. Esta posibilidad de respuesta localizada permitiría el tratamiento por ejemplo de gliomas malignos, ya que los agentes terapéuticos no pueden atravesar la barrera hematoencefálica luego de la administración. En este sentido matrices de QUI para liberación de paclitaxel han sido desarrolladas y caracterizadas con éxito (Dhanikula y Panchagnula, 2004). Incluso varios antibióticos (rifampicina, tetraciclina) han sido evaluados como potenciales principios activos para ser incorporados en sistemas de liberación a base de QUI (Berger y col., 2004; Bella Cruz y col. 2008).

De esta manera puede apreciarse cómo medicamentos que incluyen analgésicos, agentes para tratamiento de hipertensión, antibióticos, drogas para quimioterapia de cáncer, e incluso antiinflamatorios entre otros, ya han sido ensayados con éxito en su incorporación a un sistema de liberación controlada preparado con QUI. Además el creciente interés que despierta el ensayo con otros medicamentos y la optimización de estos dispositivos de modo de lograr una respuesta que permita una rápida recuperación del paciente, como así también un mejor pronóstico de supervivencia en pacientes con cáncer.

En el caso particular de los sistemas de administración transdermal, su desarrollo requiere de datos obtenidos de estudios de permeación *in vitro*. Estos estudios requieren el uso de pieles humanas o animales. La escasa disponibilidad de fragmentos de pieles y las restricciones éticas y legales hacen evidente la necesidad de buscar sustitutos. Las membranas artificiales poseen ciertas ventajas sobre las membranas biológicas debido al control en la composición, facilidad de preparación y reproducibilidad de los resultados. Por lo tanto, tales membranas tienen un gran potencial para ser sustitutas de las pieles animales o humanas. Membranas de

carbosil (Feldstein y col. 1998; Iordanskii y col., 2000) y QUI han sido preparadas para tal fin. A continuación se detallan los trabajos reportados con membranas de QUI.

Dureja y col., (2001) prepararon membranas de QUI utilizando tripolifosfato de sodio (TPP) como agente de EC. En estudios preliminares observaron que la T de secado, la concentración de QUI, la concentración de TPP y el tiempo de EC, afectaban las propiedades de las membranas. Sin embargo estos autores utilizaron una T de secado de 60.0 °C, ya que T mayores producían membranas poco uniformes y realizaron un diseño estadístico con las otras 3 variables restantes, utilizando diclofenac de sodio en los ensayos de permeación y compararon las membranas con piel de rata. Finalmente lograron que una de las membranas de QUI simulara el flujo de diclofenac obtenido a través de piel de rata.

Rana y col. (2004 y 2005), publicaron dos trabajos relacionados con el diseño y optimización de membranas de QUI. En ambos estudiaron las variables implicadas en la formulación para identificar aquellas que resultaban significativas sobre el flujo de las drogas indometacina y 5-fluorouracilo. Las variables fueron: concentración de QUI, concentración de agente de EC, tiempo de EC, tiempo de secado de las membranas a 45.0 °C y concentración de la solución de ácido acético utilizada para disolver el polímero. La diferencia entre ambos trabajos publicados fue el agente de EC utilizado, TPP en uno y citrato de sodio en otro. Además, en el trabajo realizado con citrato la reacción de EC se realizó con soluciones de citrato ajustando el pH a 5 y sin ajustar. El método estadístico utilizado por estos autores en ambos trabajos fue un diseño Plackett-Burman. Encontraron que la concentración de QUI, concentración de ambos agentes de EC y el tiempo de EC fueron significativas, y realizaron luego con dichas variables un diseño estadístico de optimización con el fin de elaborar membranas que simulen piel humana y animal (rata y conejo).

De esta manera puede observarse como la manipulación controlada de ciertas variables de formulación puede llevar al diseño de una membrana con una dada composición, de modo de lograr con ella el mismo flujo que se obtuvo con un fragmento de piel humana o animal.

3. HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS

El objetivo de la experimentación en investigación es obtener *información de calidad*, la cual permitirá llegar a comprender mejor un sistema y tomar decisiones sobre como optimizarlo o manipularlo. Entonces la experimentación debe ser planificada (diseñada) cuidadosamente para que brinde la información buscada. Tanto por la

importancia de las decisiones que se puedan tomar sobre la base de los resultados experimentales obtenidos y analizados, como por el costo de la experimentación (elevado en la mayoría de los casos), es razonable utilizar una metodología matemática y estadística que indique como planificar la secuencia de experimentos. Dicha planificación y análisis es el principal objetivo del Diseño Estadístico de Experimentos.

3.1 Diseño y análisis de experimentos

La *quimiometría* fue una subdisciplina de la química durante 30 años, y fue evolucionando junto con la instrumentación, los procesos y métodos matemáticos y químicos, para convertirse en una disciplina por sí misma (Hopke, 2003). Según Massart y col. (1997) la *quimiometría* utiliza métodos matemáticos, estadísticos y otros basados en la lógica, para resolver problemas en el campo de la química. La *quimiometría* se puede dividir en 3 áreas generales:

- Optimización de los procedimientos experimentales y mediciones químicas.
- Calibración, validación y significancia de las mediciones analíticas.
- Proveer la mayor cantidad de información a partir del análisis de los datos.

La manera más eficiente de mejorar el valor de la investigación y disminuir el tiempo de experimentación, es realizar un proceso de optimización a través de la utilización de un diseño experimental.

Se puede optimizar un problema analítico, un instrumento analítico, un proceso y esa optimización se realiza mediante el estudio de un número limitado de factores. Un *factor* es cualquier aspecto de las condiciones experimentales que influye en el resultado obtenido en un experimento. Los factores pueden ser *cualitativos* cuando sus posibles valores no se pueden ordenar numéricamente (se conocen comúnmente como factores categóricos), o *cuantitativos* cuando los valores posibles se pueden ordenar numéricamente. Se entiende por *niveles de un factor* a los diferentes valores que dicho factor toma. El *efecto de un factor* se define como el cambio en la respuesta producido por un cambio en el nivel del factor.

Así que, si se quiere que las conclusiones extraídas de un experimento sean correctas, hay que identificar los diferentes factores que influyen en el resultado y, si es posible, controlarlos. Una respuesta puede estar influenciada por una amplia variedad de factores, por esto es que se realiza el *screening* en las etapas iniciales del diseño experimental, cuyo objetivo no es obtener datos exactos y hacer una completa

descripción del sistema sino más bien estudiar la importancia de ciertas variables en el fenómeno estudiado. De esta manera se conocerán aquellos factores *activos*, los cuales producen una variación significativa en la respuesta medida, y aquellos factores *no activos*, los cuales pueden ser modificados dentro de ciertos niveles sin que esto genere consecuencias importantes en la variable respuesta. Por lo tanto, estos factores serán indicadores en cierta manera de la flexibilidad del sistema en estudio. Este estudio preliminar permitirá en la etapa de optimización, hacer un uso más efectivo de los recursos disponibles, distribuyendo mejor el tiempo, el esfuerzo y sobretodo el capital.

3.1.1 Diseño Experimental

Un *experimento* es un procedimiento (prueba o ensayo) mediante el cual se trata de comprobar una o varias hipótesis relacionadas con un fenómeno determinado, mediante la manipulación de las variables que probablemente son su causa. Un *experimento diseñado* es una prueba o serie de pruebas donde se inducen cambios deliberados en las variables de entrada del sistema, de manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios en la respuesta de salida (Montgomery, 1991).

Entre los objetivos del experimento pueden incluirse:

- Determinar que variables tienen mayor influencia sobre una respuesta.
- Determinar el mejor valor de las variables que influyen en la respuesta, de modo que:
 - a) La respuesta tenga un valor cercano al deseado
 - b) La variabilidad de la respuesta sea pequeña
 - c) Se minimicen los efectos de las variables

El *diseño estadístico de experimentos* es el proceso de planear un experimento para obtener datos apropiados, que pueden analizarse mediante métodos estadísticos, con el fin de producir conclusiones válidas y objetivas.

La metodología estadística es el único enfoque objetivo para analizar un problema que involucra datos sujetos a errores experimentales. Por lo tanto, hay 2 aspectos en cualquier problema experimental: *el diseño del experimento* y *el análisis estadístico de los datos*.

Algunos de los principios del diseño de experimentos son la *obtención de réplicas*, que se refiere a una repetición del experimento básico lo que permitirá al experimentador obtener una estimación del error experimental (útil para determinar si

las diferencias observadas en los datos son estadísticamente significativas) y además calcular una estimación más precisa del efecto de un factor. La *aleatorización*, se entiende como el hecho de que tanto la asignación del material experimental, como el orden en el que se realicen las pruebas individuales o ensayos, se determinan en forma aleatoria.

Al momento de diseñar un experimento, el investigador debe decidir que se va a estudiar y cómo se van a recopilar y analizar los datos. Así los experimentos pueden ser planificados de modo tal de obtener la mayor información posible con el menor número de experiencias. Por lo tanto debe seleccionar la variable respuesta o función objetivo. La respuesta seleccionada debe proveer información acerca del proceso en estudio. A veces, sólo se necesita una respuesta individual aunque en algunos casos la función objetivo puede estar compuesta por múltiples respuestas. Para la elección de los factores y sus niveles es necesario conocer el proceso completo, tal conocimiento suele ser una combinación de experiencia práctica y comprensión teórica. Para analizar los datos experimentales se deben emplear métodos estadísticos, de modo que los resultados y conclusiones sean objetivos, más que apreciativos. Los métodos estadísticos hacen posible asignar un nivel de confiabilidad a los resultados. La principal ventaja de estos métodos es que agregan objetividad al proceso de toma de decisiones. Las técnicas estadísticas, acopladas a un buen conocimiento del proceso y al sentido común, suelen llevar a conclusiones razonables. No obstante la estadística no puede sustituir el hecho de reflexionar sobre el problema. Existen programas de computación para el análisis de los datos y métodos gráficos para su interpretación.

Los resultados además pueden ser descriptos como una función basada en las variables experimentales de la forma $y=f(x)$, donde $f(x)$ es aproximada a una función polinomial que describe la relación entre las variables experimentales y la respuesta dentro del dominio experimental. Algunos de los modelos son:

- *Modelos lineales*: son los más simples y describen una relación lineal entre las variables experimentales y la respuesta, por ejemplo un modelo lineal para dos variables se presenta como $y=b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + residual$
- *Modelos polinomiales*: contienen términos que describen además la interacción de las variables experimentales entre sí. Un modelo de interacción de segundo orden se expresa como $y= b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + residual$
- *Modelos cuadráticos*: en las situaciones donde sea necesario determinar un óptimo (máximo o mínimo) los términos cuadráticos deben ser introducidos en el modelo, lo

que permite estudiar relaciones no lineales. La función polinomial se expresa como

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 + \text{residual}$$

Los modelos pueden en algunos casos incluir monomios de orden 3, y en tal caso ser modelos cúbicos. Las funciones polinomiales descritas contienen parámetros desconocidos (b_0 , b_1 , b_2 , etc.) que deben ser determinados (Lundstedt y col., 1998).

En cuanto a cómo se van a recopilar los datos para definir los factores que afectan a la función objetivo existen distintos tipos de experimentos. Estos pueden ser:

- Factorial completo a 2 niveles (2^k) donde k es el número de factores.
- Factorial fraccionado (2^{k-p}) donde el número de experimentos se reduce con respecto al anterior de acuerdo con el número p .
- Plackett-Burman, son diseños factoriales fraccionados a 2 niveles, utilizados para estudiar muchos factores y que tiene como supuesto que no debe haber interacciones entre los factores. Solo los efectos principales son calculados con un número reducido de experimentos.

En algunos casos un factor puede estudiarse a 3 niveles si se decide incluir un valor intermedio. En general un número k de factores y n niveles involucran n^k experimentos.

Una vez que se determinaron los factores responsables del experimento, así como sus interacciones, la siguiente etapa a realizar es el proceso de optimización. Es decir conocer que valores de los factores proporcionan la respuesta buscada. Para llevar a cabo el proceso de optimización se pueden distinguir entre *optimizaciones simultáneas* y *secuenciales*.

En la *optimización simultánea* se construye un diseño experimental y, con un modelo matemático, se estudia la relación entre las respuestas y los factores, a través del método de superficie de respuesta (del inglés, *Response Surface Methodology*). Los diseños experimentales utilizados en estos casos son: factorial completo para 3 o más niveles, central compuesto, Box-Behnken y diseños mezclas, entre otros.

La *optimización secuencial* se basa en un diseño inicial de experimentos con sus respectivas mediciones y obtención del resultado, a partir de los cuales se diseña otra serie de experiencias hasta encontrar el punto óptimo. El diseño experimental que se utiliza para este análisis es el método Simplex. Un simplex es una figura geométrica con $(k+1)$ vértices donde k es el número de factores en un dominio experimental de dimensión k . Por ejemplo cuando el número de factores es 2, el simplex es un triángulo (Lundstedt y col., 1998).

El método simplex permite sólo llegar a los alrededores del máximo, mientras que los métodos como los de superficie de respuesta permiten determinarlo con exactitud.

A continuación se detallan los diseños experimentales que se emplearon en este trabajo de tesis.

3.1.1.1 Diseño Factorial Fraccionado

La aplicación de los diseños factoriales completos es impracticable cuando el número de factores es muy grande ya que el número de experimentos se eleva considerablemente, lo que incrementa además el tiempo de investigación y los costos. De esta manera el diseño completo puede fraccionarse y los factores pueden ser eficientemente evaluados usando una pequeña fracción de los experimentos de un diseño factorial completo. En los primeros estudios de un sistema no es necesario investigar los efectos de las interacciones entre todas las variables, es recomendable estimar los efectos principales (Araujo y Brereton, 1996a). Asimismo en algunos casos se puede asumir que los efectos de las interacciones de tercer orden o mayores son pequeñas en comparación con los efectos principales y entonces pueden no incluirse en el modelo polinomial. De este modo aparecen las fracciones ($1/2$, $1/4$, $1/8 \dots 1/2^p$) de un diseño experimental y el diseño es entonces 2^{k-p} donde k es el número de factores y p el tamaño de la fracción. El tamaño de la fracción determina el posible número de efectos a estimar, y el número de experimentos a realizar (Lundstedt y col., 1998).

Los niveles de los factores suelen identificarse como – (menos) para el nivel bajo y + (más) para el nivel alto. La elección correcta de los niveles se determina principalmente por la experiencia y el conocimiento del experimentador y por las restricciones físicas del sistema. Para factores que son variables continuas, el efecto depende de los niveles alto y bajo utilizados. Si estos están excesivamente cerca uno del otro, se puede concluir que el efecto del factor correspondiente no sea significativo, a pesar de que sobre el intervalo completo de los niveles del factor, el efecto no sea despreciable. Por otra parte, si los niveles se alejan bastante, pueden caer a ambos lados de un máximo, y aún así dar lugar a una diferencia en la respuesta que no sea significativa.

No obstante en un diseño fraccionado varios factores pueden ser estudiados sin un número excesivo de experiencias; el precio de fraccionar las experiencias es que los factores principales son *confundidos* o lo que es lo mismo decir poseen *alias*.

Existen una o más relaciones entre los factores a estudiar que se denominan *generador*. Esta relación permitirá generar y de ahí su nombre, el diseño fraccionado a partir del diseño completo. El investigador puede crear un generador, o utilizar el que presenta el programa estadístico de computación. Estos generadores permiten

también encontrar que efectos están confundidos entre sí, o sea los *alias*. Otro término que caracteriza un diseño es su *resolución*. La *resolución* está expresada como un número e indica con que interacciones se confunde el efecto de los factores principales. Por ejemplo un diseño con resolución III no confunde los efectos principales entre sí, pero sí éstos con los de las interacciones dobles. Un diseño con resolución IV no confunde los efectos principales entre sí o con los de las interacciones dobles, sino que confunde los efectos de las interacciones dobles entre sí y los efectos principales con los de las interacciones de orden 3.

3.1.1.2 Metodología de superficie de respuesta

La *metodología de superficie de respuesta* es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas que se emplean para modelar y analizar problemas, donde el fin es encontrar en todo el espacio del diseño una ubicación conveniente que satisface los objetivos buscados. Estos podrían ser, encontrar un máximo de la respuesta, un mínimo o un área donde la respuesta es estable para un dado rango de los factores. El objetivo incluso podría ser encontrar un conjunto de condiciones experimentales que satisfaga varias respuestas simultáneamente.

En química analítica, la relación entre la respuesta y los efectos de los factores cuantitativos se basa en modelos físicos o fisicoquímicos. Otra alternativa es el modelado empírico, donde se utilizan polinomios de diferentes grados, de acuerdo con la complejidad de los datos. Estos modelos matemáticos pueden describir una superficie de respuesta lineal o curvilínea.

Las metodologías de superficie de respuesta son usadas para determinar un óptimo y además permiten ilustrar gráficamente la relación entre las variables experimentales y la respuesta. La superficie de respuesta se representa como una superficie en un espacio tridimensional. Para visualizar mejor la forma de una superficie de respuesta se grafican los contornos de dicha superficie. En esta gráfica de contornos se trazan líneas de respuesta constante en el plano x_1, x_2 . Cada contorno corresponde a una altura específica de la superficie de respuesta (Figura 1.9).

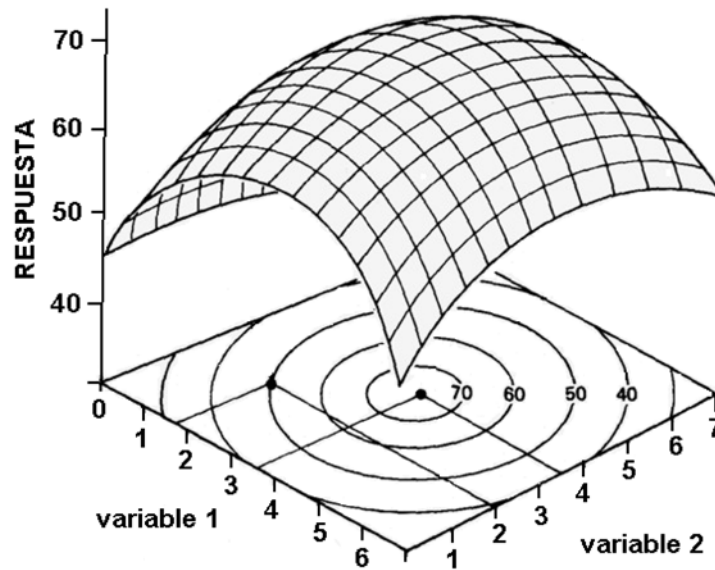


Figura 1.9: Superficie de respuesta tridimensional y su gráfica de contorno en donde se observa la respuesta (eje z) en función de la variable 1 y la variable 2 (plano x, y) (figura extraída de Myers y Montgomery, 1995).

Generalmente, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes se desconoce. Por tal motivo, el primer paso en la metodología de superficie de respuesta es determinar una aproximación a la relación real entre la respuesta y el conjunto de variables. Por lo general, se emplea un polinomio de orden bajo sobre alguna región de las variables independientes, siguiendo el principio de parsimonia, aunque en algunas oportunidades debe usarse un polinomio de mayor grado. El método de cuadrados mínimos sirve para estimar los parámetros del polinomio de aproximación.

Como se mencionó una de las metodologías de superficie de respuesta son los *diseños central compuesto*. Estos diseños consisten de:

- Un *diseño cúbico*, que corresponde a un diseño factorial fraccionado o completo a 2 niveles. El número de puntos o experimentos se expresa como $n_{\text{cúbico}}$ y es igual a 2^k para un completo o 2^{k-p} para un fraccionado, donde k es el número de factores.
- Un *diseño estrella* cuyo objetivo es agregar más niveles y describir curvatura. Estos puntos se denominan puntos axiales (n_{estrella}), y se sitúan a una distancia α del centro describiendo una estrella. El valor que toma α se expresa por $\alpha = (n_{\text{cúbico}})^{1/4}$.
- Un *punto central* (n_{central}) con todos los factores evaluados en su nivel intermedio, generalmente es el punto que se replica porque el diseño asume que el error experimental está relacionado con la distancia desde el centro del diseño.

El número de experiencias a realizar está dado entonces por $n = n_{\text{cúbico}} + n_{\text{estrella}} + n_{\text{central}}$.

Si los experimentos son ilustrados como puntos en un sistema de coordenadas, entonces para 3 variables se obtiene un cubo (Figura 1.10).

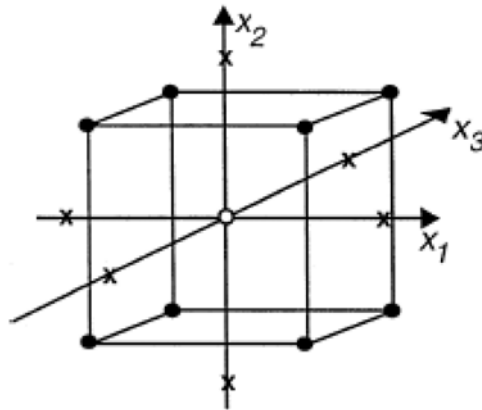


Figura 1.10: Diseño central compuesto para 3 factores x_1 , x_2 y x_3 . Punto central (\circ), puntos factoriales (\bullet) y puntos axiales (x) (figura extraída de Lundstedt y col., 1998).

Se dice que un diseño experimental es *rotatable* o *girable*, si la variancia de la respuesta y predicha en algún punto x es función sólo de la distancia al punto desde el centro del diseño y no es una función de la dirección, o sea la varianza de la respuesta estimada es la misma en todos los puntos. La *rotabilidad* es una propiedad muy importante en la elección de un diseño de superficie de respuesta. Dado que la finalidad de la metodología de superficie de respuesta es la optimización y se desconoce la localización del óptimo antes de comenzar el experimento, tiene sentido usar un diseño que proporcione estimaciones igualmente precisas en todas las direcciones (Araujo y Brereton, 1996b). Un diseño central compuesto se convierte en *rotatable* mediante la elección del α . El valor de α para lograr la conversión a diseño *rotatable* depende del número de puntos de la porción factorial del diseño. En la Tabla 1.1 se muestran ejemplos de valores de α hasta 6 factores.

Tabla 1.1 Ejemplos de valores de α

Número de factores	2	3	4	5	6
Número de experimentos en el diseño factorial	4	8	16	32	64
Número de puntos axiales	4	6	8	10	12
Valor de α	1.414	1.682	2.000	2.378	2.828

Otra propiedad de estos diseños es que pueden “crecer” a partir de un diseño de primer orden (el 2^k) agregando los puntos axiales y algunos puntos centrales. Para

estimar el error experimental es necesario realizar repeticiones de la combinación de factores. Usualmente, como se mencionó anteriormente el punto central es el que se replica 3 veces.

3.1.1.2.1 Optimización

Una vez que se estimaron los parámetros del polinomio y se obtuvieron los gráficos de las superficies de respuesta, se procede a la *optimización* propiamente dicha. Este proceso puede realizarse en forma *gráfica* o *numérica*. Para múltiples respuesta, al superponer las gráficas de contorno de cada respuesta individual, se pueden estimar las soluciones, siempre y cuando el número de respuestas y de variables no sea muy grande. En el caso de una sola respuesta, el investigador inspecciona la gráfica de contorno y el programa de computadoras permite ir seleccionando distintos puntos que corresponden a la combinación de los factores, según el objetivo que se tiene sobre la respuesta. Sin embargo, cuando el número de respuestas y de variables es grande, la *optimización gráfica* se vuelve complicada. En esta situación la opción es la *optimización numérica*.

Derringer y Suich en 1980, desarrollaron la *función deseabilidad* que se utiliza ampliamente en la industria para la optimización de procesos con respuestas múltiples. La *función deseabilidad* se basa en la idea de que la calidad de un producto o proceso, que tiene múltiples características, con una de ellas fuera de algún límite “deseable” es completamente inaceptable. Este método busca condiciones operativas que provean el mejor “valor de la respuesta deseable” (Myers y Montgomery, 1995). No obstante, la *función deseabilidad* no deja de ser una función matemática, así que puede aplicarse en la optimización de una sola respuesta.

3.1.1.2.2 Metodología para el cálculo de la función deseabilidad

Para cada respuesta $Y_i(x)$ se puede calcular una función deseable $d_i(Y_i)$ que toma valores entre 0 y 1, donde $d_i(Y_i)=0$ representa un valor no deseable y $d_i(Y_i)=1$ un valor deseable o una respuesta ideal.

Dependiendo del criterio de optimización, pueden usarse diferentes *funciones deseabilidad*. Derringer y Suich denominaron L_i , U_i y T_i a los valores bajo, alto y un valor fijo, respectivamente, de respuestas deseadas para la respuesta Y_i con $L_i \leq T_i \leq$

U_i . Para lograr el objetivo de este trabajo de tesis se procedió a ajustar la respuesta a un valor T_i , entonces la función deseabilidad es:

Ecuación 1.4

$$d_i(\bar{Y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{si } \bar{Y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{\bar{Y}_i(x) - L_i}{T_i - L_i} \right)^s & \text{si } L_i \leq \bar{Y}_i(x) \leq T_i \\ \left(\frac{\bar{Y}_i(x) - U_i}{T_i - U_i} \right)^t & \text{si } T_i \leq \bar{Y}_i(x) \leq U_i \\ 0 & \text{si } \bar{Y}_i(x) > U_i \end{cases}$$

Donde los exponentes s y t se denominan *peso* y permiten cambiarle la forma a cada *función deseabilidad individual* (Figura 1.11). Los pesos se utilizan para darle énfasis a los criterios. Cuando el peso es 1, la *función deseabilidad individual* (d_i) varía entre 0 y 1 linealmente. Pesos mayores a 1 (el máximo peso es 10) le otorgan mas énfasis al criterio; pesos menores a 1 (el mínimo es 0.1) le dan menos peso al criterio.

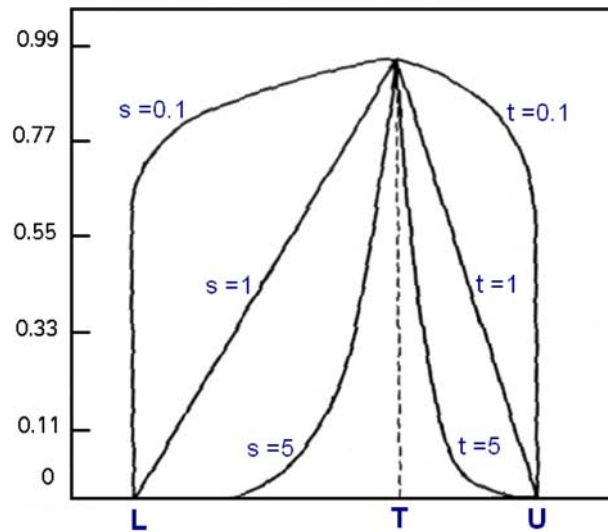


Figura 1.11: Curvas de la función deseabilidad individual cuando se desea ajustar la respuesta a un valor fijo (T) (figura extraída de Myers y Montgomery, 1995).

En otras palabras, si el criterio adoptado es muy estricto, se utiliza un valor de s o t grande. En caso contrario, cuando la condición no es tan estricta, se puede utilizar un valor de s o t pequeño.

Durante el proceso de optimización el investigador no debe distraerse tratando de encontrar un valor alto de *deseabilidad*, ya que el objetivo de la optimización es encontrar un conjunto de condiciones experimentales que permitan alcanzar un dado valor en la respuesta, no encontrar un valor de *deseabilidad* de 1. En otras palabras la

deseabilidad es un método matemático para encontrar el óptimo, y como se mencionó anteriormente en las etapas del proceso de búsqueda de factores significativos, las técnicas estadísticas no pueden sustituir el hecho de reflexionar sobre el problema, y a las decisiones que el investigador crea convenientes según su conocimiento del proceso y su sentido común.

4. CONCLUSIONES

- La piel está en un proceso de regeneración continua, además tiene respuestas inmunológicas e histológicas a ciertos estímulos y es metabolitamente activa. La administración transdérmica de drogas es un proceso dinámico y representa una vía de administración práctica, segura y poco invasiva, y es un término general que describe el transporte de sustancias químicas desde la superficie externa de la piel a su interior y a la circulación sistémica. En un futuro se espera, sean posibles tratamientos con un mayor espectro de drogas. Es importante resaltar que el estrato córneo (la más externa de las capas de la EPD y lugar donde reside la función barrera de la piel) tiene una afinidad tanto para compuestos solubles en agua como para liposolubles. Esta solubilidad bifuncional proviene de su estructura que permite a regiones acuosas y lipídicas existir en forma separada. En la medición de la permeabilidad cutánea hay una variabilidad considerable. Existen diferencias importantes en la permeabilidad entre especies e intraespecie. La absorción transdérmica depende asimismo del lugar anatómico, del estado de la piel y de su hidratación; además de propiedades del principio activo, del vehículo en el que está disuelto dicho compuesto, factores inherentes al sistema de prueba utilizado para el estudio (dosis, volumen, oclusión o no de la zona de prueba, duración de la exposición). Se han elaborado ecuaciones y modelos teóricos para describir el transporte de una sustancia química por difusión a través de la piel. Los principales parámetros evaluados en los experimentos *in vitro* son normalmente el flujo en EE y el K_p , en los cuales la concentración de la sustancia que difunde se mantiene en la solución donante en condiciones de dosificación constante. La mayor parte de las propiedades de permeabilidad del estrato córneo se mantienen inalteradas después de su extracción desde el fragmento de piel completa, durante un cierto tiempo. Así pues, existe una buena correlación entre las mediciones obtenidas en experimentos de difusión *in vitro* y la situación que ocurre *in vivo*. El objetivo final de la farmacéutica dermatológica sistémica es diseñar vehículos o dispositivos que liberen el medicamento a una velocidad y concentración controladas y durante el tiempo necesario.

- Los estudios *in vitro* de difusión de drogas, a través de fragmentos de piel humana o animal o membranas sintéticas, se realizan con la finalidad de evaluar y predecir el nivel de penetración del fármaco y la velocidad del proceso. Las membranas artificiales de biopolímeros se presentan como excelentes opciones con ciertas ventajas en relación a las membranas biológicas; y la simulación de permeabilidad de piel con membranas de QUI está tomando relevancia en las tecnologías actuales. Sin embargo preparar membranas de QUI capaces de simular el flujo de cualquier droga implica manipular ciertas variables del proceso, porque una membrana de QUI no puede ser usada para simular la permeación de drogas a través de todos los tipos de EPD. En lo que concierne a esta tesis las variables a estudiar en el diseño de membranas de QUI son, concentración de biopolímero, concentración de agente de EC, tiempo de EC y tratamiento térmico. Las tres primeras ya han sido evaluadas (Dureja y col., 2001; Rana y col., 2004 y 2005). Sin embargo en el trabajo de Dureja y col., estos autores mencionan a la T de secado como una variable que afecta las propiedades de las membranas pero no la incluyen en el diseño estadístico de optimización. Este antecedente junto con el del trabajo realizado por Retuert y col. (2000), donde los valores de microdureza, y por lo tanto los de fragilidad, se modificaron con un calentamiento moderado, debido a la pérdida de agua y a la formación de nuevos enlaces intermoleculares, hacen pensar en la posible influencia de esta variable en el flujo de drogas a través de membranas de QUI. De modo que el estudio de estas variables permitirá el diseño de membranas con una composición particular, y el trabajo con dichas membranas hará posible evaluar sistemas de administración transdermal en condiciones controladas de laboratorio.
- En cualquier procedimiento experimental, varias variables experimentales o factores pueden influir en el resultado. Se realizan entonces experimentos para estudiar el sistema con el fin de determinar las variables experimentales y las interacciones que tienen una influencia significativa en el resultado, determinado por una o varias respuestas. Luego se procede a la optimización cuyo objetivo general es encontrar las condiciones que producen el mejor resultado o el resultado que más se acerca al objetivo deseado por el investigador.
- El E2 fue seleccionado como droga modelo para el desarrollo de este trabajo de tesis, debido a su uso extensivo y a la alta relevancia en la TH. El estudio de los procesos difusivos de esta droga a través de fragmentos de piel humana y a través de membranas poliméricas, pretende ser la base para el desarrollo de Sistemas de Administración Transdermal de E2.

CAPÍTULO 2

1. CARACTERIZACIÓN DEL QUITOSAN

1.1 Introducción y objetivos

La composición de las cadenas de QUI y sus dimensiones, suelen variar dependiendo del material de partida y del método de obtención. Por este motivo, el GD y el peso molecular son 2 parámetros que se deben conocer para caracterizar una muestra de este polisacárido ya que ambos tienen gran incidencia en sus propiedades.

Para la determinación del GD son varias las metodologías propuestas en la literatura: espectroscopias de IR, de UV, de RMN, potenciometría, conductimetría, métodos enzimáticos, análisis elemental entre otros. Sin embargo el valor del GD obtenido estará afectado por la técnica elegida para su determinación, y esto hará que los mismos sean distintos entre una técnica y otra. Por esto se recomienda que se informe el GD y se aclare mediante que técnica se determinó. Las más utilizadas son la espectroscopia de IR y de RMN.

El método de espectroscopia de IR utilizando la droga sólida en pastillas con bromuro de potasio presenta las ventajas de ser rápido y no requerir la disolución del polímero, incluso pueden utilizarse membranas muy finas para obtener el espectro (Khan y col., 2002). Ambas formas de trabajo están sujetas al error en el que se puede incurrir al seleccionar de manera inadecuada las líneas de base para el cálculo de las absorbancias, o utilizar absorbancias de grupos que no sean las indicadas o que estén ligadas a modificaciones como por ejemplo las absorbancias del grupo hidroxilo a 3450 cm^{-1} cuya intensidad se modifica según el contenido de agua de la muestra (Yanmng y col., 2001; Khan y col., 2002). Por consiguiente, la metodología de IR es la más discutida y aunque resulta simple requiere de una calibración frente a una técnica absoluta. Sí puede usarse esta técnica para la identificación del polímero.

La espectroscopia de RMN ya sea en solución como en estado sólido (RMN de protón ^1H RMN y de carbono ^{13}C RMN) es una técnica muy utilizada en la caracterización de biomateriales. El requisito de solubilidad en alguno de los disolventes deuterados disponibles (comúnmente DCCl_3 , DMSO-d_6 , D_2O , $\text{CD}_3\text{-CO-CD}_3$, CF_3COOD) es fundamental para efectuar el análisis en solución mediante esta técnica. En un trabajo reportado por Lavertu y col. (2003) se realizó una validación de espectroscopia ^1H RMN utilizando muestras de QUI en un rango de desacetilación de 48-100%. El método desarrollado por estos autores fue simple, rápido y más preciso que técnicas

como espectroscopia de IR o titulación, además demostró ser robusto, exacto, específico y las soluciones del polímero fueron estables en el medio ácido en el que se disolvieron las muestras para el análisis. Se evaluaron 3 ecuaciones que utilizan las integrales de distintos picos tanto del monómero acetilado como del desacetilado, y que se muestran a continuación:

$$\text{Ecuación 2.1} \quad \%GD = \left(\frac{H1D}{H1D + 1/3HAc} \right) \cdot 100$$

$$\text{Ecuación 2.2} \quad \%GD = \left[1 - \left(\frac{1/3HAc}{1/6H26} \right) \right] \cdot 100$$

$$\text{Ecuación 2.3} \quad \%GD = \left(\frac{H1D}{H1D + H1A} \right) \cdot 100$$

En la Figura 2.1 se muestran ambos monómeros del QUI, el desacetilado y acetilado. En la Ecuación 2.1 se usan las integrales de los picos del protón H1 del monómero desacetilado (H1D) y el pico de los tres protones del grupo acetilo (HAc). La Ecuación 2.2 que fue propuesta por Hirai y col. (1991), utiliza las señales de los protones H2, H3, H4, H5, H6 y H6' (H26) de ambos monómeros y el pico del grupo acetilo (HAc). Mientras que para muestras del polímero con GD menores al 90.0 %, también se utilizó la Ecuación 2.3 que implica las señales del protón H1 del monómero acetilado (H1A) y desacetilado (H1D). La Ecuación 2.3 no es recomendable para muestras con altos GD porque la señal del H1A no es visible en el espectro, además el uso de las señales del grupo acetilo en las dos primeras ecuaciones presenta ventajas sobre el uso de la señal del H1A; el pico del HAc es tres veces más intenso que el del H1A lo que lo lleva a tener una muy buena resolución. Sin embargo la Ecuación 2.3 debe ser utilizada cuando el pico del grupo acetilo no es bien resuelto debido a la presencia de contaminantes tales como el ácido acético.

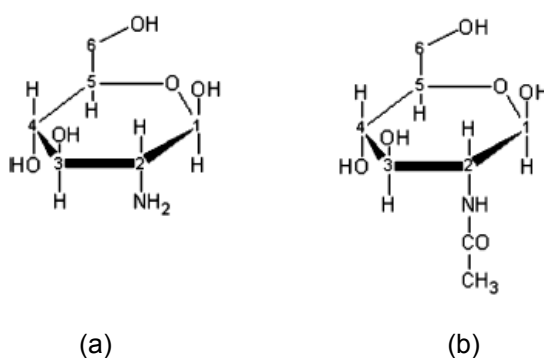


Figura 2.1: Monómeros de QUI, (a) desacetilado, (b) acetilado

La viscosidad de una solución de polímero es, básicamente, una medida del tamaño o extensión en el espacio de las moléculas de polímero. Pueden establecerse correlaciones entre la viscosidad de soluciones diluidas de la macromolécula y parámetros tales como peso molecular y longitud de cadena. No obstante, lo anterior se cumple bajo ciertas restricciones, para polímeros lineales no ramificados y soluciones diluidas; para poder establecer una relación entre la viscosidad y el volumen hidrodinámico. A su vez esta relación depende de algunas variables, entre las más importantes el tipo de solvente y la T. Las ecuaciones necesarias para el cálculo de las diferentes viscosidades son las siguientes (ASTM D 2857-87, 1993):

$$\text{Ecuación 2.4} \quad \text{Viscosidad Específica } (\eta_{sp}) = \frac{(\eta - \eta_0)}{\eta_0} = \frac{(t - t_0)}{t_0}$$

$$\text{Ecuación 2.5} \quad \text{Viscosidad Relativa } (\eta_r) = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0}$$

$$\text{Ecuación 2.6} \quad \text{Viscosidad Reducida } (\eta_{red}) = \frac{\eta_{sp}}{C}$$

$$\text{Ecuación 2.7} \quad \text{Viscosidad Inherente } (\eta_{inh}) = \frac{(\ln \eta_r)}{C}$$

$$\text{Ecuación 2.8} \quad \text{Viscosidad Intrínseca } (\eta) = \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right)_{C=0} = \left[\frac{(\ln \eta_r)}{C} \right]_{C=0}$$

Donde

t_0 = tiempo de escurrimiento en segundos del solvente

t = tiempo de escurrimiento en segundos de la solución

C = concentración del polímero en g mL⁻¹

Como puede verse, la viscosidad intrínseca se calcula por extrapolación a concentración cero en un gráfico de viscosidad reducida o viscosidad inherente en función de la concentración. Se mencionó que el valor de viscosidad intrínseca puede utilizarse para obtener una medida del peso molecular; la ecuación de Mark-Houwink es una de las que establece esa relación:

$$\text{Ecuación 2.9} \quad \eta = k \cdot \overline{M}_v^\delta$$

donde \overline{M}_v es la masa molecular viscosimétrica relativa y k y δ son constantes que dependen del solvente, del tipo de polímero y de la T. Dado que el QUI se comporta como un polielectrolito en soluciones acuosas diluidas de ácidos, la distribución de cargas en la cadena dependerá fuertemente del solvente y de características intrínsecas del polímero tales como su GD. Wang y col. (1991) reportaron que los valores de k y δ no son constantes sino que se modifican según el GD, lo cual

modificaría la ecuación de Mark-Houwink. Entonces estos parámetros pueden calcularse según las siguientes relaciones:

$$\text{Ecuación 2.10} \quad k = 1.64 \times 10^{-30} \cdot GD^{14}$$

$$\text{Ecuación 2.11} \quad \partial = -1.02 \times 10^{-2} \cdot GD + 1.82$$

El objetivo es caracterizar una muestra de QUI en polvo: determinar contenido de cenizas, identificar grupos propios mediante espectroscopia IR y determinar GD y el peso molecular.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Equipamiento

Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro Shimadzu FTIR-8201 PC.

Para la determinación del GD mediante espectroscopia de RMN de protón (^1H RMN) se utilizó un espectrómetro de RMN Bruker AVANCE de 300 MHz.

Los tiempos de caída del solvente y de las soluciones del polímero a diferentes concentraciones para determinación de las viscosidades se realizaron en un Medidor de viscosidad Schott Geräte AVS 300, con un viscosímetro capilar Cannon Fenske N° 75.

1.2.2 Reactivos y materiales

El QUI fue comprado en Polymar Ciencia y Nutrición S.A. (Brasil). El óxido de deuterio (D_2O) y el cloruro de deuterio (DCI) fueron de la marca Sigma Aldrich. El acetato de sodio (NaCH_3COO) (Anedra) fue de grado analítico. El ácido acético fue PA >99.5% (Cicarelli). El agua que se utilizó para las disoluciones y las diluciones fue de calidad ultrapura.

1.2.3 Determinación del contenido de cenizas

El crisol se trató a 600.0 °C durante 6 horas, luego se pesó al enfriarse. Se pesó 1.0 g de QUI y se incineró a 600.0 °C durante 6 horas, al enfriarse se pesó y se calculó el contenido de cenizas.

1.2.4 Identificación por espectroscopia infrarroja

El espectro se obtuvo en la región de frecuencia de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ sobre una pastilla preparada con QUI y bromuro de potasio, previamente secados en estufa.

1.2.5 Determinación del grado de desacetilación

Se determinó el GD (%) mediante la técnica propuesta por Lavertu y col. (2003), para lo cual se disolvió 10.0 mg de polímero en una solución compuesta de 1.96 mL de D_2O y 0.04 mL de DCI. La obtención de los espectros se realizó a $70.0\text{ }^\circ\text{C}$, T en la cual el pico del solvente no interfiere con ningún pico del QUI.

1.2.6 Determinación viscosimétrica de masas moleculares

Se determinó la masa molecular empleando el método viscosimétrico. Se preparó una solución madre de QUI por disolución de la droga sólida en un volumen determinado de la mezcla ácido acético 0.2 mol L^{-1} / acetato de sodio 0.1 mol L^{-1} (pH 5.0) (Wang y col., 1991), para alcanzar una concentración final de 0.2 \% p v^{-1} . Se determinaron los tiempos de caída de la mezcla solvente y de soluciones del polímero a 3 niveles de concentración (2.5×10^{-4} , 6.0×10^{-4} y $8.0 \times 10^{-4}\text{ g mL}^{-1}$), comenzando por la más diluida, en un baño a una T de $30.0\text{ }^\circ\text{C}$. Todas las soluciones se filtraron con filtros de vidrio poroso y membranas de $0.2\text{ }\mu\text{m}$ antes de realizar cada medición, para eliminar posibles materiales en suspensión.

Las soluciones de QUI se prepararon de manera que las viscosidades relativas calculadas de acuerdo a la Ecuación 2.5 varíen entre 1.1 y 1.5 y se determinaron los tiempos de caída por triplicado con una reproducibilidad tal que las lecturas no difieran en más del 0.1 \% (ASTM D 2857-87, 1993).

1.3 Resultados y discusión

El valor del contenido de cenizas estuvo de acuerdo con el reportado por el proveedor del polímero 1.95 \% (Polymar S.A., Brasil) y fue,

$$\% \text{ de Cenizas} = 2.10 \%$$

Se obtuvo el espectro IR de una muestra de QUI (Figura 2.2) y se identificaron las principales bandas de absorción (Tabla 2.1). Los datos espectroscópicos coincidieron con los reportados en la bibliografía (Yanming y col., 2001).

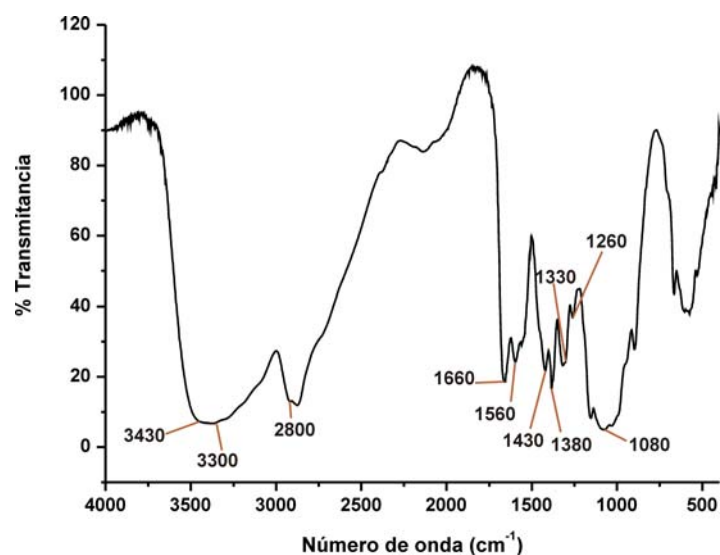


Figura 2.2: Espectro IR del QUI

Tabla 2.1: Frecuencias de absorción características del espectro IR del QUI.

Frecuencia (cm ⁻¹)	Grupo Funcional
3400	O-H
3300	N-H
2800	C-H
1660	C=O (amida I)
1560	N-H (amida II)
1430	C-H, O-H
1380	C-H (CH ₃)
1330	O-H
1260	C-N (amida III)
1080	C-O-C

En la Figura 2.3 se muestra el espectro de ¹H RMN de una muestra de QUI obtenido a 70.0 °C.

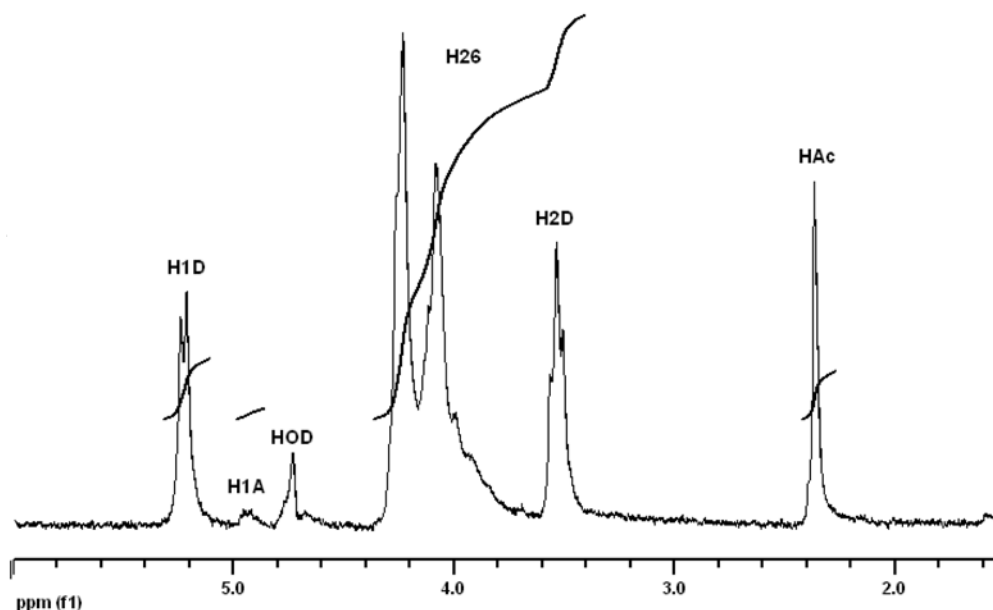


Figura 2.3: Espectro ^1H RMN de QUI obtenido a 70.0 °C.

El pico de solvente aparece a 4.67 ppm. Con los valores de las integrales de las señales correspondientes a los picos de QUI: $\text{H1D}=1$, $\text{H1A}=0.03$, $\text{H26}=6.06$ y $\text{HAc}=0.79$ se calculó el GD según las Ecuaciones 2.1, 2.2 y 2.3. Los valores de GD obtenidos fueron 79.16 %, 73.93 % y 97.09 %, respectivamente para las Ecuaciones 2.1, 2.2 y 2.3. Los dos primeros valores son similares entre sí pero muy distintos al tercero. El valor reportado por la empresa proveedora del QUI es un GD de 98.18 % y la técnica para su determinación fue valoración potenciométrica. No obstante el GD obtenido con la Ecuación 2.3 fue el más cercano al reportado; para su cálculo se utilizó la señal del pico del protón H1A que, como puede verse en la Figura 2.3 fue muy pequeño, lo que podría producir error. Mientras que la señal del grupo acetilo usada en las Ecuaciones 2.1 y 2.2 es bien visible. Como se mencionó, está reportado en la bibliografía que el GD determinado para una misma muestra resulta ser dependiente del método y muy a menudo se encuentran grandes variaciones (a veces incluso hasta del 10 %) entre los resultados obtenidos por distintas técnicas. Estas diferencias están relacionadas con errores sistemáticos, que distorsionan los resultados de una forma dependiente del método. Por ejemplo, en un trabajo realizado por Balázs y Sipos (2007) sobre las limitaciones de la potenciometría para determinar GD, se observó que los resultados obtenidos con este método dependen de la forma en que se determina el punto de equivalencia, y siempre son diferentes de los datos obtenidos por otras técnicas, tales como las espectroscopias de IR, de ^1H NMR, de UV y análisis elemental. Estos autores indicaron que las muestras deben ser sometidas a un eficiente proceso de secado, también debe ser determinado su contenido de cenizas, especificar la forma en que se hace el tratamiento matemático de los datos para

establecer los puntos de equivalencia (método de la segunda derivada o linealización) ya que ambos provocaron diferencias en los valores de GD obtenidos y tener en cuenta que la presencia de ácido acético residual como producto de los distintos procesos de purificación del QUI influye en los resultados. De las 7 muestras analizadas en el trabajo de Balázs y Sipos (2007) en 4 de ellas los valores de GD obtenidos por potenciometría fueron mayores que los obtenidos por ^1H NMR aunque la mayor diferencia fue de aproximadamente un 4 %.

En la Figura 2.4 se muestran los espectros reportados por Lavertu y col. (2003) para muestras de QUI con 87.0 % de GD (a) y 100.0 % de GD (b), y nuevamente el espectro obtenido para el QUI utilizado en este trabajo de tesis (c). Puede notarse la similitud de éste último con el de la muestra con 87.0 % de GD. Analizando los espectros, fue notable la diferencia en las señales del protón H1 del monómero acetilado y del grupo acetilo en 4.9 ppm y 2.35 ppm respectivamente, entre el QUI con 100.0 % de GD y el QUI empleado en esta tesis. Al mismo tiempo se observó la similitud en estas mismas señales entre el espectro de la muestra con 87.0 % de GD y el espectro de la muestra de polímero que se utilizó en esta tesis.

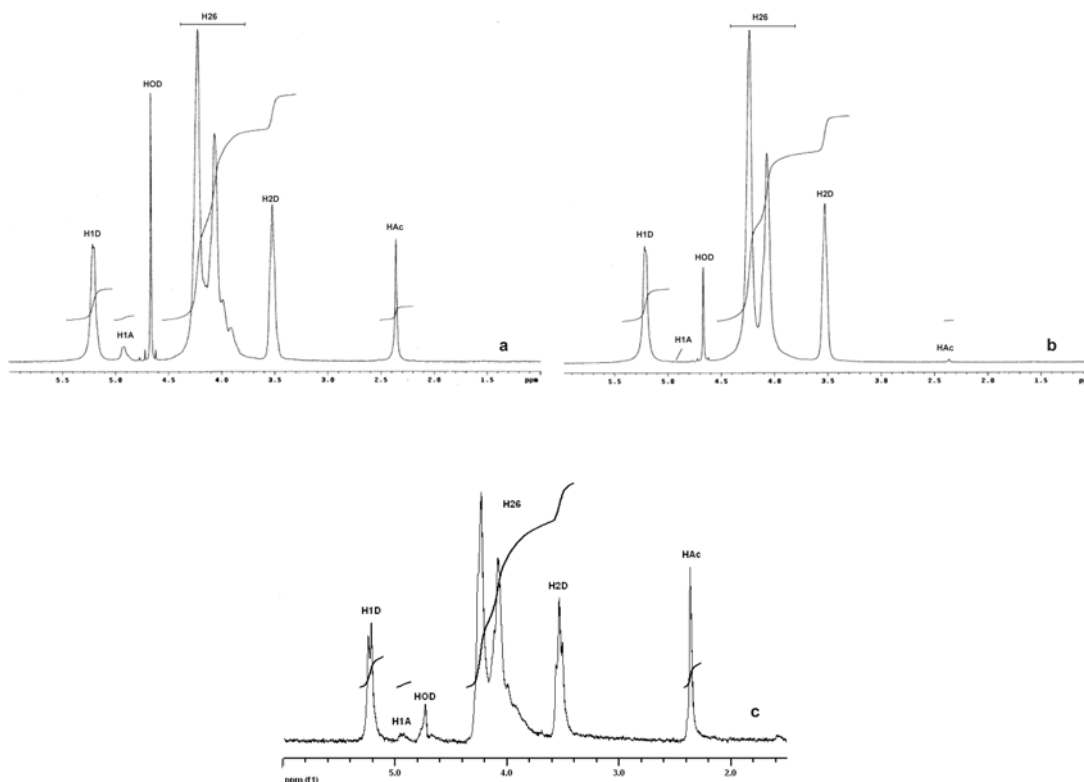


Figura 2.4: Espectro ^1H RMN de QUI obtenido a 70.0 °C (a) 87.0 % de GD, (b) 100.0 % de GD (figuras extraídas de Lavertu y col., 2003), y (c) QUI utilizado en esta tesis.

La especificidad del método fue corroborada de la misma manera que en el trabajo de Lavertu y col. (2003), de modo que se adicionó ácido acético a la muestra y nuevamente los resultados obtenidos fueron similares a los reportados por estos autores (Figura 2.5).

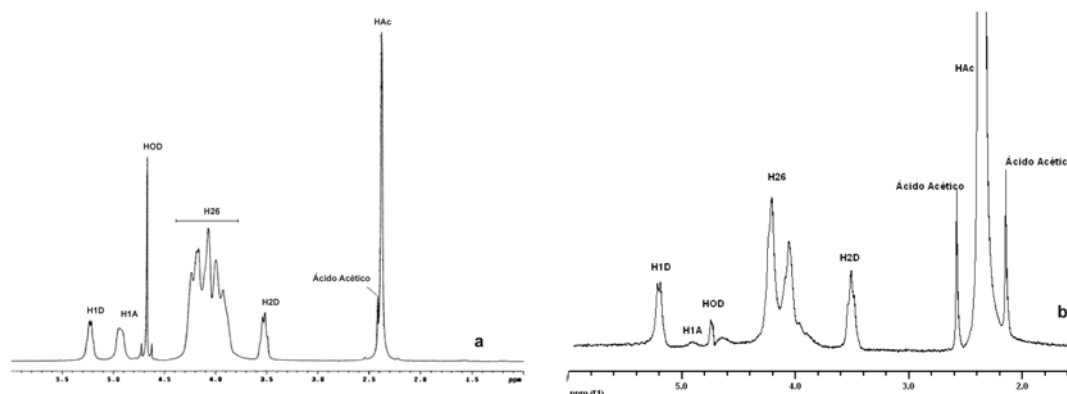


Figura 2.5: Espectro ^1H RMN de QUI obtenido a 70.0°C con el agregado de ácido acético (a) figura extraída de Lavertu y col., 2003 y (b) QUI utilizado en esta tesis.

Para corroborar los resultados obtenidos mediante espectroscopia de RMN se realizó un análisis elemental de una muestra de QUI para calcular el GD mediante esta técnica. Para lo cual se envió una muestra del polímero al Laboratorio de la Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos Aplicados a Química Orgánica (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA). El resultado fue %C: 39.73, %H: 7.12 y %N: 7.08, con estos valores y según la Ecuación 2.12 reportada por Yanmng y col. (2001) se obtuvo un GD de 72.66 %, similar a los GD calculados con las Ecuaciones 2.1 y 2.2.

$$\text{Ecuación 2.12} \quad \frac{\%N}{\%C} = \frac{14}{96 - 24GD}$$

De esta manera se concluyó que el GD no coincidió con el reportado por el proveedor (98.18%) sino que fue del orden del 70.0 – 80.0 % (valores obtenidos con las Ecuaciones 2.1 y 2.2). Se decidió informar como GD el promedio del valor obtenido con las Ecuaciones 2.1 y 2.2 en ^1H RMN, dado que es similar al obtenido mediante análisis elemental y porque RMN es la metodología recomendada en la bibliografía. Mientras que el valor obtenido con la Ecuación 2.3 de ^1H RMN debió estar influenciado por la pequeña señal del protón H1 del monómero acetilado.

% Grado de Desacetilación = 76.55

La Tabla 2.2 muestra los valores promedios obtenidos de los tiempos de caída y de las viscosidades calculadas según las Ecuaciones 2.4 a 2.7. En los 3 niveles de concentración evaluados y en el solvente, el coeficiente de variación para los tiempos de caída no superó el 0.1 %, cumpliendo con el requerimiento del ensayo.

Tabla 2.2: Viscosidad de las soluciones de QUI.

Conc. x 10 ⁻⁴ (g mL ⁻¹)	t (seg)	η_{sp} (adim)	η_{red} (adim)	η_r (adim)	η_{inh} (adim)
2.5	126.58	0.103	410.62	1.10	390.88
6	144.60	0.260	432.78	1.26	384.75
8	155.68	0.352	439.59	1.35	376.68

t_0 solvente: 114.79 segundos

Se graficaron la viscosidad reducida e inherente en función de la concentración de QUI (Figura 2.6). A partir de la gráfica se determinó el valor de la viscosidad intrínseca por extrapolación a concentración cero, $\eta = 397.91 \text{ mL g}^{-1}$.

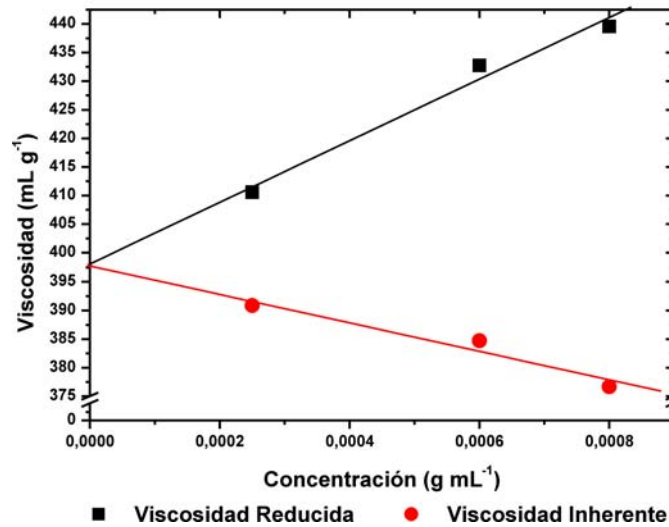


Figura 2.6: Viscosidad en función de la concentración de QUI.

Los valores de k y ∂ para el sistema QUI-solvente utilizado fueron $3.89 \times 10^{-4} \text{ L g}^{-1}$ y 1.0392, calculados según las Ecuaciones 2.10 y 2.11, respectivamente. Con estos valores y el de la viscosidad intrínseca se calculó el valor de masa molecular viscosimétrica relativa según la ecuación de Mark-Houwink (Ecuación 2.9),

$$\overline{M}_v = 6.07 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$$

2. CARACTERIZACIÓN DEL ESTRADIOL Y DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

2.1 Introducción y objetivos

Las hormonas esteroides son moléculas cuyo precursor primario es el ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano. Este núcleo está compuesto de 4 anillos, 3 hexagonales y 1 pentagonal. Una de las clases de hormonas esteroides son los estrógenos, y dentro de éstos en una mujer adulta las hormonas más importantes son el E2 y la progesterona. Los estrógenos son todos esteroides de 18 átomos de carbono. En la Figura 2.7 se muestra la estructura química del E2.

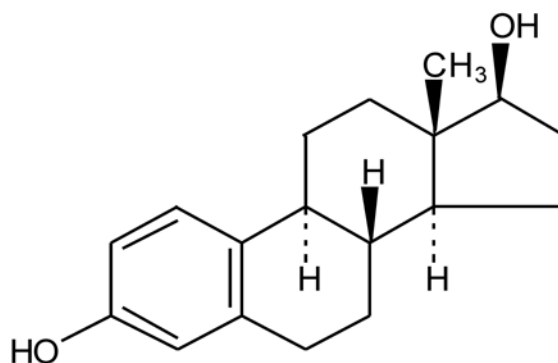


Figura 2.7: Estructura química de E2.

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que el mismo es adecuado para el propósito designado. En este caso el procedimiento analítico es un método de cuantificación de E2 mediante cromatografía líquida. La validación proporciona un cierto grado de confianza en el método analítico y en los resultados que se obtienen de él, y además permite conocer características sobre el funcionamiento de dicho método.

Los parámetros que se estudian en una validación se seleccionan en función del método analítico, de las características de la muestra y finalidad para la cual se lo utilizará.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Equipamiento y programas de computación

Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro Shimadzu FTIR-8201 PC.

El punto de fusión se determinó en un equipo Büchi Melting Point B-540.

Los espectros de UV fueron obtenidos en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401 PC.

Todas las experiencias del método de cuantificación de E2 se realizaron en un equipo ternario de cromatografía líquida de alta resolución Shimadzu LC-10 con detector UV de arreglo de diodos. El análisis de los datos y el estudio de linealidad del método se realizaron con el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1.

2.2.2 Reactivos y materiales

El E2 de pureza 99% y el E2 estándar que cumple con las especificaciones de la Farmacopea de EEUU fueron de la marca Sigma Aldrich. Los reactivos cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y fosfato de sodio dibásico dihidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Anedra) fueron de grado analítico.

El etanol fue PA >99.5% (Cicarelli). El acetonitrilo fue de calidad cromatografía líquida (Merck). El agua que se utilizó para las disoluciones y las diluciones fue de calidad ultrapura.

La solución reguladora buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4) fue preparada por disolución de: 8.0 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 0.2 g de KH_2PO_4 y 1.44 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 1.0 L de agua ultrapura.

2.2.3 Identificación por espectroscopia infrarroja

Los espectros de E2 y de E2 estándar se obtuvieron en la región de frecuencia de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ sobre una pastilla preparada con la droga sólida y bromuro de potasio, previamente secados en estufa.

2.2.4 Desarrollo de un método de cuantificación de estradiol mediante cromatografía líquida de alta resolución

El sistema cromatográfico y las condiciones de análisis se seleccionaron siguiendo las recomendaciones de la Farmacopea de EEUU (US Pharmacopeia 30, 2007a), y fueron: columna C18 (Spherisorb ODS2, 250 x 4.6 mm, 5 mm de diámetro interno), fase móvil acetonitrilo:agua (50:50), flujo 1.0 mL min⁻¹, T del horno 30.0 °C, longitud de onda de detección 280 nm, tiempo de stop 8.0 minutos y volumen de inyección manual 20.0 µL.

La solución madre de E2 se preparó por disolución de la droga sólida en un volumen determinado de etanol para alcanzar una concentración final de 300.0 ppm. Esta solución se conservó en oscuridad a 4.0 °C.

Para verificar la linealidad del método en el rango de concentración de 0.5 a 100.0 ppm, se prepararon soluciones de calibrado a 7 niveles de concentración: 0.5, 3.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 y 100.0 ppm de E2; y se inyectaron por triplicado (ICH, 2005). Las soluciones de calibrado se prepararon en el día por dilución de cantidades conocidas de la solución madre en una mezcla de etanol:PBS (40:60).

Se realizaron ensayos de precisión para lo cual, se analizaron por sextuplicado 3 soluciones a 3 niveles de concentración de E2: nivel 1 = 3.0 ppm, nivel 2 = 10.0 ppm y nivel 3 = 50.0 ppm (ICH, 2005). Se calculó el coeficiente de variación para cada nivel de concentración.

La precisión intermedia también se analizó para estudiar la variabilidad del método entre diferentes días. Se evaluó mediante 6 inyecciones repetidas de diferentes soluciones a un nivel de concentración intermedio de E2 de 25.0 ppm (ICH, 2005). Se calculó el coeficiente de variación.

Cada solución se filtró a través de filtro de jeringa con membrana de nylon de 0.45 µm y se analizó en el sistema cromatográfico y bajo las condiciones previamente descritos.

2.3 Resultados y discusión

Se obtuvieron los espectros IR de una muestra de E2 y de E2 estándar (Figura 2.8). Como puede observarse los espectros fueron similares.

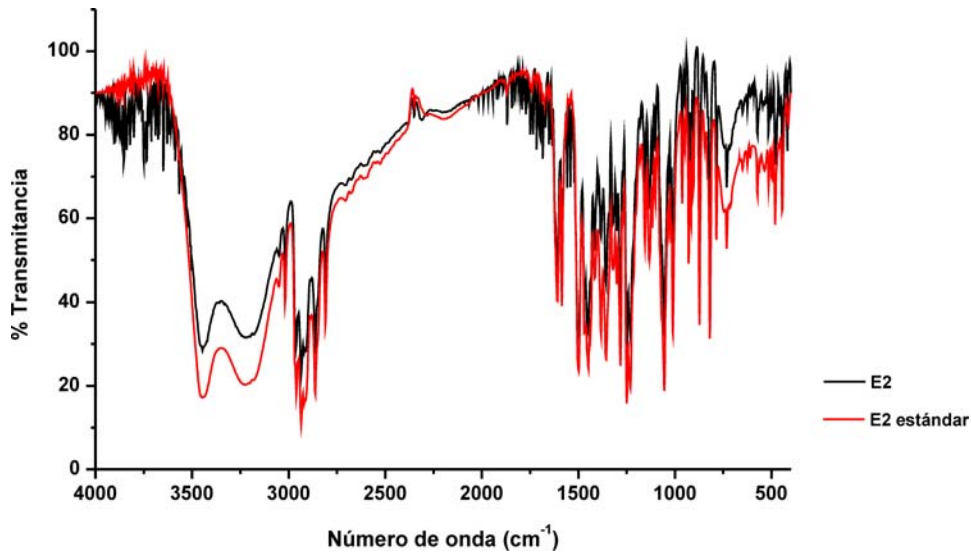


Figura 2.8: Espectro IR de E2 y E2 estándar.

El punto de fusión según especificaciones de la Farmacopea de EEUU debe estar entre 173.0 – 179.0 °C (US Pharmacopeia 30, 2007a). El resultado para el E2 fue 177.0 °C y para el E2 estándar 179.0 °C, por lo tanto ambas drogas cumplieron con el requerimiento.

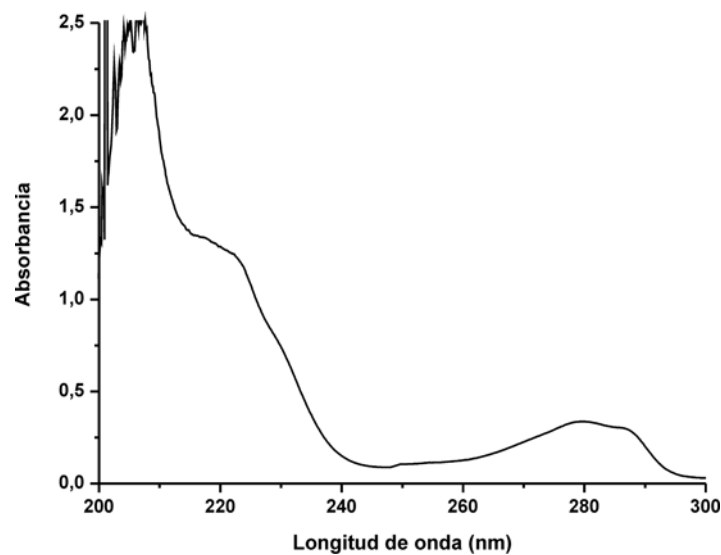


Figura 2.9: Espectro UV de una solución de E2 de 50.0 ppm en mezcla etanol:PBS.

Se obtuvo el espectro UV de una solución de E2 a un nivel de concentración de 50.0 ppm en una mezcla de etanol:PBS (40:60), preparada por dilución a partir de una solución madre de la droga. En la Figura 2.9 se muestra el espectro UV. La finalidad de este ensayo fue chequear la longitud de onda de máxima absorción recomendada por la Farmacopea de EEUU (US Pharmacopeia 30, 2007a). Si bien la señal presentó máximos de absorción a 215-220 nm, esta zona está cercana a las longitudes de onda

donde la señal presentó mayor ruido y donde incluso una solución de la mezcla etanol:PBS conteniendo QUI presentó máximos de absorción. De este modo la longitud de onda que se seleccionó para el desarrollo del método de cuantificación, 280 nm, coincidió con la recomendada por la Farmacopea de EEUU. En esta longitud de onda la absorción de la droga fue suficiente y además selectiva.

La *linealidad* de un procedimiento analítico es su habilidad (dentro de un rango) de obtener resultados que estén directamente relacionados con la concentración del analito. El *rango* es un intervalo de concentraciones entre las cuales el procedimiento ha demostrado un aceptable nivel de precisión, exactitud y linealidad. Este rango generalmente se deriva de los estudios de linealidad (ICH, 2005).

Luego de analizar las soluciones de calibrado en el sistema cromatográfico, se construyó la gráfica de calibración (Figura 2.10) colocando en el eje de las ordenadas las áreas de los picos de E2 y en el eje de las abscisas las concentraciones. Los datos experimentales se ajustaron con un modelo lineal mediante el método de cuadrados mínimos. La ecuación de la recta de ajuste fue: $y = a + b * x$, donde y es la respuesta correspondiente al área del pico de E2, a es la ordenada al origen, b es la pendiente y x la concentración de analito expresada en ppm.

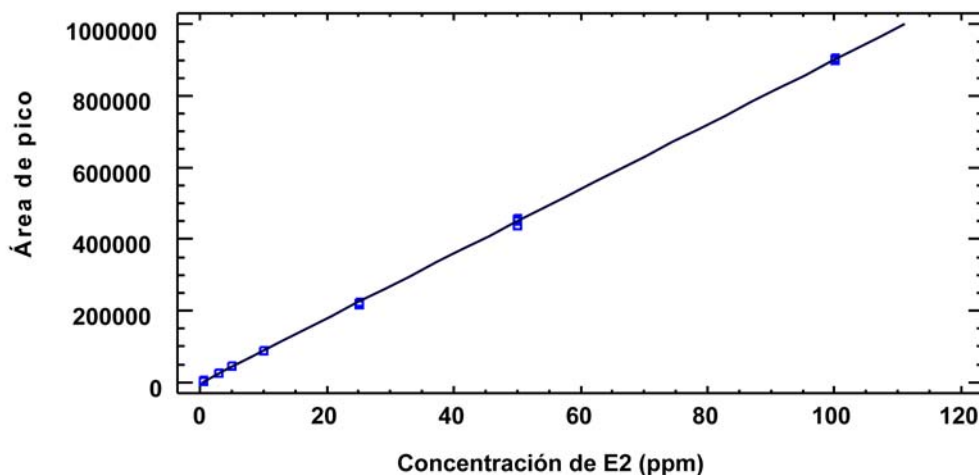


Figura 2.10: Recta de ajuste de los datos experimentales.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para verificar la linealidad del método en el rango estudiado. Los parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3: Parámetros estadísticos obtenidos del ajuste de las variables concentración de analito y área de pico.

Parámetros de ajuste	Valor
Ordenada al origen	$(-3 \pm 1) \times 10^3$
Pendiente	$(903 \pm 3) \times 10^1$
R ²	0.9998
Coefficiente de correlación	0.9999
Valor de probabilidad del modelo	0.0000
Valor de probabilidad de la falta de ajuste	0.6011

Los parámetros ordenada al origen y pendiente se presentan con su correspondiente incertidumbre.

El estadístico R² indica que el modelo explica un 99.98 % de la variabilidad en la respuesta. El coeficiente de correlación es igual a 0.9999, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. Dado que el valor de probabilidad del modelo es inferior a 0.05, se puede concluir que existe una relación estadísticamente significativa entre el área de pico y la concentración de E2 para un nivel de confianza del 95 %.

Para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados, se realizó un test de falta de ajuste. El test se realiza comparando la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre las observaciones. Dado que el valor de probabilidad de la falta de ajuste es superior a 0.05, se puede decir que el modelo lineal seleccionado es apropiado para describir el comportamiento de los datos observados con un 95 % de confianza.

La *precisión* expresa el grado de concordancia entre los valores de una serie de medidas, y puede considerarse en tres niveles: repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad (ICH, 2005).

Para determinar la precisión del sistema se analizaron por sextuplicado 3 niveles de concentración. Los coeficientes de variación (CV %) fueron aceptables e iguales a: 1.87 %, 1.71 % y 0.81 %, para 3.0, 10.0 y 50.0 ppm, respectivamente.

La precisión intermedia se analizó para estudiar la variabilidad del método entre diferentes días, a un nivel de concentración intermedio de E2 de 25.0 ppm. El CV % obtenido fue 2.92 %, y fue aceptable. La repetibilidad que evalúa el desempeño del método sobre una misma muestra analizada en las mismas condiciones, también se examinó al nivel de concentración intermedio de E2 de 25.0 ppm. El CV % fue aceptable e igual a 1.05 %.

3. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE SEPARACIÓN DE EPIDERMIS A PARTIR DE UN FRAGMENTO DE PIEL COMPLETA

3.1 Introducción y objetivos

Algunos autores que han realizado estudios de permeabilidad transdermal con E2 en fragmentos de piel completa o fragmentos de piel sin EPD concluyeron que los parámetros de permeabilidad fueron mayores en los fragmentos sin EPD (Galey y col., 1976; Chen y col., 1990). Lo cual refleja una vez más que la EPD, y en particular el estrato corneo, es la barrera limitante al paso de la mayoría de las sustancias. De modo que la EPD actúa como barrera restrictiva para la difusión de E2.

Así la permeabilidad de la EPD puede ser considerada como aquella de la piel humana completa.

Como se mencionó en el capítulo Desarrollo Teórico, algunos de los métodos para separar EPD a partir de un fragmento de piel completa implican el tratamiento de la misma con:

- Solución de bromuro de sodio 2 mol L^{-1} durante 24 horas a T ambiente (Scott y col., 1986).
- Agua a $60.0 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1.0 o 2.0 minutos (Scott y col., 1987; Cross y col., 2003).
- Solución de tripsina 0.1 \% p v^{-1} a $60.0 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2.0 minutos (Rana y col., 2005).

Scott y col. (1986 y 1987) que han trabajado con 2 de los métodos, concluyeron que los fragmentos obtenidos mediante el primer tratamiento o el segundo mantienen las mismas propiedades de permeabilidad independientemente del método utilizado. Además estos autores, recomiendan almacenar los fragmentos de EPD a $4.0 \text{ }^\circ\text{C}$, envueltos en papel aluminio, y utilizarlos dentro de 7 días. Durante este tiempo y en estas condiciones de almacenamiento se mantienen las propiedades de permeabilidad. Otros autores (Rana y col., 2005) preparan los fragmentos a utilizar en el ensayo de absorción el mismo día que van a ser utilizados.

Por otra parte es importante tener en cuenta que, cuando se trabaja con soluciones a $60.0 \text{ }^\circ\text{C}$, pueden variar los tiempos de remojo (30, 45 o 60 segundos) según el autor; no obstante los riesgos de daño físico a la piel son menores a tiempos cortos es también más difícil la separación de la EPD. Swarbrick y col. (1982) reportaron que no

hubo diferencias en la permeabilidad entre fragmentos inmersos por 1.0 o 2.0 minutos; de este modo son aconsejables tiempos más largos que facilitan la separación.

Una vez que se han obtenido los fragmentos es importante evaluar la integridad de los mismos, para asegurar que la función barrera del estrato corneo se mantiene intacta. Algunos de los métodos reportados implican determinar la velocidad de penetración de agua tritiada o la transmisión de vapor de agua.

El objetivo es seleccionar un método para separar EPD a partir de un fragmento de piel y determinar la integridad de los mismos.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Reactivos y materiales

La enzima tripsina tipo II-S de páncreas porcino fue de la marca Sigma Aldrich. El reactivo cloruro de calcio anhidro (CaCl_2) fue de la marca Anedra.

La solución reguladora buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4) fue preparada de la misma forma que en la sección 2.2.2 *Reactivos y materiales* del inciso 2. *Caracterización del estradiol y desarrollo de un método de cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución*, de este capítulo.

Los fragmentos de piel animal (cerdo y conejo) fueron obtenidos de un matadero privado local.

Los fragmentos de piel abdominal humana fueron obtenidos directamente de una abdominoplastia previo consentimiento del paciente.

3.2.2 Separación de epidermis

Se evaluaron 2 metodologías de las propuestas en la bibliografía. Inmersión en agua a 60.0 °C durante 2.0 minutos y en solución de tripsina 0.1 % p v⁻¹ a 60.0 °C durante 2.0 minutos. Esta solución se preparó por disolución de la droga sólida en un volumen determinado de PBS en el mismo momento en que se utilizó. El fragmento luego de ser tratado se colocó sobre una superficie de poliestireno expandido, se extendió y se fijó a la superficie con alfileres. La EPD fue separada de la dermis con la ayuda de un bisturí y de pinzas.

3.2.3 Determinación de la transmisión de vapor de agua

El sistema y las condiciones de trabajo se seleccionaron siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM E 96/E 96M, 2005). El fragmento de EPD se colocó sobre la boca de un recipiente que contiene un desecante. El desecante fue CaCl_2 , el cual se agregó en la base del recipiente hasta una altura de 6.0 mm respecto del borde superior. Luego el recipiente se introdujo en una cámara de ensayo que se dispuso en un ambiente regulado por las siguientes características: humedad relativa 50.0 % y T 25.0 °C. El recipiente con el fragmento se pesó periódicamente. Se graficó el cambio de masa en función del tiempo. Los datos experimentales se ajustaron con un modelo lineal (cuando una línea recta se ajusta adecuadamente a la unión de al menos 4 puntos, existe una situación nominalmente estable, representando la pendiente de la línea recta la transmisión de vapor de agua).

3.3 Resultados y discusión

Se comenzó evaluando la inmersión en agua, en pieles de animales (cerdo y conejo). En ambos casos, se trató de fragmentos de piel obtenidos de las orejas.

En el caso de las orejas de conejo fue muy difícil la manipulación de las mismas, y no se pudo aislar una sección lo suficientemente grande como para pensar en que puedan ser evaluadas en un ensayo de difusión.

Para los fragmentos de piel de cerdo la manipulación fue más fácil; pero, se debió retirar el pelo con la ayuda de una hoja de afeitar. Este paso se debe realizar con cuidado para no dañar la EPD. Dado que fue más fácil el trabajo con fragmentos de piel de cerdo se evaluó también el tratamiento enzimático de los mismos. Con esta metodología el fragmento quedó menos tenso que con el tratamiento con agua a 60.0 °C, lo que facilitó la separación de la EPD.

Se decidió entonces utilizar el tratamiento con solución acuosa de tripsina en los fragmentos de piel humana. Se trabajó con 2 fragmentos provenientes de 2 pacientes de sexo femenino. Paciente A de 32 años y paciente B de 47 años. En ambos casos una vez obtenido el fragmento se procedió a la separación del tejido subcutáneo excedente. Se fraccionó en secciones de un tamaño adecuado para la inmersión en la solución enzimática, se envolvieron en papel aluminio y se almacenaron a -20.0 °C (por un período no mayor a 15 días). El almacenamiento fraccionado evitó el posible deterioro por congelamiento y descongelamiento. De esta manera el día anterior al

ensayo de difusión se retiró un fragmento, se dejó reposar a T ambiente un tiempo suficiente para que se descongele y luego se procedió a la inmersión en la solución de la enzima. El fragmento de EPD obtenido se lavó 3 veces con PBS para eliminar el resto de tripsina que pudiera haber quedado en el tejido y se dejó en remojo en la mezcla etanol:PBS durante toda la noche. La Figura 2.11 muestra un fragmento de piel humana completa luego de su inmersión en la solución de tripsina y dispuesto para la separación de la capa epidérmica. La Figura 2.12 muestra un fragmento de EPD luego de la separación y sumergido en la mezcla etanol:PBS.

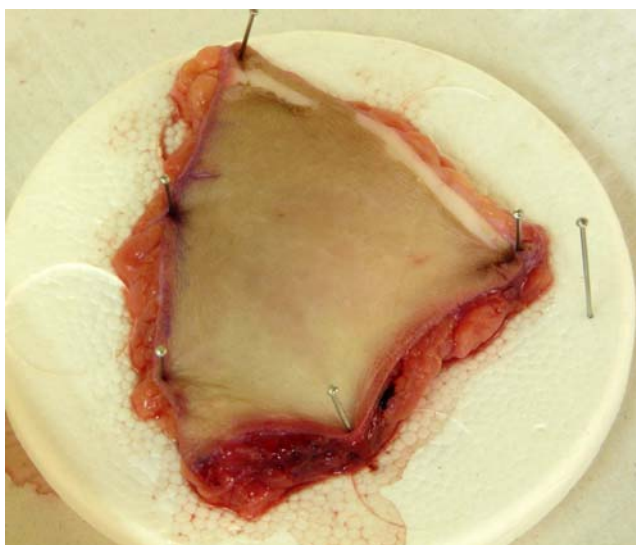


Figura 2.11: Fragmento de piel humana completa.



Figura 2.12: Fragmento de EPD humana.

El valor de transmisión de vapor de agua de la piel normal es de $8.0 - 21.0 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ (Cárcamo Gatica, 2005). El valor obtenido en esta tesis fue $8.09 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ y estuvo de

acuerdo a lo reportado en la bibliografía. Este ensayo permitió establecer que los fragmentos de EPD obtenidos mediante separación con una solución de enzima mantuvieron su integridad y función barrera. La Figura 2.13 muestra un fragmento de EPD dispuesto en el recipiente utilizado para determinar la trasmisión de vapor de agua.



Figura 2.13: Recipiente con CaCl_2 y EPD humana utilizado para determinar la trasmisión de vapor de agua.

4. CONCLUSIONES

- Se identificó el polímero QUI mediante el uso de espectroscopia de IR. Se determinó su GD mediante espectroscopia de RMN y su masa molecular viscosimétrica a través de la ecuación de Mark-Houwink utilizando el valor de viscosidad intrínseca.
- Se identificó la droga E2 mediante el uso de espectroscopia de IR y determinación del punto de fusión y comparación con un estándar. Se desarrolló un método de cuantificación de E2 mediante cromatografía líquida de alta resolución. El proceso de validación permitió concluir que el método analítico desarrollado puede aplicarse en la determinación de E2 en muestras de mezcla etanol:PBS, debido a los resultados satisfactorios obtenidos para linealidad, rango y precisión.
- La aplicación de 2 metodologías de separación de EPD en pieles animales permitió seleccionar una de ellas para su uso en la obtención de EPD humana a partir de un fragmento de piel completa. Siendo la metodología seleccionada, el tratamiento con solución de tripsina a $60.0\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2.0 minutos. Se realizaron ensayos para

verificar que los fragmentos obtenidos mantenían su integridad, y asegurar así su uso en los ensayos de difusión.

CAPÍTULO 3

1. CELDA VERTICAL DE FRANZ: ENSAYOS DE ABSORCIÓN *IN VITRO* DE ESTRADIOL

1.1 Introducción y objetivos

Una de las metodologías más utilizada para el tratamiento de los datos experimentales en estudios de absorción de moléculas a través de una membrana homogénea emplea la primera y segunda ley de Fick (Barry, 1983). No obstante esta aplicación, resulta una simplificación en ciertas ocasiones excesiva, de procesos más complejos que puedan estar ocurriendo; esto es no tener en cuenta fenómenos tales como formación de uniones entre moléculas o metabolismo.

Se puede hablar del concepto de:

- Flujo: cuando un sistema no está en el equilibrio, se mueve hacia el equilibrio.
- Velocidad: mientras más lejos esté del equilibrio más rápido se mueve hacia él.

La primera ley, (Ecuación 3.1) indica que el flujo J de un compuesto por unidad de longitud recorrida Δx es proporcional al gradiente de concentración ΔC , mientras que el D permanece constante como suposición del modelo. El signo negativo indica que el flujo neto transcurre en dirección de mayor a menor concentración.

$$\text{Ecuación 3.1} \quad J = -D \cdot \frac{\Delta C}{\Delta x}$$

Esta ecuación se cumple para procesos mediados por difusión en medios isotrópicos bajo condiciones de EE, es decir, un gradiente de concentración constante en el interior de la membrana. En un proceso difusivo a través de una membrana de espesor h que separa 2 compartimentos que contienen 2 soluciones de un soluto de concentraciones C_1 y C_2 , respectivamente, en el EE se establece un gradiente de concentración constante en el interior de la membrana (Figura 3.1).

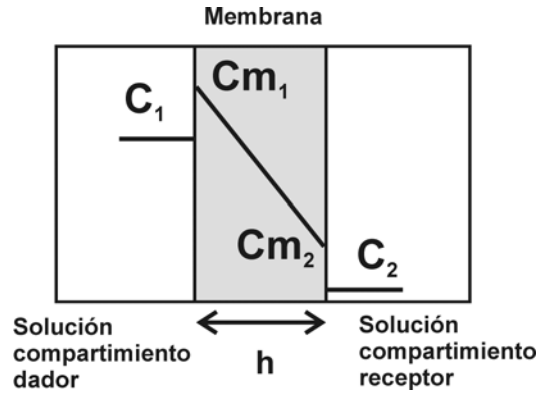


Figura 3.1: Perfil de concentraciones a través de una membrana en el EE.

Las concentraciones del soluto en los bordes de la membrana, no son iguales que las concentraciones de las soluciones adyacentes a la misma; debido a que se produce proceso de partición del soluto entre la membrana y la solución. C_{m1} y C_{m2} son las concentraciones del soluto en las interfases membrana - solución. Aplicando la primera ley de Fick a este ejemplo se obtiene:

Ecuación 3.2
$$J = D \cdot \frac{C_{m1} - C_{m2}}{h}$$

En los ensayos de difusión, los valores que generalmente se determinan en forma experimental son C_1 y C_2 , es decir, las concentraciones de las soluciones en contacto con la membrana, en lugar de C_{m1} y C_{m2} . Por otra parte, en la mayoría de los casos, las capas superficiales de la membrana se equilibran rápidamente con las fases adyacentes. Este equilibrio puede expresarse en términos de distribución o de coeficiente de partición, mediante ecuaciones similares a las mencionadas en el capítulo Desarrollo Teórico:

Ecuación 3.3
$$C_{m1} = C_1 \cdot P_1$$

Ecuación 3.4
$$C_{m2} = C_2 \cdot P_2$$

En las que P_1 y P_2 son los coeficientes de partición del soluto entre la membrana y las soluciones adyacentes. Sustituyendo en la Ecuación 3.2 y considerando que las soluciones de ambos compartimentos son similares y la membrana homogénea, entonces $P_1 \approx P_2 \approx P$, se obtiene:

Ecuación 3.5
$$J = D \cdot \frac{(C_1 - C_2) \cdot P}{h}$$

En los experimentos de difusión se acepta, con fines prácticos, que cuando la concentración del soluto en el compartimento receptor no alcanza el 10% de la

solubilidad del soluto en ese medio; se mantienen condiciones de gradiente máximo y EE (Barry, 1983). Si se cumple esta condición C_2 puede considerarse despreciable, y la Ecuación 3.5, puede expresarse como:

Ecuación 3.6
$$J = \frac{D \cdot P \cdot C_1}{h}$$

En EE, la cantidad de soluto que atraviesa la membrana por unidad de tiempo es constante, lo que equivale a considerar que el fenómeno de la difusión se desarrolla de acuerdo con un proceso de orden cero; al que le corresponde un Kp que es independiente de la concentración en el compartimento dador (Flynn y col., 1974).

Ecuación 3.7
$$Kp = \frac{J}{C_1} = \frac{D \cdot P}{h}$$

El flujo en EE y el Kp son determinados a partir de experimentos *in vitro* en los cuales la concentración de la solución donante se mantiene (más o menos) constante (condiciones de dosis infinitas) mientras la solución receptora proporciona condiciones *de vertedero* (del inglés, *sink condition*); por consiguiente y como se mencionó su concentración puede considerarse despreciable. En un gráfico de cantidad acumulada de soluto por unidad de área en función del tiempo (Figura 3.2) el período de tiempo necesario para que se alcance el EE se relaciona con el tiempo de latencia, t_0 . El tiempo de latencia se puede determinar gráficamente mediante extrapolación al eje de abscisas del tramo recto de la curva, el valor de la pendiente en el tramo recto representa el flujo (Kielhorn y col., 2005).

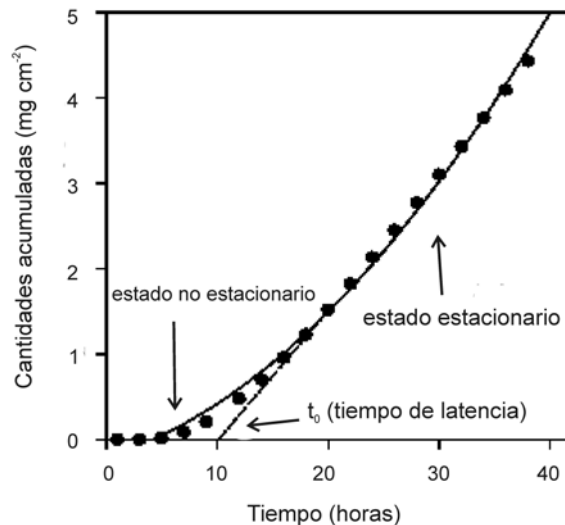


Figura 3.2: Perfil representativo de las cantidades acumuladas de soluto en el compartimento receptor en función del tiempo (figura extraída de Kielhorn y col., 2005).

Para asegurar que se ha establecido el EE es necesario dejar transcurrir aproximadamente un tiempo igual a 2.7 veces el tiempo latencia (Barry, 1983). Otros autores (Shah y col., 1994) afirman que con tiempos de experimentación iguales a 6 veces el tiempo de latencia puede alcanzarse el 100 % del flujo máximo que se consigue en EE y con 3 veces el tiempo de latencia se logra el 97 %. Si la difusión se extiende menos que 3 veces el tiempo de latencia entonces el D sería sobreestimado. La necesidad de tiempos de experimentación tan largos puede significar un problema en estudios de difusión con membranas biológicas y moléculas con D muy bajos ($D=10^{-6}$ - 10^{-13} cm² seg⁻¹), ya que durante el ensayo puede disminuir la viabilidad de la membrana. Este inconveniente puede evitarse con el uso de membranas sintéticas. En la Figura 3.3 se muestran en forma gráfica los conceptos de dosis infinita y finita. En la Figura 3.3-a se observa como una dosis infinita permite alcanzar y mantener una velocidad máxima de absorción (flujo), mientras que en condiciones finitas la máxima velocidad de absorción puede ser alcanzada por algún tiempo, pero no mantenida o puede no ser alcanzada (OECD, 2004a). En la Figura 3.3-b se observa para dosis infinita el establecimiento del EE (porción recta de la gráfica) no así para dosis finita.

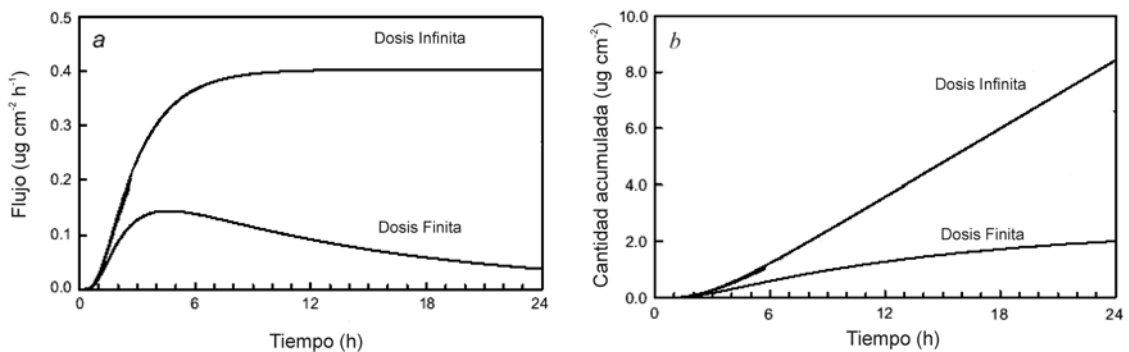


Figura 3.3: Flujo y cantidad acumulada en función del tiempo para condiciones de dosis infinita y finita (figura extraída de Kielhorn y col., 2005).

La segunda ley de Fick permite predecir el flujo de compuestos tanto en el estado no estacionario como en el estacionario. La cantidad de fármaco (Q) que aparece en el compartimiento receptor a un tiempo (t) viene dada mediante la siguiente expresión:

$$\text{Ecuación 3.8} \quad Q(t) = A \cdot P \cdot h \cdot C \left[D \cdot \frac{t}{h^2} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \cdot e^{\left(\frac{-D \cdot n^2 \cdot \pi^2 \cdot t}{h^2} \right)} \right]$$

Donde A es el área de difusión, P es el coeficiente de partición del fármaco entre el vehículo y la membrana, h el espesor de la membrana, C la concentración inicial de principio activo en el vehículo y D es el coeficiente de difusión del fármaco en la

membrana. En la Ecuación 3.8 cuando el tiempo tiende a infinito, se obtiene una expresión que define una línea recta y corresponde al EE.

$$\text{Ecuación 3.9} \quad Q(t) = A \cdot P \cdot h \cdot C \left[D \cdot \frac{t}{h^2} - \frac{1}{6} \right]$$

A partir de la ecuación anterior, con el valor del tiempo de latencia determinado a partir de la gráfica y conociendo el espesor, es posible calcular el D , mediante

$$\text{Ecuación 3.10} \quad t_0 = \frac{h^2}{6 \cdot D}$$

Teniendo en cuenta estos aspectos teóricos y conceptos básicos de difusión, y las cuestiones experimentales expuestas en el capítulo Desarrollo Teórico para ensayos de difusión en celda de Franz y optimización de membranas de QUI mediante herramientas quimiométricas; se propuso como objetivo:

- Realizar ensayos de absorción de E2 en celda de Franz utilizando EPD y evaluar el flujo, a partir de las gráficas de cantidad acumulada en función del tiempo.
- Diseñar mediante la aplicación de un diseño experimental estadístico una membrana de QUI que permita obtener en un ensayo de absorción para E2, el mismo valor de flujo que la EPD.
- Caracterizar las membranas de QUI utilizadas en los ensayos de absorción.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Equipamiento y programas de computación

Todas las experiencias de absorción se realizaron en una celda vertical de Franz marca PermeGear Inc., con un área de difusión de 1.77 cm^2 y 12.0 mL de volumen de compartimiento receptor.

Todas las experiencias del método de cuantificación de E2 se realizaron en un equipo ternario de cromatografía líquida de alta resolución Shimadzu LC-10 con detector UV de arreglo de diodos.

Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro Shimadzu FTIR-8201 PC.

Las determinaciones de sodio fueron realizadas en un espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 800.

Las experiencias de RMN pulsada (RMNp) se realizaron en un analizador de protones Minispec PC 120 Bruker, operando con un cabezal protónico Bruker a la frecuencia de resonancia de 20 Mhz.

La obtención de micrografías se realizó mediante observación con un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-35C equipado con un sistema de adquisición de imágenes digitales SemAfore. La observación se realizó bajo el modo de imágenes de electrones secundarios utilizando una tensión de aceleración de 20.0 kV.

Los diseños experimentales y el análisis de los datos se realizaron con el programa estadístico Design-Expert trial version 7.0.0.

1.2.2 Reactivos y materiales

El QUI fue comprado en Polymar Ciencia y Nutrición S.A. (Brasil). El E2 de pureza 99% y el TPP fueron de la marca Sigma Aldrich.

El ácido acético y el etanol fueron PA >99.5%, el ácido nítrico 65.0 %, el agua oxigenada solución al 30.0 % y el ácido clorhídrico 37.0 % fueron también PA y todos de la marca Cicarelli. El acetonitrilo fue de calidad cromatografía líquida (Merck).

El agua que se utilizó para las disoluciones y las diluciones fue de calidad ultrapura.

La solución reguladora buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4) fue preparada de la misma forma que en la sección 2.2.2 *Reactivos y materiales* del inciso 2. *Caracterización del estradiol y desarrollo de un método de cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución*, Capítulo 2.

1.2.3 Preparación y entrecruzamiento de membranas de quitosan

Las soluciones de QUI a distintas concentraciones fueron preparadas por disolución de la droga en un volumen determinado de solución acuosa de ácido acético 2.0 mol L⁻¹. Cada solución se centrifugó a 4000 rpm durante 30.0 minutos para remover las burbujas de aire y el material no disuelto. Una porción de la solución centrifugada se vertió en una placa de Petri de policarbonato, se dejó evaporar el solvente a T ambiente hasta peso constante; y las membranas secas se almacenaron en bolsas de polietileno hasta su uso. El día previo al ensayo de absorción las membranas fueron cortadas en secciones circulares de 5.0 cm² y entrecruzadas mediante inmersión en 10.0 mL de una solución de TPP durante diferentes intervalos de tiempo. Seguidamente, las membranas se lavaron 3 veces con agua para remover el exceso

de TPP y se colocaron en la celda de Franz en contacto con la mezcla etanol:PBS durante toda la noche. Todas las membranas entrecruzadas mantuvieron su flexibilidad e integridad en la mezcla etanol:PBS.

1.2.4 Caracterización de las membranas de quitosan

Las membranas fueron utilizadas para ensayos de: absorción de E2, contenido de agua, espectroscopia de absorción atómica, espectroscopia de IR y de RMNp y observación por microscopía electrónica de barrido.

1.2.4.1 Ensayos de absorción de estradiol en celda de Franz

En los ensayos de absorción se utilizaron fragmentos de EPD obtenidos según la metodología descrita en la sección 3.2.2 *Separación de epidermis* del inciso 3. *Selección de un método de separación de epidermis a partir de un fragmento de piel completa*, Capítulo 2, y membranas de QUI entrecruzadas según el procedimiento descrito en el punto anterior.

El medio utilizado en los ensayos de absorción consistió de una solución etanol:PBS (40:60). El fluido del compartimiento receptor fue mantenido termostáticamente a 37.0 °C y bajo agitación moderada. Primeramente, una membrana (EPD o de QUI) fue puesta entre los compartimientos donante y receptor, y se dejó toda la noche permitiendo se equilibre con el medio de absorción. Al día siguiente el fluido del compartimiento donante fue cambiado por una solución de E2 de concentración 500.0 µg mL⁻¹. La solución donante se preparó cada día de uso, por disolución de la droga sólida en un volumen determinado de la mezcla de etanol:PBS (40:60). Una vez que se dio comienzo al ensayo de absorción, alícuotas de 200.0 µL fueron retiradas del compartimiento receptor y cuantificadas mediante el método desarrollado en la sección 2.2.4 *Desarrollo de un método de cuantificación de estradiol mediante cromatografía líquida de alta resolución*, del Capítulo 2. Un mismo volumen de medio fresco fue agregado para mantener el volumen constante. El compartimiento donante se cubrió para evitar la evaporación de la solución de E2.

El flujo de E2 fue calculado de la pendiente de la porción lineal de la gráfica de cantidad acumulada difundida por unidad de área en función del tiempo.

1.2.4.2 Evaluación del contenido de agua

Las membranas entrecruzadas fueron separadas en 2 grupos. Grupo 1, estas membranas fueron puestas en un desecador con silica gel hasta peso constante, y luego se ubicaron en recipientes herméticos que contenían 10.0 mL de la mezcla etanol:PBS (40:60). A determinados tiempos las membranas se retiraron; el exceso de agua en la superficie de la membrana se removió cuidadosamente con papel tissue, y luego se pesaron. El Grupo 2, consistió de membranas que directamente luego del EC se colocaron en los recipientes con la mezcla etanol:PBS; estas membranas se pesaron a determinados tiempos de la misma manera que las membranas del primer grupo. Este procedimiento se repitió hasta que las membranas (de ambos grupos) alcanzaron un peso constante. La relación de hinchamiento (SR del inglés, *swelling ratio*) y el contenido de agua en el equilibrio (EWC del inglés, *equilibrium water content*), se calcularon según las siguientes ecuaciones:

Ecuación 3.11

$$SR(\%) = \left(\frac{\text{peso en el estado hinchado a un dado tiempo} - \text{peso membrana seca}}{\text{peso membrana seca}} \right) \cdot 100$$

Ecuación 3.12

$$EWC(\%) = \left(\frac{\text{peso en el estado hinchado en el equilibrio} - \text{peso membrana seca}}{\text{peso en el estado hinchado en el equilibrio}} \right) \cdot 100$$

1.2.4.3 Ensayos de espectroscopia de absorción atómica por llama para determinación de sodio

Es conveniente disponer de una técnica que sea capaz de realizar un seguimiento de la reacción de EC. Para este trabajo de tesis se decidió utilizar para tal fin, la determinación de sodio (Na) (Rana y col., 2004 y 2005). La preparación de las membranas para la determinación de Na se realizó de acuerdo al Método 200.3 para Procedimiento de preparación de muestras para la determinación espectroquímica de elementos totales recuperables en tejidos biológicos (Mc Daniel, 1991). Brevemente la secuencia de preparación de la muestra fue:

1. Se colocó la membrana en un erlenmeyer de 125.0 mL, se agregaron 10.0 mL de ácido nítrico y se calentó sobre una manta calefactora hasta la aparición de vapor de color marrón. Se dejó enfriar. Se repitió este paso 2 veces más pero con la adición de 5.0 y 2.0 mL de ácido nítrico, respectivamente. Luego del 3 paso se calentó la solución hasta la reducción de volumen aproximadamente a 5.0-10.0 mL. Se dejó enfriar.

2. Se agregaron 2.0 mL de agua oxigenada solución al 30.0 %, se calentó la solución hasta la reducción de volumen aproximadamente a 5.0-10.0 mL. Se dejó enfriar.

3. Se agregaron 2.0 mL de ácido clorhídrico, se calentó la solución hasta la reducción de volumen aproximadamente a 5.0 mL, se dejó enfriar y se transfirió a un matraz de 25.0 mL. Se llevó a volumen con agua calidad ultrapura.

Se construyó la gráfica de calibración con patrones certificados y los datos se ajustaron con un modelo lineal mediante el método de cuadrados mínimos, en el rango de concentraciones de 0.01 a 1.0 ppm, siendo éstas las condiciones estándares para Na en ensayos de absorción atómica recomendadas por el fabricante del equipo.

El valor de Na determinado se expresó en microgramos por membrana ($\mu\text{g mg}^{-1}$) y se determinó en: membranas sin EC, recientemente entrecruzadas y membranas que alcanzaron el equilibrio del contenido de agua.

1.2.4.4 Caracterización por espectroscopia infrarroja

Membranas sin EC y entrecruzadas fueron limadas, de modo de obtener un polvo que se secó en estufa y se utilizó para preparar una pastilla con bromuro de potasio. El espectro se obtuvo en la región de frecuencia de 4000-400 cm^{-1} .

1.2.4.5 Determinaciones de movilidad molecular con espectroscopia de resonancia magnética nuclear pulsada

Se realizaron determinaciones de tiempos de relajación espín-espín protónico T_2 (ms), de segundo momento M_2 (ms^{-2}) y de la intensidad de la señal A (volts) en membranas con distintos tiempos de EC a una T de 23.0 °C con ^1H RMNp. Se utilizó la técnica de espín-eco Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), cuya secuencia fue: pulso de 90° , τ , pulso de 180° , cambio de fase de 90° , 2τ , pulso de 180° , cambio de fase de 90° , 2τ ; con un valor de 2τ de 38 μs . Para cada curva se adquirieron 39 puntos de datos, cada punto es el promedio de 49 escanes. El ajuste de la señal se realizó con la siguiente ecuación (Kumagai y col., 2002)

$$\text{Ecuación 3.13 } A(t) = A_{11}e^{\left(\frac{-a_1^2 t^2}{2}\right)} \frac{\sin b_1 t}{b_1 t} + A_{12}e^{\left(\frac{-a_2^2 t^2}{2}\right)} \frac{\sin b_2 t}{b_2 t} + A_2 e^{\left(\frac{-t}{T_{22}}\right)^{n_2}} + A_3 e^{\left(\frac{-t}{T_{23}}\right)^{n_3}}$$

$A(t)$ es la intensidad de señal total. Los parámetros a_i , b_i , T_{2i} , A_{1i} y A_i se obtuvieron del ajuste de los con los datos experimentales con la Ecuación 3.13. El parámetro a es la

desviación estándar de la forma de línea gaussiana que convolucionada con el espectro del protón rígido y el parámetro b es el ancho mitad de la correspondiente transformada de Fourier del espectro de RMN (van den Dries y col., 1998; van den Dries y col., 2000). Los parámetros T_{22} y T_{23} son los tiempos de relajación espín-espín protónico de las 2 fracciones de protones móviles, la *menos móvil* y la *más móvil*, respectivamente (Ruan y Chen, 1998). La amplitud de señal de las fracciones rígidas (A_{rj}) y de las móviles (A_j) se obtiene a tiempo igual a cero.

El M_2 se calculó mediante la siguiente ecuación (Abragam, 1961)

$$\text{Ecuación 3.14} \quad M_2 = a^2 + \frac{b^2}{3}$$

1.2.4.6 Observación por microscopía electrónica de barrido

Se realizaron observaciones de las superficies y de cortes transversales de membranas preparadas con soluciones de QUI de distintas concentraciones y entrecruzadas con TPP (5.0 % p v⁻¹ durante 15.0 minutos). Para la observación transversal, las membranas fueron sumergidas en aire líquido y fracturadas. Distintos fragmentos fueron adheridos con pasta de grafito sobre portamuestras metálico. A continuación, todos los preparados se recubrieron con oro empleando un Sistema de Deposición Combinado metal/carbono, SPI SUPPLIES, 12157-AX, operando con atmósfera de Argón a 18.0 mA y durante 80.0 segundos, en 2 sesiones de 40.0 segundos. Las muestras se examinaron con un Microscopio Electrónico de Barrido.

1.3 Resultados y discusión

1.3.1 Ensayos de absorción de estradiol en celda de Franz utilizando epidermis

Para poder determinar el flujo de E2 en EPD se prepararon fragmentos de EPD a partir de la piel completa de 2 mujeres, Paciente A y Paciente B. Una vez obtenidos los fragmentos se utilizaron en los ensayos de absorción en la celda de Franz. Con la fracción de piel de la Paciente A se pudieron obtener 3 fragmentos de EPD y realizar 3 ensayos, con la piel de la Paciente B solo 1 ensayo. Las gráficas de cantidad de E2 acumulado en el compartimiento receptor por unidad de área en función del tiempo para cada paciente se muestran en la Figura 3.4.

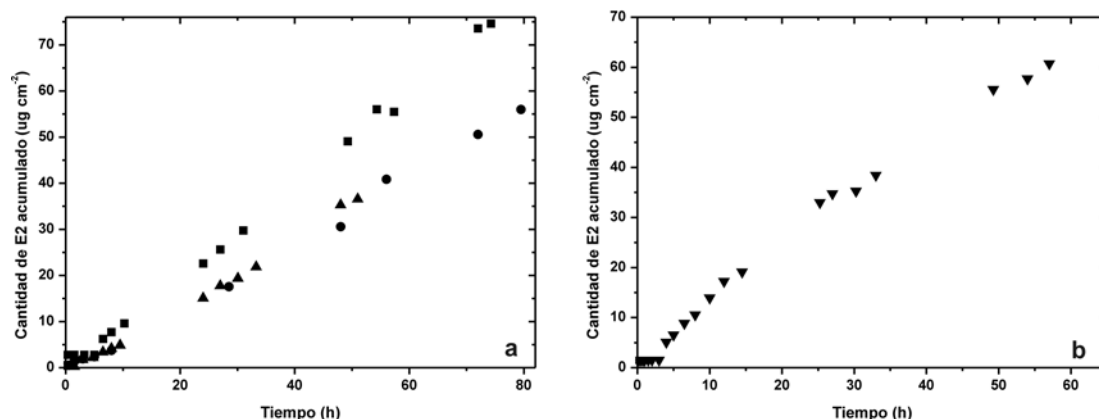


Figura 3.4: Cantidad de E2 acumulado en función del tiempo para pacientes: a) A y b) B.

No obstante ser la piel una membrana heterogénea, las leyes de la difusión pueden utilizarse para describir el proceso de absorción transdermal. Además, los estudios de absorción consisten en la aplicación durante un largo periodo de tiempo de un vehículo que contiene la droga, de modo que se asume que se alcanzan las condiciones de EE y por lo tanto pueden emplearse las leyes de Fick (Barry, 1983; Guy y Hadgraft, 2003). La porción recta de las gráficas en la Figura 3.4 se ajustó con un modelo lineal; la ecuación de la recta de ajuste corresponde a la Ecuación 3.9 y por lo tanto, el valor de la pendiente de la ecuación de ajuste es el valor del flujo. Con la Ecuación 3.7 se calculó el K_p . En la Tabla 3.1 se muestran los valores del flujo y del K_p calculados para los fragmentos de EPD de ambas pacientes.

Tabla 3.1: Valores de flujo y coeficientes de permeabilidad.

	Paciente A	Paciente B
Flujo ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	0.8491 (18.88 %) ^a	1.2858
Coefficiente de permeabilidad (cm h^{-1})	1.74×10^{-3} (18.74 %) ^a	2.55×10^{-3}

^a Entre paréntesis el coeficiente de variación (CV %).

Los CV % obtenidos para la paciente A están de acuerdo con los requerimientos de precisión para métodos bioanalíticos especificados por la FDA (Food and Drug Administration, 2001), CV % menor a 20. Además, teniendo en cuenta los valores de variación intralaboratorio de 6.3-111.0 %, para testosterona reportados por van de Sandt y col. (2004); los CV % obtenidos en esta tesis son aceptables. Los valores de flujo y K_p para el fragmento de la paciente B son similares a los de la paciente A. Los valores de K_p son del orden de los reportados por Johnson y col. (1995). Estos autores realizaron un trabajo donde estudiaron la absorción, en piel humana, de 6 esteroides entre los cuales estuvo el E2. Compararon exhaustivamente sus resultados

con los de otros autores y reportaron valores de K_p en el rango $0.3-6.1 \times 10^{-3} \text{ cm h}^{-1}$, similares a los obtenidos en esta tesis.

Los espesores de los fragmentos de EPD utilizados en todas las experiencias fueron determinados con un micrómetro. El promedio general obtenido fue $98 \pm 5 \mu\text{m}$ (CV % 5.0). Barry (1983) reportó para piel abdominal un espesor aproximado de EPD de $100 \mu\text{m}$; por lo tanto los valores obtenidos en esta tesis están de acuerdo a los reportados en la bibliografía.

En la Figura 3.5 se muestra la celda vertical de Franz utilizada en todos los ensayos de absorción y un fragmento de EPD luego de ser utilizado en un ensayo.

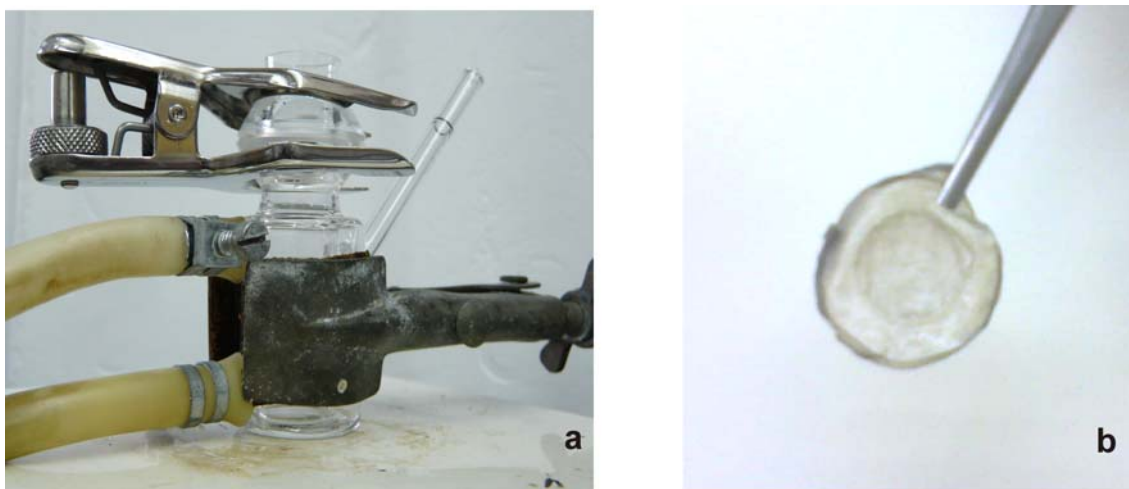


Figura 3.5: a) Celda vertical de Franz y b) Fragmento de EPD.

1.3.2 Ensayos de absorción de estradiol en celda de Franz utilizando membranas de quitosan

1.3.2.1 Selección de factores

Para determinar los factores que afectan el flujo de E2 en membranas de QUI, se realizó un diseño experimental Factorial Fraccionado que consistió en la realización de 8 experiencias de absorción. Los factores que se analizaron fueron: concentración de la solución de QUI, concentración de la solución de agente de EC (TPP), tiempo de la reacción de EC y tratamiento térmico a $60.0 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 60.0 minutos. Cada uno de estos factores se evaluó a 2 niveles. Los 3 primeros fueron factores cuantitativos y el último fue categórico, siendo sus niveles, con y sin tratamiento térmico. Por lo tanto el diseño consistió en la evaluación de 8 membranas preparadas según el procedimiento explicado en 1.2.3 *Preparación y entrecruzamiento de membranas de quitosan*, de este capítulo, de acuerdo a las combinaciones de los factores. Una vez preparadas las

membranas se utilizaron en los ensayos de absorción en la celda de Franz y se determinó el valor de flujo de E2 de la porción recta de la gráfica de cantidad de E2 acumulado en el compartimiento receptor por unidad de área en función del tiempo. Las combinaciones de los factores evaluados en el diseño y los resultados de las experiencias se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Combinaciones de los factores evaluados en el diseño y resultados experimentales.

Experiencia	Concentración de QUI (%p v ⁻¹)	Concentración de TPP (%p v ⁻¹)	Tiempo de EC (min)	Tratamiento Térmico	Flujo (ug cm ⁻² h ⁻¹)
1	3.0	10.0	15	con	5.8625
2	4.0	5.0	15	con	2.3700
3	4.0	5.0	45	sin	4.8743
4	4.0	10.0	45	con	5.2806
5	3.0	10.0	45	sin	13.2250
6	3.0	5.0	15	sin	5.8000
7	4.0	10.0	15	sin	2.5538
8	3.0	5.0	45	con	13.2570

Posteriormente, se aplicó un test ANOVA a los datos experimentales. En la Tabla 3.3 se muestran los valores de probabilidad obtenidos para cada factor, indicando entre paréntesis el tipo de influencia sobre la respuesta (positiva o negativa). Un factor se considera significativo cuando su probabilidad es menor a 0.05.

Tabla 3.3: Resultados del test ANOVA aplicado a los datos experimentales del diseño Factorial Fraccionado.

Parámetro	Valor de probabilidad
Modelo	0.0003
Concentración de QUI (% p v ⁻¹)	0.0001 (-)
Concentración de TPP (% p v ⁻¹)	0.3277
Tiempo de EC (min)	0.0002 (+)
Tratamiento térmico	0.9031

En la Figura 3.6 se muestran el gráfico de probabilidad normal y el diagrama de Pareto. Ambos permiten visualizar en forma gráfica cuales son los efectos que influyen significativamente en la variable respuesta. En celeste están representados los efectos negativos y en color naranja los positivos.

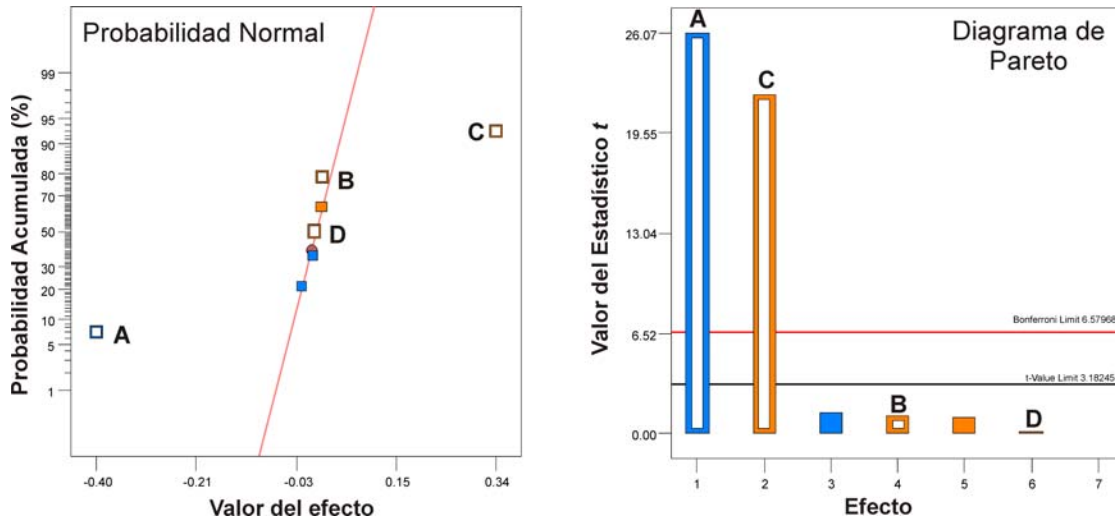


Figura 3.6: Gráfico de Probabilidad Normal y Diagrama de Pareto. A) Concentración de QUI, B) Concentración de TPP, C) Tiempo de EC y D) Tratamiento Térmico.

1.3.2.2 Análisis de los factores

El modelo mostró una desviación estándar baja (0.021, CV % = 2.88) y un coeficiente de correlación ajustado muy bueno (0.9940).

El incremento de la concentración de la solución de QUI de 3.0 a 4.0 % $p v^{-1}$ ocasionó una disminución del flujo de E2. Esto es debido a que no sólo hay un aumento del espesor de la membrana sino también un mayor entramado por el mayor número de moléculas de polímero.

El incremento en el tiempo de EC de 15.0 a 45.0 minutos aumentó el flujo de E2. Está reportado ampliamente en la bibliografía que al aumentar la densidad de EC, esto es por un mayor tiempo de EC o mayor concentración de agente de EC, la cantidad de droga difundida disminuye (Berger y col., (2004). Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que el aumento del tiempo de EC y de la concentración de TPP (aunque no afectó en forma significativa), aumentaron el flujo. Estos resultados son similares a los reportados por Rana y col. (2004 y 2005), quienes observaron que al aumentar la concentración del agente de EC aumentaba el flujo de la drogas 5-fluorouracilo e indometacina a través de membranas de QUI.

El gráfico de probabilidad normal (Figura 3.6) permite ver cuales son los factores que se alejan de un comportamiento normal, es decir influyen en forma significativa en la respuesta. El diagrama de Pareto (Figura 3.6) es un gráfico adicional mediante el cual se muestran los valores del estadístico t para cada efecto, y de esta manera se visualizan hacia la izquierda los factores con efectos significativos y hacia la derecha, aquellos que no superan los valores límites del valor t y del test de Bonferroni y por lo tanto no afectan de manera significativa la variable respuesta.

Finalmente, se pudo concluir que, los factores concentración de la solución de QUI y tiempo de EC resultaron significativos y se consideraron en el análisis posterior. Mientras que concentración de TPP y tratamiento térmico no fueron significativos. En la Figura 3.7 se muestra una membrana de QUI luego de ser utilizada en un ensayo de absorción.



Figura 3.7: Membrana de QUI.

1.3.2.3 Optimización de la variable respuesta

Para poder determinar la combinación de factores que permitan preparar una membrana con un valor de flujo similar al de EPD se construyó un diseño experimental central compuesto. Como se mencionó en la sección 3.1.1.2 *Metodología de superficie de respuesta* del inciso 3. *Herramientas Quimiométricas* (Capítulo 1), estos diseños permiten adicionar más niveles al rango de los factores y de esta manera explorar mejor el espacio del diseño. Este diseño central compuesto consistió en la realización de experiencias de absorción con 12 membranas preparadas de acuerdo a la combinación de las variables independientes seleccionadas, en los siguientes rangos: concentración de la solución de QUI 2.66 – 4.34 % p v⁻¹ y tiempo de EC 4.77 – 55.23 minutos. La concentración de la solución de TPP fue 5.0 % p v⁻¹ para la preparación de todas las membranas, y corresponde al valor mínimo estudiado en el diseño de selección de factores.

Las combinaciones de los factores evaluados en el diseño y los resultados de las experiencias se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Combinaciones de los factores evaluados en el diseño y resultados experimentales.

Experiencia	Concentración de QUI (% p v ⁻¹)	Tiempo de EC (min)	Flujo (ug cm ⁻² h ⁻¹)
1	3.50	30.00	7.7658
2	4.34	30.00	2.6150
3	2.66	30.00	15.2280
4	3.50	55.23	12.7430
5	4.00	15.00	2.5744
6	3.50	30.00	5.7227
7	3.50	30.00	9.6351
8	3.50	30.00	9.0805
9	3.50	4.77	9.7409
10	3.00	45.00	11.1690
11	3.00	15.00	6.4650
12	4.00	45.00	4.1327

1.3.2.4 Modelado y optimización de la variable respuesta

El objetivo de la optimización fue ajustar el valor de la variable respuesta a un valor fijo, esto es el flujo de E2 en EPD. Los flujos calculados para las pacientes A y B (0.8491 y 1.2858 $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$, respectivamente) no están incluidos en el rango de respuestas experimentales evaluadas (Tabla 3.4). En los trabajos reportados por Rana y col. (2004 y 2005) se observaron resultados similares, por ejemplo el flujo de indometacina en EPD fue 34.20 $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ y el rango de los valores de flujo de las membranas correspondientes al diseño central compuesto fue 48.62-215.89 $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$. Más allá de las diferencias que pudieran existir entre ambos sistemas y que se tratara de 2 drogas distintas, se decidió continuar con el modelado y optimización debido a que las observaciones realizadas habían sido reportadas por otros autores.

Los coeficientes del modelo se calcularon mediante regresión múltiple con eliminación por retroceso (del inglés, *backward*) (Derringer y Suich, 1980). Este procedimiento consiste en realizar la regresión con todos los términos del modelo, luego quitar el término con el valor de probabilidad parcial más alto. Finalmente, el proceso se detiene cuando el valor de probabilidad del siguiente término satisface el valor de α especificado.

El flujo de E2 se ajustó mediante un modelo lineal, por ser el que mejor explica la relación entre la respuesta y los factores estudiados. El modelo seleccionado se validó mediante el test ANOVA. La probabilidad obtenida para el modelo 0.0046 (< 0.05) indica que sus términos son significativos. La prueba de falta de ajuste resultó no significativa (valor de probabilidad = 0.2553 > 0.05), de modo que el modelo elegido

ajusta de manera satisfactoria los datos experimentales. El estadístico R^2 indica que el modelo explica un 69.79 % de la variabilidad de la respuesta, señalando que el modelo puede ser usado para explorar en el espacio del diseño.

Debido a que los valores de flujo en EPD no están incluidos en el rango de respuestas obtenidas no se pueden utilizar las herramientas del programa estadístico Design-Expert para la optimización de la respuesta hacia un valor fijo. De modo que se resolvió la ecuación del modelo en forma analítica, con los siguientes criterios de optimización: concentración de la solución de QUI 4.34 % p v⁻¹ (a mayor concentración menor valor del flujo) y valor de la variable respuesta 0.8491 $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ (flujo de E2 en EPD de paciente A). El valor de tiempo de EC calculado fue 9.41 minutos.

Se preparó una membrana de QUI según la siguiente combinación de factores: concentración de la solución de QUI 4.34 % p v⁻¹, concentración de la solución de TPP fue 5.0 % p v⁻¹ y tiempo de EC 9.41 minutos. Dicha membrana se evaluó en la celda de Franz y el valor de flujo obtenido fue 6.2580 $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$, el cual evidentemente dista mucho del valor deseado. Esto puede deberse a que la suposición inicial de que el modelo se cumple fuera del rango para el cual se obtuvo no sea válida o a que el modelo no tiene en cuenta otros factores concernientes a la preparación de las membranas o propios del sistema, y que tienen una influencia significativa en el flujo de E2.

Se realizaron experiencias adicionales con la intención de trabajar a concentraciones más altas de la solución de QUI, con el objetivo de disminuir el flujo para modificar el rango de trabajo. Se trabajó con soluciones de concentración 4.5 – 5.0 % p v⁻¹ pero no se pudo disminuir el flujo hasta un valor aproximado al deseado. Además fue más difícil la manipulación de las soluciones del polímero a mayores concentraciones en el momento de la disolución debido a la viscosidad de las mismas.

Teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- 1) la imposibilidad de optimizar la respuesta con el modelo obtenido,
- 2) el efecto positivo del tiempo de EC sobre el flujo (un incremento del tiempo ocasionó un aumento del flujo) cuando lo esperable es lo contrario (Berger y col., 2004),
- 3) la necesidad de obtener más información sobre el sistema QUI-E2 para las aplicaciones pertinentes a esta tesis.

Se decidió realizar una serie de estudios adicionales que se analizan a continuación.

1.3.2.5 Caracterización de membranas de quitosan

Los valores de flujo obtenidos para las membranas con concentración de QUI 3.5 % p v⁻¹ y con 5.0, 30.0 y 55.0 minutos de EC fueron 9.3, 8.582 y 12.743 $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$, respectivamente. De modo que se prepararon membranas adicionales pero con un tiempo de EC de 15.0 minutos y se obtuvo un flujo promedio de 2.458 $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$. Como se mencionó, estos resultados son similares a los reportados por Rana y col. (2004 y 2005), quienes observaron que al aumentar la concentración del agente de EC aumentaba el flujo de la drogas 5-fluorouracilo e indometacina a través de membranas de QUI. En el sistema QUI-E2 pudo observarse entonces que, un aumento del tiempo de EC aumentó el flujo. Para permitir explicar estos resultados, estas membranas fueron sometidas a estudios de contenido de agua, espectroscopia de absorción atómica, espectroscopia de IR y RMNp.

Previo a estos ensayos y con el fin de verificar la influencia del tiempo de EC con una solución de TPP sobre las propiedades de las membranas, se prepararon membranas no entrecruzadas por inmersión de las mismas en agua sin TPP durante 5.0 – 55.0 minutos. En la Figura 3.8 se muestra la estructura química del TPP.

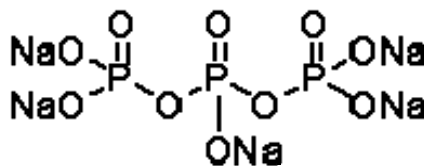


Figura 3.8: Estructura química del TPP.

Todas las membranas no entrecruzadas se rompieron durante los ensayos para evaluación del contenido de agua y por esta razón el contenido de agua no alcanzó un equilibrio sino que presentó una tendencia diminutiva. Asimismo, esta pérdida de peso podría estar asociada con un proceso conocido en la bibliografía como *erosión* (Neto y col., 2005). El cual implica que, aunque el QUI no es soluble en agua, a medida que aumenta el tiempo de inmersión pequeñas cantidades del polímero podrían ser disueltas, causando la pérdida de peso observada. Los resultados de los ensayos de espectroscopia de absorción atómica mostraron que el contenido de Na fue menor en las membranas no entrecruzadas que en las que recibieron EC. No obstante, al igual que el contenido de agua, el contenido de Na no estuvo relacionado con el tiempo de inmersión en agua. La ruptura de las membranas no entrecruzadas y el proceso de erosión serían los mecanismos que explican dichos resultados.

Estos ensayos realizados con membranas no entrecruzadas son una evidencia importante de que la reacción con TPP es la responsable de la integridad y las

características de las membranas entrecruzadas que se analizan a continuación. Las gráficas de cantidad de E2 acumulado en el compartimiento receptor por unidad de área en función del tiempo, para 3 réplicas a un mismo tiempo de EC, se muestran en la Figura 3.9.

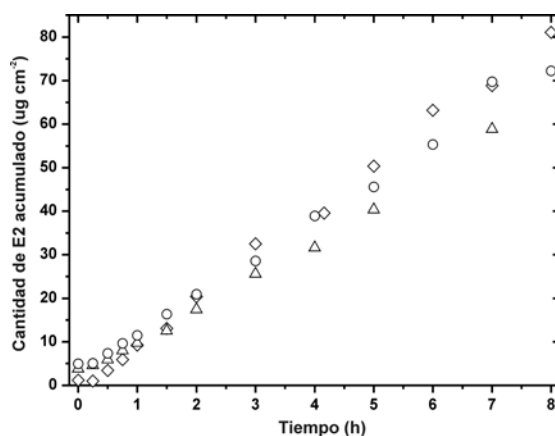


Figura 3.9: Cantidad de E2 acumulado en función del tiempo para 3 réplicas de membranas de QUI.

Analizando dichas gráficas puede observarse una muy buena reproducibilidad. Una comparación de los valores de E2 acumulado en el EE demostró que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los 3 ensayos.

Todas las membranas entrecruzadas mantuvieron su flexibilidad e integridad en la mezcla etanol:PBS. Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5: Resultados de experiencias adicionales.

	tiempo de EC (minutos)				
	5.0	15.0	30.0	45.0	55.0
Peso luego del EC (g)	0.367(0.044)	0.263(0.018)	0.297(0.019)	0.289(0.010)	0.285(0.021)
Espesor luego del EC (μm)	330(52)	271(28)	297(17)	322(8)	311(22)
EWC (%) ^a	49.4(0.5)	29.9(1.1)	29.7(0.7)	31.6(0.9)	31.9(0.8)
EWC (%) ^b	63.4(0.4)	30.6(0.3)	33.5(0.5)	36.7(0.4)	39.3(0.3)
Na ⁺ ($\mu\text{g mg}^{-1}$) luego del EC	6.73(0.51)	19.36(3.10)	25.43(1.59)	34.15(2.96)	35.55(7.22)
Na ⁺ ($\mu\text{g mg}^{-1}$) ^a	4.14(0.34)	5.93(1.94)	2.23(0.10)	14.80(0.21)	22.10(0.20)
Na ⁺ ($\mu\text{g mg}^{-1}$) ^b	2.93(0.13)	14.99(0.46)	18.80(0.79)	24.58(0.58)	28.20(0.37)
Flujo de E2 ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	9.300(0.180)	2.458(0.075)	8.582(0.551)	ND	12.743(0.365)

Entre paréntesis la desviación estándar, ND: no determinado, ^a Grupo 1, ^b Grupo 2

Las membranas con el menor tiempo de EC presentaron el peso más alto luego de la reacción de EC (Tabla 3.5). El tiempo de EC no tuvo ningún efecto significativo sobre el espesor de las membranas ($p > 0.05$).

De los estudios de contenido de agua, puede concluirse que las membranas con el menor tiempo de EC presentaron la mayor hidrofiliicidad en ambos grupos. Esto podría ser atribuido a una muy baja densidad de EC. En el Grupo 1 (membranas entrecruzadas, puestas en desecador y sumergidas en mezcla etanol:PBS) no se observaron diferencias ($p > 0.05$) en el EWC % con un incremento en el tiempo de EC (de 15.0 a 55.0 minutos). Mientras que, en el Grupo 2 (membranas entrecruzadas y sumergidas en la mezcla etanol:PBS) la hidrofiliicidad aumentó a mayor tiempo de EC (de 15.0 a 55.0 minutos) y las diferencias en el EWC % fueron significativas ($p < 0.05$). En la Figura 3.10 se observa que las membranas del Grupo 1 (Figura 3.10-a) alcanzaron el EWC % luego de 60.0 minutos de inmersión en la mezcla etanol:PBS, mientras que las membranas del Grupo 2 (Figura 3.10-b) lo hicieron a los 30.0 minutos. La disminución en el contenido de agua en las membranas del Grupo 2 puede ser atribuido a un efecto de deshidratación por parte del etanol, el cual también fue reportado para membranas de silicona (Megrab y col., 1995). Esta deshidratación se podía observar a simple vista ya que las membranas se tornaban más compactas y menos flexibles; no obstante las membranas retenían agua en el interior de la matriz polimérica, y este contenido de agua aumentó con el tiempo de EC.

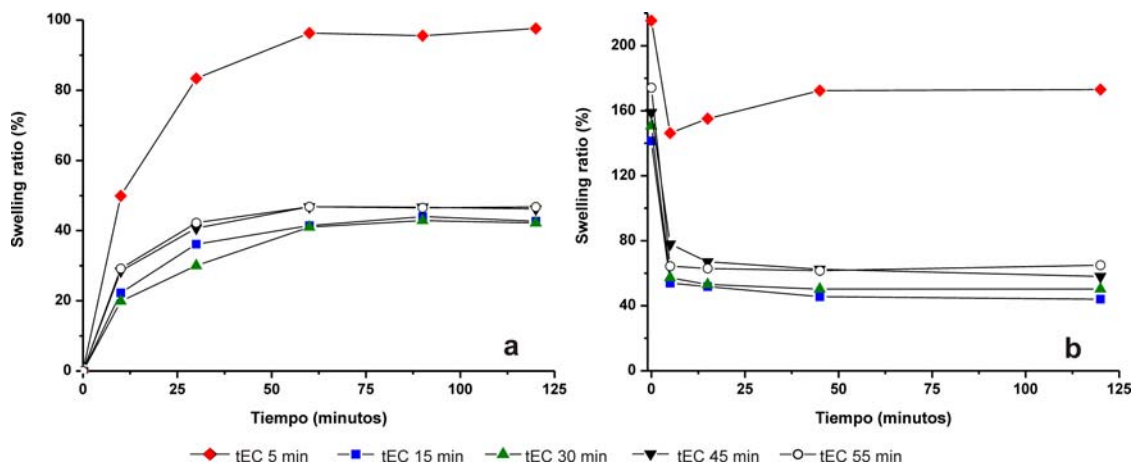


Figura 3.10: Contenido de agua para distintos tiempos de EC (tEC) a) Grupo 1 y b) Grupo 2.

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de espectroscopia de absorción atómica indican que el incremento en el tiempo de EC aumentó el contenido de Na en las membranas (Na luego del EC en la Tabla 3.5) hasta los 45.0 minutos de EC; luego

de este tiempo, parece que se alcanza un plateau. Por otra parte, el contenido de Na en ambos grupos de membranas que fueron sometidas a los ensayos de contenido de agua disminuyó en comparación con los valores obtenidos para las membranas luego del EC, indicando que durante los ensayos de absorción *in vitro* y de evaluación del contenido de agua algunos de los enlaces de la red iónica del EC se habrían roto. Esto podría ser atribuido al pH de la solución de EC de TPP (pH = 9.0) y al relativamente bajo GD del polímero (77.0 %). A este valor de pH, el grado de ionización de los grupos amino en las moléculas de QUI es menor al 10 % (Shu y Zhu, 2002), de modo que las interacciones electrostáticas entre las cargas negativas de las moléculas de TPP y las mínimas cargas positivas de las moléculas de QUI no fueron tan fuertes, pero suficientes para permitir a las membranas preservar su integridad (en comparación con las membranas no entrecruzadas que se rompieron durante los ensayos de caracterización). No obstante, en las membranas del Grupo 1, no hubo correlación entre el contenido de Na remanente y el tiempo de EC; en las membranas del Grupo 2 el contenido de Na remanente aumentó con el tiempo de EC.

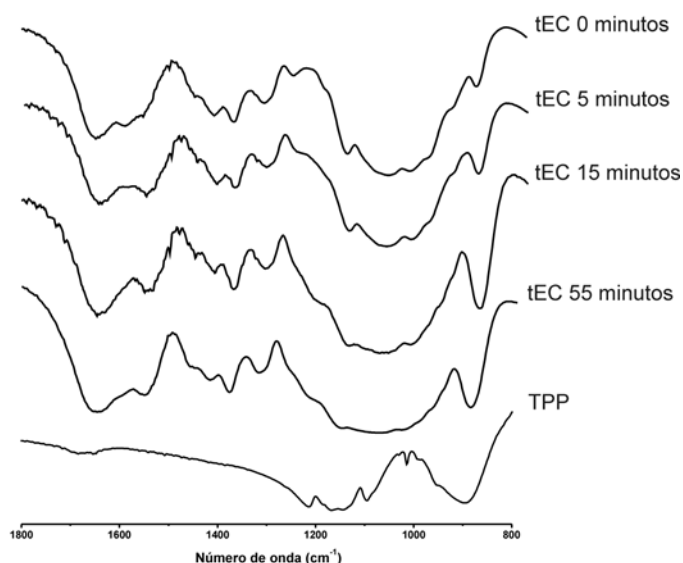


Figura 3.11: Espectros de IR de membranas no entrecruzadas, con distintos tiempos de EC y de TPP.

Los espectros de IR de membranas no entrecruzadas, entrecruzadas y del TPP se muestran en la Figura 3.11. Al comparar los espectros se observaron diferencias en las intensidades de los picos entre 1800 – 800 cm^{-1} entre las membranas no entrecruzadas y aquellas que recibieron EC. Bhumkar y Pokharkar (2006) reportaron que el pico a 1655 cm^{-1} , característico de la amida I, desaparece en las membranas entrecruzadas y 2 nuevos picos a 1645 y 1554 cm^{-1} aparecen. La desaparición de esta banda puede ser atribuida a la unión entre moléculas de TPP y QUI. Además,

Bhumkar y Pokharkar (2006) reportaron que las moléculas de QUI entrecruzadas a altos valores de pH (pH = 9.0) son más porosas, incrementando el espacio libre para la difusión y permitiendo a las membranas retener más moléculas de agua dentro de las red. Las intensidades de los picos entre 900 – 1200 cm^{-1} aumentaron a mayores tiempos de EC, dicha región es donde se encuentran los picos característicos del TPP. Estas evidencias sugieren la presencia de uniones entre los grupos $-\text{NH}_3^+$ de QUI y $-\text{O}_2\text{PO}^-$ de TPP durante el proceso de EC, y es la razón del incremento en el contenido de Na a mayores tiempos de EC.

Los estudios de RMNp se realizaron con el fin de estudiar la movilidad protónica en las membranas de QUI con distintos tiempos de EC. En los sistemas sólido-agua el tiempo de relajación espín-espín protónico (T_2) está asociado a la movilidad protónica y la intensidad de señal (A) es proporcional a la cantidad de protones. Los protones rígidos no pueden caracterizarse por un valor de T_2 , sino que para monitorear su movilidad se utiliza el método de segundo momento (M_2). El M_2 permite realizar conclusiones acerca de la movilidad de los protones inmóviles y es una medida de las interacciones dipolares. En la Tabla 3.6 se muestran los valores de los parámetros obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales con las Ecuaciones 3.13 y 3.14, y que caracterizan la fracción de protones rígidos.

Tabla 3.6: Valores de parámetros correspondientes a la fracción de protones rígidos.

	tiempo de EC (minutos)				
	0.0	15.0	30.0	45.0	55.0
a_1 (ms^{-1})	7.7	4.4	6.7	5.3	2.2
b_1 (ms^{-1})	32.7	33.0	33.5	32.3	32.6
M_{21} (ms^{-2})	416.3	381.4	419.6	376.2	358.1
A_{11} (volts)	39.2	30.1	41.8	70.7	4.8
a_2 (ms^{-1})	-	-	-	4.3	9.0
b_2 (ms^{-1})	-	-	-	22.0	29.9
M_{22} (ms^{-2})	-	-	-	180.5	379.7
A_{12} (volts)	-	-	-	15.9	209.8

Las membranas sin EC y con 15.0 y 30.0 minutos de EC presentaron una sola fracción rígida; mientras que las membranas con 45.0 y 55.0 minutos de EC, 2 fracciones de protones rígidos. Este componente rígido es debido a la macromolécula con sus grupos hidroxilos intercambiables y moléculas de agua muy estrechamente ligadas (irrotacionalmente) en la primera capa de solvatación. En los sistemas macromolécula-agua, el agua ligada puede clasificarse como: rotacionalmente ligada si las moléculas

de agua forman un enlace de hidrógeno con la macromolécula o irrotacionalmente ligada si forma 2 o más enlaces. Una molécula de agua puede formar hasta un máximo de 4 enlaces de hidrógeno.

En la Tabla 3.7 se muestran los valores de los parámetros obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales con la Ecuación 3.13, y que caracterizan la fracción de protones móviles.

Tabla 3.7: Valores de parámetros correspondientes a la fracción de protones móviles.

	tiempo de EC (minutos)				
	0.0	15.0	30.0	45.0	55.0
T ₂₂ (ms)	0.106	-	0.263	-	-
A ₂ (volts)	0.814	-	0.437	-	-
T ₂₃ (ms)	0.854	0.591	0.816	0.591	0.527
A ₃ (volts)	0.362	0.823	0.602	0.806	0.868

Las membranas sin EC y con 30.0 minutos de EC presentaron 2 fracciones móviles con distintas movilidades, mientras que las membranas con 15.0, 45.0 y 55.0 minutos de EC presentaron un decaimiento monoexponencial (una sola fracción móvil). Los protones caracterizados por el tiempo T₂₂ son los menos móviles, y al tener dimensiones de centenas de microsegundos caracterizan al agua ligada rotacionalmente (Ruan y Chen, 1998). T₂₃ que caracteriza a los protones más móviles no superó en ningún caso la unidad de milisegundo por lo que en estas membranas no hubo agua libre (Ruan y Chen, 1998), y esta fracción también correspondió a agua ligada rotacionalmente.

Las membranas con 5.0 minutos de EC presentaron una fracción rígida y una móvil cuyo tiempo de relajación fue de 1.98 ms.

En todas las membranas, el experimento de RMNp reveló la presencia de uno o dos componentes de relajación lenta además de la relajación rápida atribuida a la red polimérica.

Cuando comienza la reacción de EC de TPP con el QUI ocurre una variación en la conformación, donde el polímero actúa de tal manera que expone sus grupos -OH al solvente (Capitani y col., 2001). Esto puede observarse en las membranas con 5.0 minutos de EC, en donde el tiempo de relajación de la fracción móvil es de 1.98 ms y que caracteriza al agua libre. En las membranas con 15.0 minutos de EC se observó menor rigidez que en las membranas sin EC, pero el agua caracterizada por la magnitud de los tiempos de relajación, ya no se encuentra libre como en las membranas con 5.0 minutos de EC. Sucede que debido a la variación en la conformación las moléculas de polímero entrecruzadas con TPP se estabilizan en una

red tridimensional, lo que permite que las moléculas de agua queden rígidamente ligadas (Capitani y col., 2001).

Una reducción en el valor del M_2 puede ocurrir si disminuye la densidad protónica (las interacciones dipolares disminuyen con la sexta potencia de la distancia protón-protón) (van den Dries y col., 1998). En la Tabla 3.6 puede observarse que el $M_{21EC:30min}$ es mayor que el $M_{21EC:15min}$, por lo que las interacciones dipolares son menos intensas en las membranas con 15.0 minutos de EC. La densidad protónica es menor, como consecuencia de que los ejes de sus cadenas moleculares están más alejados entre sí, comparados con la distancia entre los ejes de las cadenas moleculares de las membranas con 30.0 minutos de EC. En la Tabla 3.7 se observa un aumento en la movilidad de la fracción más móvil al ser $T_{23EC:30min}$ mayor que $T_{23EC:15min}$. Este resultado parece a simple vista contradecir el resultado obtenido con respecto al valor del M_2 . Es decir, si los ejes de las cadenas moleculares del polímero están más cercanos entre sí en las membranas con 30.0 minutos de EC, la movilidad de los protones del agua ligada rotacionalmente debería ser menor. Una posible explicación para estos resultados es que las moléculas de agua de esta fracción más móvil no estén confinadas en el retículo que produce el EC, sino que estén por fuera de ese microporo. De modo que surge la posibilidad de que el EC permita la formación de 2 tipos de microporos. Un microporo hidrofílico formado por el TPP coordinado con el QUI donde la fracción de moléculas de agua forma un continuo con la macromolécula registrado por las interacciones dipolares intra e intermoleculares que contribuyen con el M_2 ; y otro hidrofóbico en cuya formación se ubican los grupos acetilos que no permiten las interacciones intermoleculares. En este microporo hidrofóbico se ubicaría una fracción de moléculas de agua muy pequeña pero lo suficientemente móvil como para que no contribuya con las interacciones dipolares. Resultados similares reportaron Ruel-Gariepy y col. (2002) para el sistema formado por QUI y glicerolfosfato. Reconociendo la capacidad del QUI de formar interacciones hidrofóbicas debido a la presencia de sus grupos acetilos.

En las membranas con 45.0 y 55.0 minutos de EC los resultados se invierten. Según los valores de M_2 los ejes de las cadenas moleculares en el microporo formado por el TPP y el QUI están más alejados, quitándole movilidad a la pequeña fracción de moléculas de agua del microporo hidrofóbico.

Con los resultados del estudio de contenido de agua y de acuerdo al porcentaje de cada fracción de protones se pudo calcular el contenido de protones que las moléculas de agua aportaban a cada fracción y de este modo las moléculas de agua en cada fracción (Tabla 3.8).

Tabla 3.8: Moléculas de agua en cada fracción.

	tiempo de EC (minutos)			
	15.0	30.0	45.0	55.0
Total	8.36	9.56	11.03	12.29
Fracción A ₁₁	7.83	9.04	6.74	-
Fracción A ₁₂	-	-	4.09	12.20
Fracción A ₂	-	0.22	-	-
Fracción A ₃	0.53	0.30	0.20	0.09

Para el tiempo de EC de 15.0 minutos se observó que el QUI fue capaz de coordinar fuertemente, aproximadamente 7.83 moléculas de agua por unidad repetitiva (fracción A₁₁). Para las membranas con 30.0 minutos en cambio, se observó que el polímero coordinó alrededor de 9 moléculas de agua, en la misma fracción. Por unidad repetitiva existen 8–9 lugares para formar enlaces de hidrógeno. Entonces en las membranas con 15.0 y 30.0 minutos de EC las moléculas de agua se ubicaron en la primera capa de solvatación, porque solo se observó una fracción de protones rígidos (fracción A₁₁). En las membranas con 45.0 minutos de EC fueron aproximadamente 10.83 moléculas de agua las que se unieron fuertemente a la macromolécula pero separadas en 2 fracciones con distintos momentos dipolares, una más rígida con 6.74 moléculas de agua y otra menos rígida con 4.09 moléculas. En las membranas con 55.0 minutos de EC la totalidad de las moléculas de agua (12.20) están en la segunda fracción, que tiene un M₂ que indica tanta rigidez como en la primera fracción (Tabla 3.6). El número de moléculas de agua de la fracción A₃ disminuyó con el tiempo de EC.

Como se mencionó, a mayor número de sitios de entrecruzamientos, el hinchamiento y la difusión/liberación de drogas disminuye (Remuñán-López y Bodmeier, 1997; Shu y Zhu, 2002; Berger y col., 2004). No obstante, como puede observarse en la Tabla 3.5 el flujo de E2 aumentó con un incremento del tiempo de EC desde 15.0 a 55.0 minutos. El alto valor de flujo obtenido con 5.0 minutos de EC puede ser debido a una muy baja densidad de EC.

Nghiem y col. (2002) propusieron que la estrona, un metabolito del E2, puede formar enlaces de hidrógeno debido a la presencia de grupos oxhidrilos y carbonilos en su estructura; esto permite la interacción con la membrana, la adsorción y la retención en ensayos de filtración. El fenómeno de adsorción es importante en aquellos casos donde el tamaño de poro de la membrana es similar al diámetro molecular del compuesto que filtra. Cuando el tamaño de poro es menor al diámetro molecular la difusión de la estrona desde la fase acuosa hacia el poro no es favorable, y es el impedimento estérico el principal mecanismo en el proceso de separación. En otro

trabajo (Nghiem y col., 2004) en el que estudiaron el reciclado de efluentes de aguas residuales domésticas utilizando también membranas de nanofiltración para la remoción de E2 y de estrona, estos autores concluyeron que el mecanismo de transporte de E2 a través de las membranas es difusión y no existe aporte de fenómenos de convección; sin embargo, el rol del agua en este proceso difusivo sigue sin estar claro.

Braeken y col. (2005) estudiaron la relación entre la hidrofobicidad de compuestos orgánicos, expresada como el logaritmo del coeficiente de partición octanol – agua ($\text{Log } P$), y su retención en EE en ensayos de nanofiltración. Estos autores utilizaron 3 membranas diferentes, aunque todas de naturaleza hidrofílica, y entre los compuestos evaluaron E2, el cual se caracteriza por una alta hidrofobicidad ($\text{Log } P = 2.72$). Braeken y col. encontraron que un compuesto con un alto valor de $\text{Log } P$ (compuesto hidrofóbico) permeaba relativamente fácil a través de las membranas, mientras que una molécula con una alta afinidad por la fase acuosa (valor de $\text{Log } P$ negativo) era retenida. Estos autores explicaron sus resultados de la siguiente manera: las moléculas con un bajo valor de $\text{Log } P$ (negativo) generalmente tienen muchos grupos polares, los cuales pueden formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua. Los compuestos hidrofóbicos tienen menos grupos polares y están menos hidratados. Debido a su menor tamaño, estas moléculas pueden entrar más fácilmente en los poros de las membranas y permear a través de ella. Esta fue la explicación para la baja retención observada para el E2, en comparación con lo esperado según el valor de corte de la membrana.

Dependiendo de la naturaleza del agente de EC, las membranas de QUI pueden estar entrecruzadas en forma covalente o iónica. Las membranas con EC iónico pueden prepararse por inmersión de la misma en una solución que contenga un agente de EC, tal como el TPP. El TPP puede tener una alta densidad de cargas y difundir hacia el interior de la membrana (Shu y Zhu, 2002). El EC ocurre por las interacciones electrostáticas entre las cargas negativas del agente y los grupos amino del QUI cargados positivamente. Estas membranas entrecruzadas pueden hincharse, retener agua u otro fluido y permitir en forma selectiva la difusión de moléculas. Estas propiedades están principalmente influenciadas por las interacciones iónicas de la red (densidad de EC), las cuales dependen de las condiciones de la reacción entre el agente y el polímero, el tamaño del agente, la carga del agente y del QUI, el GD y el tamaño molecular del QUI y el pH del medio de reacción (Berger y col., 2004). Incluso se han realizado estudios sobre la influencia del tipo de ácido utilizado en la disolución del polímero. Ritthidej y col. (2002) proponen que el porcentaje de agua absorbida depende del tipo de ácido carboxílico, y que a mayor número de grupos carboxilos e

hidroxilos y menos grupos alquilo en la molécula de ácido, es mayor la absorción de agua.

No obstante en el momento de analizar los resultados de estudios de absorción – liberación la relación entre las propiedades de la droga empleada y las propiedades de la membrana toman particular importancia, haciendo que cada sistema necesite su propio razonamiento.

Las micrografías obtenidas mediante observación por Microscopía Electrónica de Barrido en magnificación $\times 2400$ y $\times 7800$, se muestran en la Figura 3.12 (cortes transversales) y Figura 3.13 (superficies). Las micrografías 3.12-a y b y 3.13-a corresponden a membranas preparadas con una solución de polímero de concentración $1.59\% \text{ p v}^{-1}$, mientras que las micrografías 3.12-c y d y 3.13-b corresponden a membranas preparadas a partir de una solución al $3.50\% \text{ p v}^{-1}$.

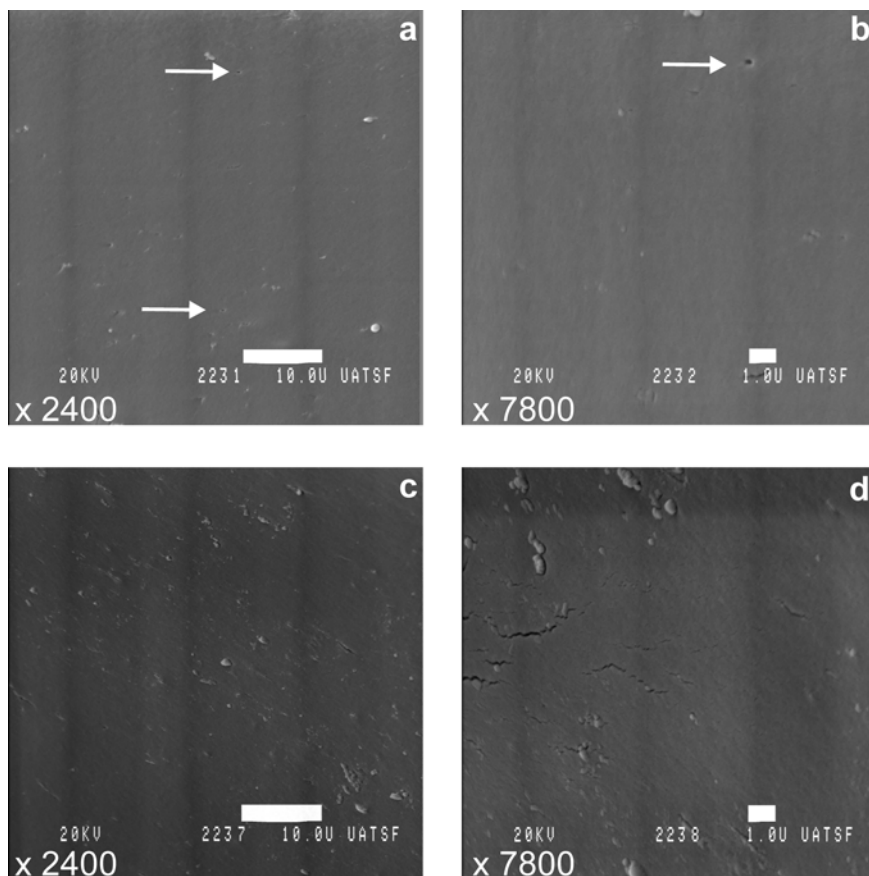


Figura 3.12: Micrografías de secciones transversales, a y b) Membranas preparadas con solución de polímero al $1.59\% \text{ p v}^{-1}$, c y d) con solución al $3.5\% \text{ p v}^{-1}$.

En la Figura 3.12 se observa una estructura densa, compacta y homogénea, sin canales. Sólo en las Figuras 3.12-a y b se observa la presencia de pequeños poros (una estimación del tamaño corresponde a 0.13 por $0.28 \mu\text{m}$).

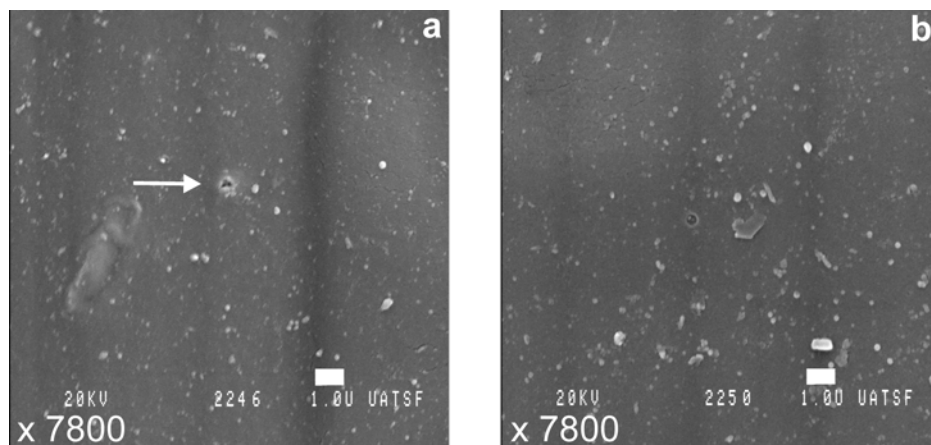


Figura 3.13: Micrografías de superficie, a) Membranas preparadas con solución de polímero al 1.59 % p v⁻¹ y b) con solución al 3.5 % p v⁻¹.

En la Figura 3.13, al igual que en la Figura 3.12, sólo se observan pequeños poros en la superficie de la membrana preparada a partir de una solución de polímero de 1.59 % p v⁻¹. No obstante la distribución de estos poros sobre la superficie fue rara.

En resumen, en el sistema QUI-E2 se observó que, un aumento del tiempo de EC aumentó el flujo de E2. Para explicar estos resultados, membranas con distintos tiempos de EC fueron sometidas a estudios adicionales:

- Contenido de agua: se observó un incremento en el EWC % con un aumento en el tiempo de EC (Grupo 2 Tabla 3.5, de 15.0 a 55.0 minutos).
- Espectroscopia de absorción atómica: el incremento en el tiempo de EC aumentó el contenido de Na en las membranas (Na luego del EC en la Tabla 3.5).
- Espectroscopia de IR: modificaciones en el espectro de IR de membranas con distintos tiempos de EC indicaron la formación de una unión entre moléculas de TPP y QUI (Figura 3.10).
- Espectroscopia de RMNp: la reacción de EC entre el TPP y el QUI permitió la formación de 2 microporos: uno hidrofílico cuyo contenido de moléculas de agua aumentó con el tiempo de EC (fracciones A11 y A12 Tabla 3.8) considerándose entonces más hidrofílico a medida que aumentó el tiempo de EC; y otro hidrofóbico cuyo contenido de moléculas de agua disminuyó con el tiempo de EC (fracción A3 Tabla 3.8) considerándose entonces más hidrofóbico con el incremento del tiempo de reacción.
- Observación por microscopía electrónica de barrido: los pequeños poros observados en las membranas preparadas con solución del polímero al 1.59 % p v⁻¹ podrían corresponder a los microporos hidrofílicos. Sin embargo la estructura que

se observa en las fotos es más bien compacta y densa. De modo que los microporos no alcanzan a observarse con la resolución de esta técnica. Las estrías que se observan en algunas fotos se produjeron debido al calor generado durante la realización de las micrografías.

De modo que estos estudios permiten empezar a conjeturar algunos fenómenos o mecanismos para explicar el aumento del flujo de E2, una molécula hidrofóbica, con el incremento en el tiempo de EC. Como se mencionó, los compuestos hidrofóbicos tienen menos grupos polares y están menos hidratados. Debido a su menor tamaño, las moléculas de E2 pudieron permear más fácilmente a través de los microporos hidrofóbicos. Por otra parte la coexistencia de un microporo hidrofílico pudo haber colaborado a la mayor difusión del E2. Más allá de las diferencias conceptuales y técnicas entre los procesos de filtración propiamente dichos y los ensayos de difusión, los aportes de los primeros en cuanto a interacciones entre las membranas y E2 y estrona (Nghiem y col. 2002 y 2004; Braeken y col., 2005) son importantes. Quizás las interacciones entre el E2 y las interfases QUI - TPP - agua y QUI – agua mediante la formación de enlaces de hidrógeno pudieron haber hecho algún aporte a la difusión de E2 a través de los microporos hidrofílicos. Asimismo está reportado un proceso de *translocación de droga* (del inglés, *drug particle translocation*) en sistemas hidrofílicos con drogas hidrofóbicas (Bettini y col., 2001). En estos transportadores, a medida que avanza el frente de hinchamiento y ocurre el fenómeno de relajación de las macromoléculas de polímero (transición de un estado seco – no hinchado a uno hinchado) se facilitó la expulsión de las partículas de droga y un incremento en la velocidad de liberación. Si bien, las membranas utilizadas en esta tesis habían alcanzado su equilibrio en el contenido de agua antes del ensayo de absorción, y hubo una rigidez en la estructura tridimensional obtenida luego del EC con el TPP, algunos de estos enlaces se rompieron durante los ensayos de absorción y algunas de las moléculas de agua ubicadas en el canal hidrofílico para las membranas con 45.0 y 55.0 minutos de EC tuvieron cierta movilidad, quizás generando un fenómeno similar al reportado por Bettini y col., (2001). Cabe aclarar que las membranas utilizadas en esta tesis no presentaron una desintegración significativa ya que la pérdida de masa en las mismas, en ningún caso superó el 10 %.

Soluciones acuosas de etanol se utilizan para lavar el precipitado de QUI que se obtiene luego de la reacción de desacetilación de la quitina (Zhang y col., 2005) y también se utilizan para lavar membranas de modo de remover residuos de ácidos unidos a la superficie (Wahid y col., 2008). La función del etanol fue mantener soluble al E2, y para evitar un cotransporte se utilizó la misma proporción en ambos

compartimientos. No obstante no puede descartarse algún efecto del etanol sobre la membrana y específicamente sobre el microporo hidrofóbico. Por otra parte, el hecho de no conocer la distribución de tamaño de poros en las membranas utilizadas y la solubilidad del E2 en las mismas, condiciona la proposición de un mecanismo más completo. De todos modos los resultados obtenidos cobran importancia en esta tesis en la potencial aplicación del QUI para el diseño de un sistema de liberación controlada de E2.

1.4 CONCLUSIONES

- Se determinó el valor de flujo y de Kp para fragmentos de EPD obtenidos a partir de la piel completa de 2 pacientes. Los valores de Kp son del orden de los reportados en la bibliografía. Los CV % obtenidos en esta tesis fueron aceptables.
- La aplicación de un diseño experimental permitió seleccionar las variables que afectan en forma significativa el flujo de E2 a través de membranas de QUI, realizando un pequeño número de experiencias. No obstante con el modelo obtenido del proceso de optimización no se logró determinar la combinación de las variables experimentales que permitan preparar una membrana con la cual se obtenga el mismo valor de flujo que con EPD. Por lo tanto en el rango de valores estudiados y con la utilización de la celda vertical de Franz, no se pudo diseñar membrana deseada.
- Los ensayos adicionales de: evaluación de contenido de agua, contenido de sodio, espectroscopia de IR y de RMNp permitieron obtener información sobre la relación entre propiedades del E2 y de las membranas de QUI para explicar el aumento del flujo de E2 con el incremento del tiempo de EC.

CAPÍTULO 4

1. EQUIPO PARA ENSAYOS DE DISOLUCIÓN: ENSAYOS DE LIBERACIÓN - ABSORCIÓN *IN VITRO* DE ESTRADIOL

1.1 Introducción y objetivos

Para ensayos de liberación desde sistemas transdermales la Farmacopea de EEUU especifica el uso del sistema *sandwich* en un vaso con agitación mediante paletas (en inglés, *Apparatus 5 paddle over disk*, US Pharmacopeia 30, 2007b). El sistema *sandwich* consiste de un vidrio de reloj, una malla de teflón y clips de teflón que permiten mantener todo el sistema ensamblado (Figura 4.1).

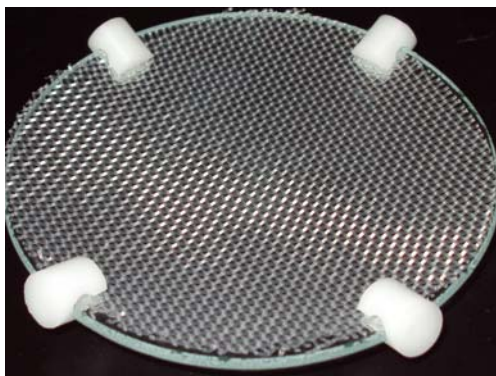


Figura 4.1: Sistema *sandwich*.

Los componentes de un sistema de administración transdermal de tipo matricial como el utilizado en esta tesis son los siguientes (Figura 4.2):

- Primera cubierta protectora: es la parte del sistema que debe ser removida para la aplicación del mismo.
- Módulo de liberación: puede ser una matriz más una capa adhesiva o directamente una matriz adhesiva con el principio activo incorporado. En cualquier caso está constituido por material polimérico. El adhesivo debe ser compatible con la droga, ser biocompatible e hipoalergénico, debe proveer fuerza cohesiva y, estabilidad y seguridad durante el tiempo de aplicación (de 3 a 7 días).
- Segunda cubierta protectora: debe ser visible y resistente a los excipientes y al principio activo de modo que los mismos no se liberen del sistema ya que esto modificaría la composición.

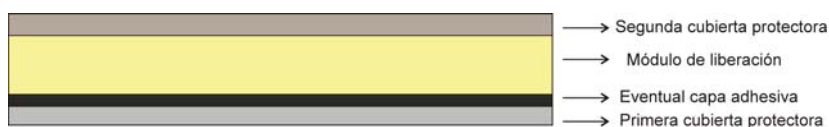


Figura 4.2: Esquema sistema tipo matricial.

Los diseños estadísticos de experimentos también son utilizados para el desarrollo u optimización de formulaciones de liberación controlada. Los parámetros del proceso de liberación que se utilizan comúnmente como variable respuesta son: porcentaje de droga liberada a un cierto tiempo, tiempo necesario para liberar un dado porcentaje de droga, la constante que representa la velocidad de liberación o el orden del proceso (exponente en algunas de las ecuaciones que modelan matemáticamente la liberación) (Hamed y Sakr, 2001). No obstante, hay que ser cuidadoso en el momento de seleccionar el parámetro a utilizar. La optimización de un solo punto de todo el perfil de liberación podría conducir a resultados engañosos, ya que diferentes perfiles de liberación pueden tener el mismo porcentaje de droga liberado a un dado tiempo. Por lo tanto, en esta tesis se seleccionó como variable respuesta la cantidad de E2 acumulado por unidad de tiempo. Este valor se obtuvo de la porción lineal del perfil de liberación (cantidad acumulada en función del tiempo). Se consideró para su cálculo, hasta un total del 50.0 % de droga liberada, para asegurar el mismo valor de corte para todas las experiencias. De este modo al menos 4 puntos fueron utilizados para obtener el valor de la respuesta a optimizar.

Durante el proceso de desarrollo y optimización de una formulación, el investigador puede recurrir a métodos para comparar perfiles de liberación entre sí. Estos métodos se pueden clasificar en: métodos estadísticos, métodos independientes de modelos o métodos dependiente de modelos, que utilizan modelos matemáticos obtenidos mediante resolución de un sistema de ecuaciones, en donde se pueden tener en cuenta varias consideraciones como el mecanismo de liberación, la solubilidad de la droga, la carga inicial de droga, parámetros geométricos del sistema, entre otros. Los métodos estadísticos evalúan la diferencia entre las medias de 2 perfiles de liberación a un dado tiempo o considerando todo el perfil, mediante en análisis de la variancia o el test de student (Costa y Sousa Lobo, 2001).

Los métodos independientes de modelos realizan simples relaciones entre parámetros obtenidos de los ensayos de liberación (por ejemplo la relación entre la cantidad de droga liberada a un dado tiempo para dos formulaciones) o procedimientos de comparación por pares que incluyen el *factor de diferencia* (f_1), el *factor de similitud* (f_2) y el índice de Rescigno (Costa y Sousa Lobo, 2001). Los 2 primeros factores han sido adoptados incluso por la FDA (Food and Drug Administration, 1997) y la EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996), y ampliamente

utilizados en la bibliografía en investigaciones de diseño y optimización de formulaciones farmacéuticas (Moore y Flanner, 1996; Hamed y Sakr, 2001; El-Malah y col., 2006). El *factor de diferencia* mide el porcentaje de error entre 2 curvas teniendo en cuenta todos los puntos:

$$\text{Ecuación 4.1} \quad f1 = \frac{\sum_{j=1}^n |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^n R_j} \cdot 100$$

El *factor de similitud* es una expresión logarítmica que tiene en cuenta el cuadrado de las diferencias en los porcentajes de droga liberado entre el producto de referencia y el producto que se evalúa, utilizando todos los puntos de la curva:

$$\text{Ecuación 4.2} \quad f2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{j=1}^n |R_j - T_j|^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\}$$

En ambas ecuaciones n es el número de muestras, R_j y T_j son los porcentajes de droga liberado del producto de referencia y del producto que se evalúa, respectivamente, para cada tiempo j . Para considerar idénticos los perfiles, el valor de $f1$ debe ser cercano a 0 y el valor de $f2$ cercano a 100. En general, valores de $f1$ menores a 15 (0 – 15) y valores de $f2$ mayores a 50 (50 – 100) indican similitud entre los perfiles de liberación.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el sistema celda vertical de Franz en cuanto a los factores que afectan el flujo de E2 en membranas de QUI, y las cuestiones experimentales expuestas en el capítulo Desarrollo Teórico para ensayos de liberación desde sistemas de administración transdermal; se propusieron como objetivos:

- Realizar ensayos de liberación-absorción de E2 en el equipo para ensayos de disolución utilizando EPD, y evaluar la cantidad de E2 acumulado por unidad de tiempo, a partir de las gráficas del perfil de liberación.
- Diseñar mediante la aplicación de un diseño experimental estadístico una membrana de QUI optimizada que permita obtener en un ensayo de liberación - absorción para un sistema de administración transdermal, el mismo valor de respuesta que el obtenido para EPD.
- Aplicar la membrana de QUI optimizada en el desarrollo de un sistema de liberación de E2.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Equipamiento y programas de computación

Todas las experiencias de liberación - absorción se realizaron en un equipo para ensayos de disolución modelo SR8-Plus Hanson Research, con un volumen de solución receptora de 500.0 mL.

Todas las experiencias del método de cuantificación de E2 se realizaron en un equipo ternario de cromatografía líquida de alta resolución Shimadzu LC-10 con detector UV de arreglo de diodos.

Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro Shimadzu FTIR-8201 PC.

La obtención de micrografías se realizó mediante observación con un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM-35C equipado con un sistema de adquisición de imágenes digitales SemAfore. La observación se realizó bajo el modo de imágenes de electrones secundarios utilizando una tensión de aceleración de 20.0 kV.

Los diseños experimentales y el análisis de los datos se realizaron con el programa estadístico Design-Expert trial version 7.0.0.

1.2.2 Reactivos y materiales

El QUI fue comprado en Polymar Ciencia y Nutrición S.A. (Brasil). El E2 de pureza 99% y el TPP, fueron de la marca Sigma Aldrich. El poloxamer 188 fue de la marca Rumapel.

El sistema de administración transdermal de E2 (parche) disponible comercialmente fue Trial Sat[®] de Laboratorios BETA S.A. (Argentina). Estos sistemas están diseñados para proveer *in vivo* 0.05 mg de E2 por día.

El ácido acético, el etanol y el glicerol fueron PA >99.5% (Cicarelli). El acetonitrilo fue de calidad cromatografía líquida (Merck).

El agua que se utilizó para las disoluciones y las diluciones fue de calidad ultrapura.

La solución reguladora buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4) fue preparada de la misma forma que en la sección 2.2.2 *Reactivos y materiales* del inciso 2. *Caracterización del estradiol y desarrollo de un método de cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución*, Capítulo 2.

1.2.3 Preparación y entrecruzamiento de membranas de quitosan

Las membranas fueron preparadas y entrecruzadas de la misma forma que se explicó en el capítulo anterior, solo que en esta ocasión fueron cortadas en secciones de aproximadamente 15.0 cm² de modo de cubrir toda el área de liberación del parche. Luego de la reacción de EC las membranas se lavaron 3 veces con agua para remover el exceso de TPP y se dejaron en remojo en la mezcla etanol:PBS durante toda la noche. Todas las membranas entrecruzadas mantuvieron su flexibilidad e integridad en la mezcla etanol:PBS.

1.2.4 Ensayos de liberación - absorción de estradiol desde parche comercial

En los ensayos de liberación - absorción se utilizaron fragmentos de EPD obtenidos según la metodología descrita en la sección 3.2.2 *Separación de epidermis* del inciso 3. *Selección de un método de separación de epidermis a partir de un fragmento de piel completa* (Capítulo 2) y membranas de QUI entrecruzadas según el procedimiento descrito en el punto anterior. También se realizaron ensayos con parches sin membranas.

El medio utilizado en los ensayos consistió de una solución etanol:PBS (40:60). Esta mezcla fue mantenida termostáticamente a 37.0 °C y bajo agitación de 100.0 rpm. A las membranas (EPD o de QUI) que estuvieron toda la noche en remojo en la mezcla etanol:PBS se le adhirió un parche. Luego fueron puestas en el sistema *sandwich* de la siguiente manera: la segunda cubierta protectora que evita que los excipientes y el principio activo se liberen del sistema, en contacto con el vidrio de reloj y la membrana en contacto con la malla de teflón permitiendo la liberación en esa dirección. Todo el sistema fue depositado en el fondo de los vasos. Una vez que se dio comienzo al ensayo de liberación-absorción, alícuotas de 5.0 mL fueron retiradas y cuantificadas mediante el método desarrollado en la sección 2.2.4 *Desarrollo de un método de cuantificación de estradiol mediante cromatografía líquida de alta resolución*, Capítulo 2. Un mismo volumen de medio fresco fue agregado para mantener el volumen constante.

La cantidad de E2 acumulado por unidad de tiempo se obtuvo de la porción lineal del perfil de liberación (cantidad acumulada en función del tiempo).

1.2.5 Preparación de un film de quitosan para liberación de estradiol

La metodología utilizada fue similar a la reportada por Dhanikula y Panchagnula (2004). Una solución de QUI se preparó por disolución de la droga en un volumen determinado de solución acuosa de ácido acético ($1\% \text{ v v}^{-1}$) para alcanzar una concentración de $1\% \text{ p v}^{-1}$. A esta solución se le agregó glicerol ($0.5\% \text{ v v}^{-1}$). Luego se centrifugó a 4000 rpm durante 30.0 minutos para remover las burbujas de aire y el material no disuelto. Una cantidad de E2 (12.0 mg) y de poloxamer 188 (30.0 mg) fueron disueltos por separado en un 1.0 mL de etanol; luego ambas soluciones se mezclaron y esta mezcla se adicionó a la solución de QUI. Seguidamente, la suspensión homogénea obtenida se vertió en una placa de Petri de policarbonato, se dejó evaporar el solvente a una T de 30.0 °C hasta peso constante. Los films secos se almacenaron en bolsas de polietileno hasta su uso. Antes del ensayo de liberación – absorción, se evaluó la estabilidad del film mediante inmersión en la solución receptora toda la noche. Una pérdida de peso del 5.0 % indicó una elevada estabilidad.

1.2.5.1 Ensayos de liberación - absorción de estradiol desde film de quitosan

Los films secos fueron cortados en secciones circulares de 5.0 cm² y fijados a una película adhesiva. Esta película cubrió un lado del film asegurando la liberación en una dirección, es decir cumplió la función de segunda cubierta protectora. Luego estos films fueron utilizados en ensayos de liberación – absorción, solos o con una membrana de QUI con propiedades de permeación similares a EPD. Las condiciones del ensayo de liberación-absorción fueron las mismas que para un parche comercial (1.2.4 Ensayos de liberación - absorción de estradiol desde parche comercial).

1.2.5.2 Caracterización por espectroscopia infrarroja

Films de QUI sin E2 (QUI, poloxamer y glicerol) y con E2 fueron limados, para obtener un polvo que se secó en estufa y se utilizó para preparar una pastilla con bromuro de potasio. El espectro se obtuvo en la región de frecuencia de 4000-400 cm⁻¹.

1.2.5.3 Observación por microscopía electrónica de barrido

Se realizaron observaciones de las superficies y de cortes transversales de los films de QUI para liberación de E2. Para la observación transversal, las membranas fueron sumergidas en aire líquido y fracturadas. Distintos fragmentos fueron adheridos con pasta de grafito sobre portamuestras metálico. A continuación, todos los preparados se recubrieron con oro empleando un Sistema de Deposición Combinado metal/carbono, SPI SUPPLIES, 12157-AX, operando con atmósfera de Argón a 18.0 mA y durante 80.0 segundos, en 2 sesiones de 40.0 segundos. Las muestras se examinaron con un Microscopio Electrónico de Barrido.

1.3 Resultados y discusión

1.3.1 Ensayos de liberación - absorción de estradiol

1.3.1.1 Desde parche comercial

La Figura 4.3 muestra la gráfica de cantidad acumulada en función del tiempo obtenida a partir de los datos experimentales para los ensayos de liberación realizados con el parche comercial solo, es decir sin ninguna membrana adherida.

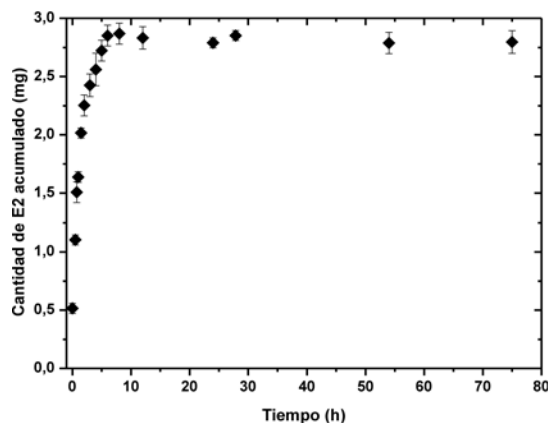


Figura 4.3: Cantidad de E2 acumulado en función del tiempo.

1.3.1.2 Desde parche comercial y a través de epidermis

Para poder determinar la cantidad de E2 acumulado por unidad de tiempo para EPD se preparó un fragmento de EPD a partir de la piel completa de 1 mujer, Paciente B. Una vez obtenido el fragmento se utilizó en el ensayo de liberación – absorción, y se

realizó la gráfica de cantidad acumulada en función del tiempo que se muestra en la Figura 4.4.

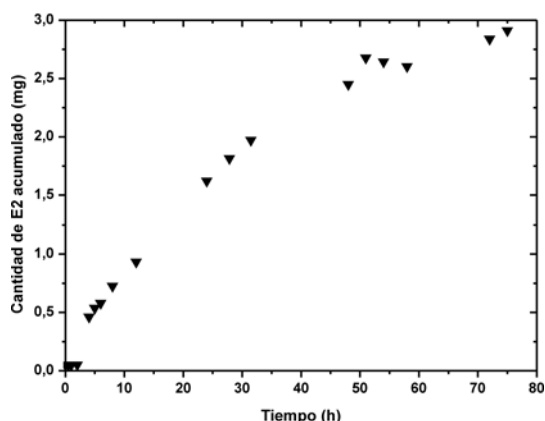


Figura 4.4: Cantidad de E2 acumulado en función del tiempo para la Paciente B

Parte de la porción recta (hasta un porcentaje de liberación del 50.0 %) de la gráfica en la Figura 4.4 se ajustó con un modelo lineal. El valor de la pendiente de la ecuación de ajuste es el valor de la respuesta, cantidad de E2 acumulado por unidad de tiempo: 0.0589 mg h^{-1} . Teniendo en cuenta la carga inicial de droga del parche se puede calcular el K_p : $0.2 \times 10^{-3} \text{ cm h}^{-1}$. Similar a los valores de k_p reportados por Johnson y col. (1995).

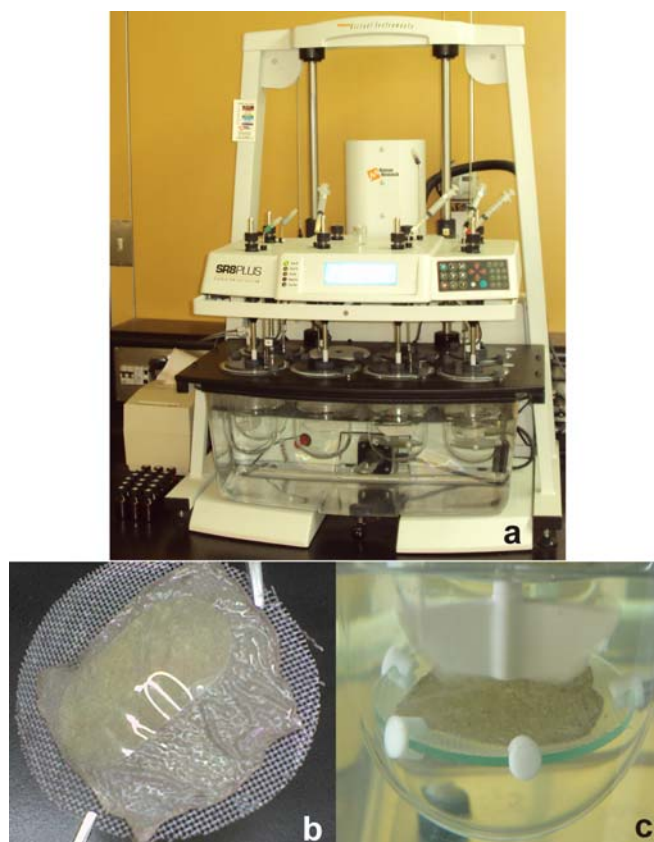


Figura 4.5: a) Equipo para ensayos de disolución SR8-Plus, b) Parche adherido al fragmento de EPD y c) Sistema *sandwich* en el vaso durante un ensayo de liberación-absorción.

En la Figura 4.5 se muestra el equipo para ensayos de disolución SR8-Plus utilizado, el parche adherido al fragmento de EPD y el sistema *sandwich* depositado en el fondo del vaso durante el ensayo de liberación-absorción.

1.3.1.3 Desde parche comercial y a través de membranas de quitosan

En el sistema celda vertical de Franz se concluyó que los efectos de los factores concentración de la solución de QUI y tiempo de EC resultaron significativos sobre la respuesta, mientras que concentración de TPP y tratamiento térmico no fueron significativos. Dado que los factores que resultaron significativos junto con la concentración de TPP, fueron reportados como significativos por otros autores (Dureja y col., 2001 y Rana y col., 2004 y 2005) no se realizó un diseño de selección de factores. Directamente se construyó un diseño experimental central compuesto para determinar la combinación de factores que permitan preparar una membrana con un valor de respuesta similar al de EPD. Este diseño consistió en la realización de experiencias de liberación - absorción con 13 membranas preparadas de acuerdo a la combinación de las variables independientes seleccionadas, en los siguientes rangos: concentración de la solución de QUI 1.59 – 4.41 % p v⁻¹, tiempo de EC 8.79 – 51.21 minutos y concentración de la solución de TPP 2.93 – 17.07 % p v⁻¹. Las combinaciones de los factores evaluados en el diseño y los resultados de las experiencias se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Combinaciones de los factores evaluados en el diseño y resultados experimentales.

Experiencia	Concentración de QUI (% p v ⁻¹)	Concentración de TPP (% p v ⁻¹)	Tiempo de EC (min)	Respuesta (mg h ⁻¹)
1	3.00	17.07	30.00	0.1169
2	4.00	5.00	45.00	0.0512
3	2.00	15.00	45.00	0.5177
4	3.00	2.93	30.00	0.0345
5	1.59	10.00	30.00	0.7437
6	3.00	10.00	30.00	0.1202
7	3.00	10.00	30.00	0.1416
8	3.00	10.00	51.21	0.0816
9	3.00	10.00	8.79	0.0417
10	2.00	5.00	15.00	0.3771
11	4.41	10.00	30.00	0.0204
12	4.00	15.00	15.00	0.0516
13	3.00	10.00	30.00	0.1071

Una vez preparadas las membranas se utilizaron en los ensayos de liberación - absorción y se determinó el valor de la variable respuesta, de la porción recta de la gráfica de cantidad de E2 acumulado en función del tiempo de la misma manera que para EPD.

1.3.1.3.1 Modelado y optimización de la variable respuesta

Los datos experimentales de la variable respuesta se ajustaron mediante un modelo polinomial. Los coeficientes del modelo se calcularon mediante regresión múltiple con eliminación por retroceso (Derringer y Suich, 1980) y se validaron mediante el test ANOVA. En la Tabla 4.2 se muestran los resultados del ANOVA para el modelo cuadrático modificado. Este modelo exhibió una baja desviación estándar (0.011, CV % = 8.92) y un elevado coeficiente de correlación ajustado (0.9970), indicando una buena relación entre los datos experimentales y el modelo. Algunos términos irrelevantes se consideraron en el modelo para mantener la jerarquización. La jerarquía de un modelo mantiene las relaciones entre los efectos principales, interacciones de 2 factores, interacciones de 3 factores, etc.. En la Tabla 4.2 se observa que la mayoría de los términos del modelo son significativos ($p < 0.05$); sólo el tiempo de EC y el término cuadrático de la concentración de la solución de TPP no son significativos ($p > 0.05$). No obstante, el tiempo de EC fue el término adicionado a la ecuación final del modelo luego de la eliminación por retroceso, para mantener la jerarquización. Es decir, como las interacciones AB y BC son términos significativos, el modelo también debe incluir los términos debidos a los efectos principales de A, B y C, a pesar de que el efecto principal de B no sea significativo (Tabla 4.2).

Tabla 4.2: Resultados del test ANOVA aplicado a los datos experimentales del diseño central compuesto.

Parámetro	Valor F	Valor de probabilidad	Coefficiente Estimado
A – Concentración de QUI (% p v ⁻¹)	925.21	< 0.0001	-1.2197
B – Tiempo de EC (min)	0.32	0.6043	0.0014
C – Concentración de TPP (% p v ⁻¹)	20.83	0.0103	-0.0760
AB	46.67	0.0024	-0.0040
AC	31.86	0.0049	0.0134
BC	98.99	0.0006	0.0014
A ²	1097.05	< 0.0001	0.1689
B ²	9.87	0.0348	-5.75x10 ⁻⁵
C ²	0.86	0.1444	-0.0140

La utilidad del modelo estadístico desarrollado es que permite encontrar las condiciones experimentales para obtener una membrana de QUI optimizada. La cantidad de E2 acumulado por unidad de tiempo obtenido para EPD fue 0.0589 mg h^{-1} , por lo tanto la respuesta fue ajustada a un valor fijo de 0.0589 mg h^{-1} en el proceso de optimización.

El efecto de la concentración de la solución de QUI fue el más importante sobre la respuesta ($p < 0.0001$, Tabla 4.2), y la misma disminuyó a medida que la concentración del polímero aumentó. El valor target está cerca de los valores más bajos de la respuesta (Tabla 4.1). En un primer paso del proceso de optimización, cuando se analizaron todas las opciones de combinaciones, las combinaciones de factores independientes con una concentración conveniente de polímero también presentaron una elevada concentración del agente de EC y largos tiempos de EC. Dado que hubo problemas para preparar la solución de TPP a altas concentraciones debido a la dificultad en la disolución y dado que largos tiempos de EC extienden el proceso de preparación de las membranas, en un segundo paso del proceso de optimización la concentración del agente de EC y el tiempo de EC fueron minimizados. La concentración de la solución de QUI se mantuvo en rango. La optimización numérica encuentra un máximo en la función deseabilidad. En este caso, el objetivo de la optimización fue encontrar un conjunto de condiciones experimentales que permita alcanzar un valor de respuesta igual al valor target (0.0589 mg h^{-1}).

Las condiciones experimentales correspondientes a un máximo en la función deseabilidad (0.999) fueron: $3.76 \% \text{ p v}^{-1}$ para la concentración de solución de QUI, $5.0 \% \text{ p v}^{-1}$ para la concentración de la solución de TPP y 15.0 minutos para el tiempo de EC. Las superficies de respuesta obtenidas para la función deseabilidad se muestran en la Figura 4.6. Estos gráficos se obtuvieron para un dado par de factores, manteniendo el otro fijo en su valor óptimo.

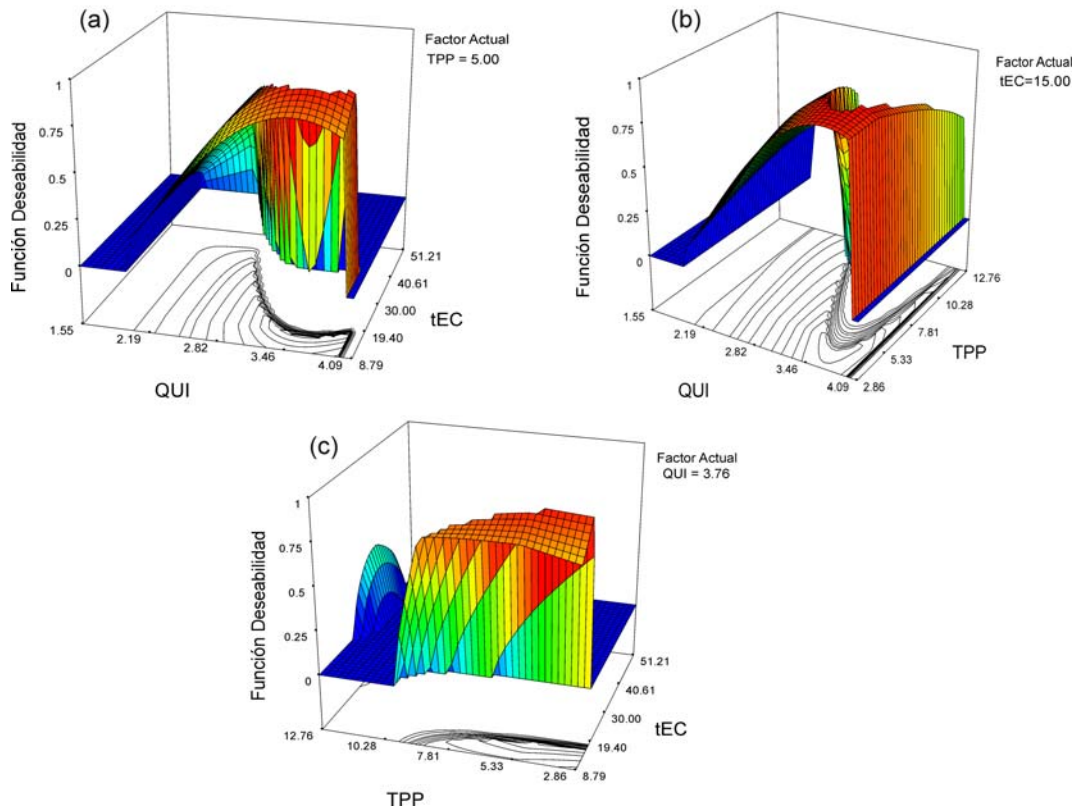


Figura 4.6: Superficies de respuesta correspondientes a la función deseabilidad para un par de factores manteniendo el otro fijo en su valor óptimo. QUI: concentración de la solución de QUI (% p v⁻¹), TPP: concentración de la solución de TPP (% p v⁻¹) y tEC: tiempo de EC (min).

Se observa que la deseabilidad alcanzó valores cercanos al óptimo cuando la concentración de la solución de QUI fue alta. Por otra parte la deseabilidad fue elevada para los niveles más bajos de concentración de solución de TPP y tiempo de EC. El valor teórico de la respuesta para la combinación experimental seleccionada fue 0.0590 mg h⁻¹, y fue corroborado experimentalmente preparando la membrana optimizada. Las gráficas de cantidad acumulada en función del tiempo para parche-EPD y parche-membrana optimizada se muestran en la Figura 4.7.

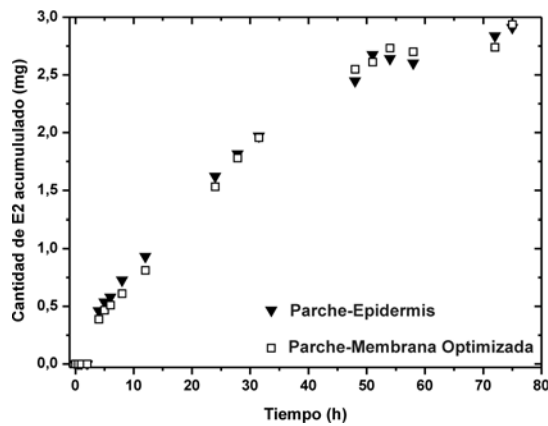


Figura 4.7: Cantidad de E2 acumulado en función del tiempo para Parche-EPD y Parche-Membrana Optimizada.

En la gráfica de la Figura 4.7 puede observarse que el procedimiento de optimización permitió preparar una membrana de QUI que reproduce la cantidad de E2 acumulado en función del tiempo para parche-EPD. Por otra parte, el perfil de la membrana optimizada fue comparado con el perfil de EPD de acuerdo a una aproximación independiente de modelos utilizando el *factor de diferencia* (f1) y el *factor de similitud* (f2). Como se mencionó, valores de f1 menores a 15 (0 – 15) y valores de f2 mayores a 50 (50 – 100) indican similitud entre los perfiles. Los valores de f1 y f2 fueron 5.18 % y 74.5 % respectivamente, mostrando una equivalencia entre ambos perfiles. Además se realizó un balance de masa al final de los ensayos. El E2 total recuperado fue 96.7 % para los ensayos con el parche solo, y 97.9 % y 96.8 % para el ensayo con EPD y la membrana optimizada respectivamente. Esto permite demostrar la buena calidad de los experimentos.

lordanskii y col. (2000) utilizaron un sistema compuesto por una matriz de hidrogel adhesiva y una membrana de carboxil con propiedades de barrera. Estos autores, reportaron que hubo una modificación en la estructura de la membrana cuando la misma se expuso a la solución receptora y al sistema terapéutico transdermal de naturaleza hidrofílica. Este suceso denominado *plastificación* pudo ocurrir como consecuencia de dos causas, una de ellas según los autores fue la transferencia de moléculas de agua al interior de las membranas desde la solución receptora lo que provocó la hidratación de la misma y consecuentemente, una modificación en la propiedad barrera y un incremento en la difusividad de la droga. En las experiencias realizadas en esta tesis las membranas epidermales y de QUI, fueron acondicionadas por remojo en la mezcla receptora toda la noche previa al ensayo de liberación. Este acondicionamiento, permitió a las membranas de QUI alcanzar el equilibrio en el contenido de agua antes de la experiencia de liberación, según los resultados reportado en el capítulo 2. La gráfica de la Figura 4.7 muestra la presencia de un *tiempo de latencia* (del inglés, *lag time*) para la EPD y la membrana optimizada, indicando que ambas membranas mantuvieron su propiedad barrera y por lo tanto su función como controladoras de la difusión del E2; a diferencia de lo reportado por lordanskii y col. (2000).

1.3.1.3.2 Aplicación de la membrana optimizada al desarrollo de un sistema de liberación de estradiol

Una vez obtenida la membrana optimizada se procedió a evaluar su aplicación en el desarrollo de un sistema de liberación de E2. Con este propósito, un sistema a base de QUI para liberación de E2 fue preparado (film de QUI conteniendo E2 unido a una película adhesiva). La Figura 4.8 muestra, Sistema A: film de QUI unido a la película adhesiva y Sistema B: film de QUI unido a la película adhesiva más la membrana optimizada (Figura 4.8-a); y ambos sistemas dispuestos en el vaso durante el ensayo de liberación – absorción (Figuras 4.8-b y c).

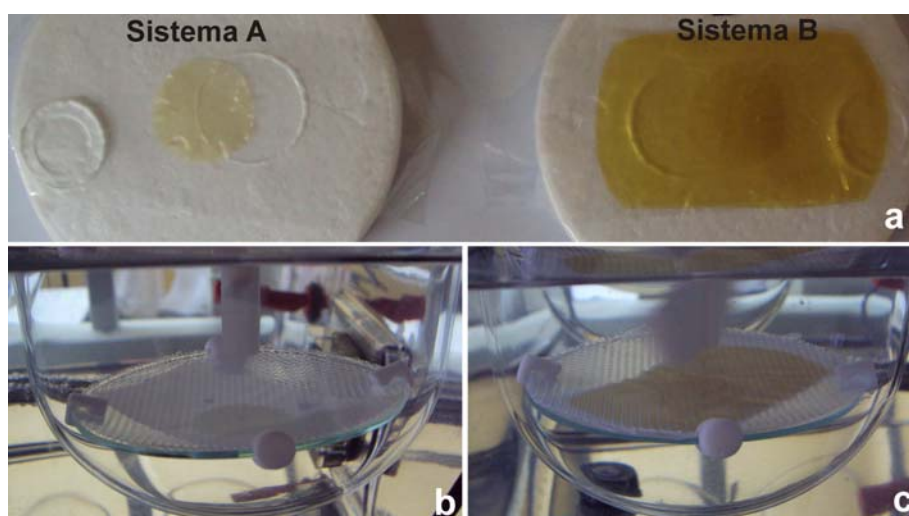


Figura 4.8: a) Sistema A: film para liberación de E2, Sistema B: film para liberación de E2 más membrana optimizada, b y c) Sistemas A y B, respectivamente durante un ensayo de liberación – absorción.

Las gráficas de cantidad acumulada en función del tiempo para los Sistemas A y B se muestran en la Figura 4.9-a y 9-b, respectivamente. Los perfiles de liberación presentan un cierto grado de similitud en sus partes, con respecto a aquellos obtenidos para el parche comercial solo y el parche más la membrana optimizada. El perfil del Sistema A (Figura 4.9-a) y el del parche comercial (Figura 4.3), muestran una zona de crecimiento lineal y luego una meseta. El perfil del Sistema B (Figura 4.9-b) y el del parche comercial más la membrana optimizada (Figura 4.7), presentan un tiempo de latencia, una zona de crecimiento lineal y una meseta. No obstante, las diferencias que existen entre los perfiles pueden deberse a que las masas iniciales de E2 son distintas y a los excipientes que contienen las formulaciones y que modifican la velocidad de liberación. Según información del fabricante, el parche comercial contiene E2 en una matriz compuesta por polímero acrílico, resina sintética, propilenglicol, ácido oleico, butilhidroxitolueno y butilhidroxianisol. Mientras que la formulación preparada

en esta tesis comprende E2, QUI, poloxamer y glicerol. Los excipientes y la forma en la que se encuentra el E2 en la matriz; afectan el reparto de la droga hacia la membrana optimizada, el coeficiente de permeabilidad y por lo tanto la velocidad de liberación.

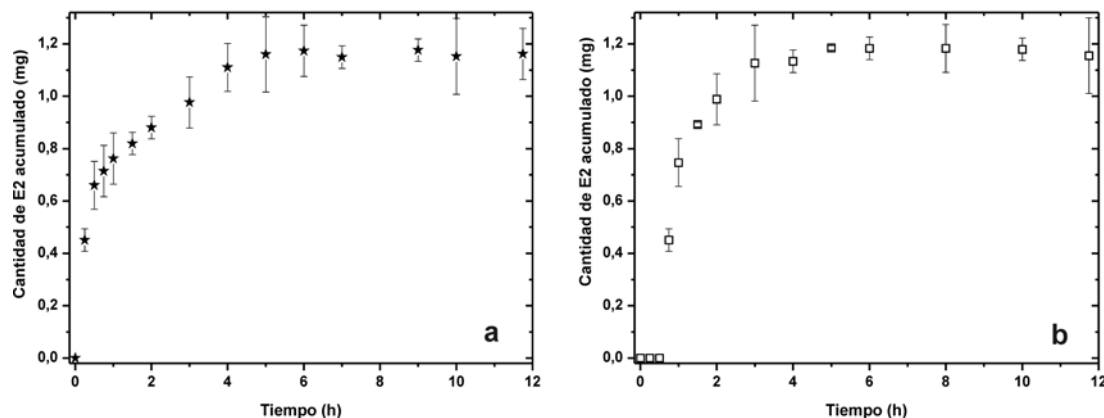


Figura 4.9: Cantidad de E2 acumulado en función del tiempo, a) Sistema A: film para liberación de E2 y b) Sistema B: film para liberación de E2 más membrana optimizada.

Los espectros de IR de films de QUI, sin y con E2, y del E2 se muestran en la Figura 4.10. Al comparar los espectros se observaron diferencias en las regiones comprendidas entre $2750 - 3500$, 2300 y $1100 - 1500$ cm^{-1} entre los films sin y con E2.

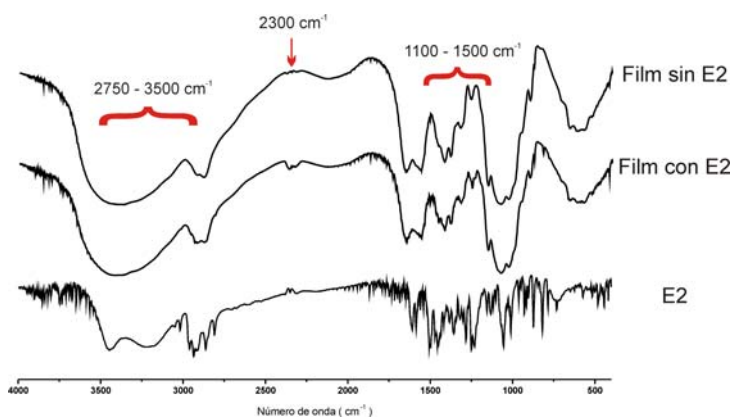


Figura 4.10: Espectros de IR de films sin E2, con E2 y de E2.

En la región $2750 - 3500$ cm^{-1} los picos característicos del E2 (O-H $3200 - 3400$ y CH_3 $2700 - 3000$) coinciden con los del polímero, no obstante se observan diferencias. En la región $1100 - 1500$ cm^{-1} ocurre lo mismo, las señales de grupos O-H, C-H y CH_3 del polímero coinciden con las señales de los cicloalcanos y grupos CH_3 del E2, aunque algunas diferencias en las formas e intensidades de los picos son visibles. Debido a interferencias causadas por las intensas señales del polímero, y ya que QUI y E2

comparten varios grupos funcionales no es posible extraer otro tipo de información de este ensayo.

Las micrográficas de films para liberación de E2 obtenidas mediante observación por Microscopía Electrónica de Barrido en magnificación x 780 y x 7800, se muestran en la Figura 4.11. Las micrográficas 4.11-a y b, corresponden al film de QUI sin E2 y las micrográficas 4.11-c y d, al film con E2.

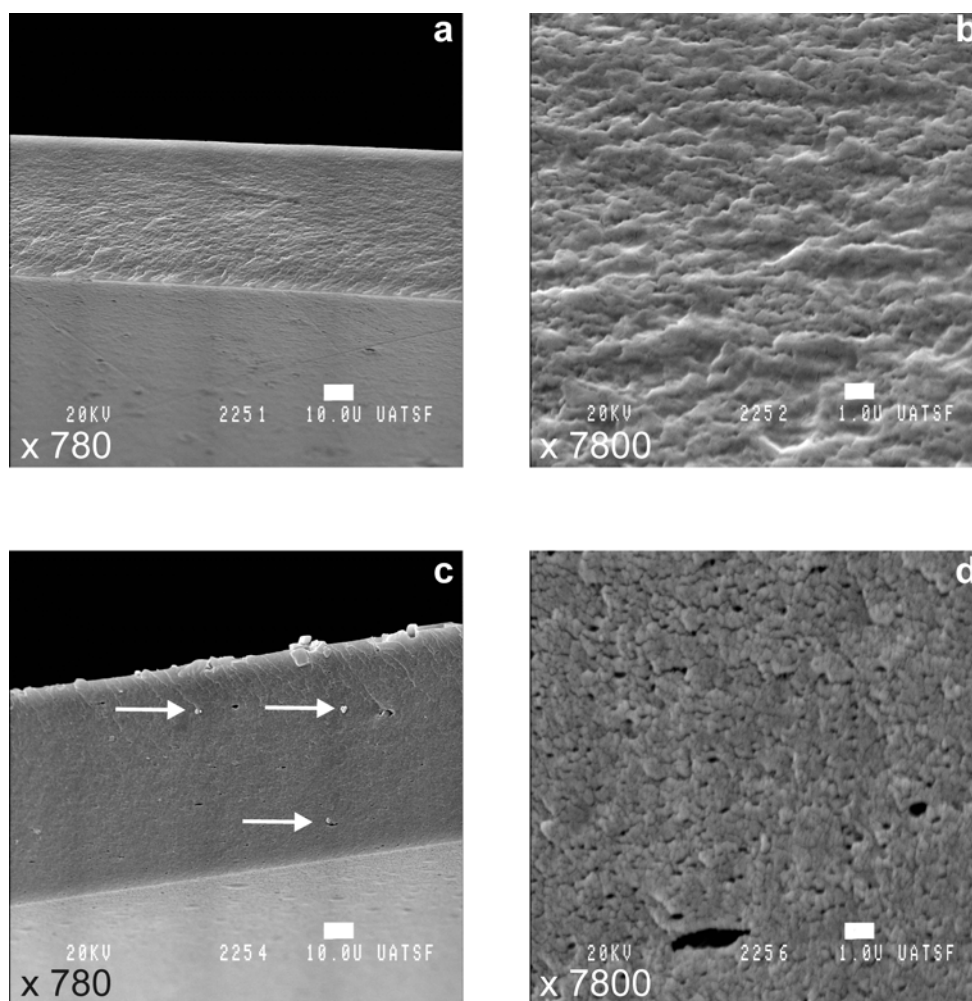


Figura 4.11: Micrográficas de, a y b) Films de QUI sin E2, c y d) Films con E2.

En las micrográficas se observa una estructura rugosa y porosa. Esto es debido a la presencia de etanol en el momento de la formación de la membrana. El etanol es un *no solvente* del QUI y al igual que la acetona, son utilizados como agentes formadores de poros en los casos en los que el polímero es soluble en soluciones acuosas. En la micrografía 4.11-c y en la Figura 4.12 (magnificación x 2400) se observan (señaladas con flechas) micropartículas de E2 recubiertas de poloxamer. Estas micropartículas también fueron reportadas para el sistema paclitaxel-poloxamer en el trabajo de Dhanikula y Panchagnula (2004).

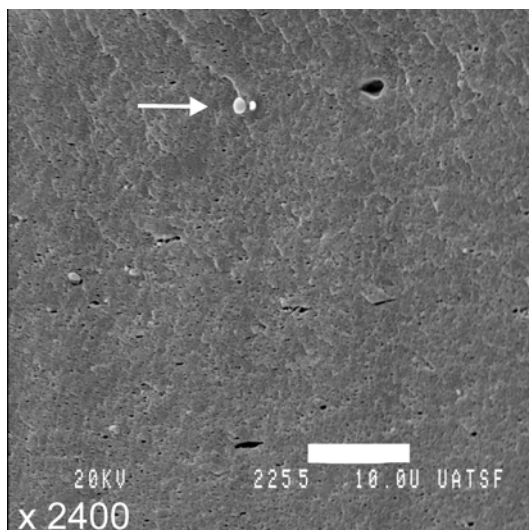


Figura 4.12: Micrografía de film de QUI con E2, detalle de micropartícula de E2 recubierta de poloxamer.

El parche Trial Sat[®] fue diseñado para administrar 0.05 mg de E2 cada 24 horas, durante un período de 3 a 4 días. Las concentraciones plasmáticas promedio de E2 producidas por esta dosis estuvieron comprendidas durante ese lapso en el rango de 0.04 – 0.07 ng mL⁻¹, descendiendo a los niveles basales 24 horas después de retirado el parche (datos suministrados en el prospecto del medicamento). Para la mayoría de los medicamentos, se necesita un cierto nivel del fármaco en el torrente sanguíneo para obtener el efecto deseado. Algunos medicamentos son nocivos si el nivel aumenta demasiado y no son efectivos si sus niveles son demasiado bajos. Los niveles terapéuticos en sangre para E2 son 0.04 – 0.06 ng mL⁻¹ mientras que el clearance es 615 – 790 L h⁻¹ (Naik y col., 2000). Por lo que las concentraciones plasmáticas alcanzadas con el parche comercial según datos del fabricante, cubren los niveles terapéuticos. Minghetti y col. (1999) reportaron que los datos de estudios de permeabilidad *in vitro* con EPD (flujo máximo en unidades de mg cm⁻² h⁻¹) pueden utilizarse para estimar la velocidad de entrada de la droga en la circulación sistémica, y por lo tanto es posible evaluar los niveles plasmáticos alcanzables en EE (ng mL⁻¹), combinando los datos experimentales y los valores de clearance (L h⁻¹) de la droga según la siguiente ecuación:

Ecuación 4.3

$$C_{EE} = \frac{\text{Flujo Máximo} \cdot \text{Área del dispositivo}}{\text{Clearance}}$$

El flujo de E2 obtenido para parche comercial-EPD fue 0.0589 mg h^{-1} , por lo que a través de la Ecuación 4.3 se puede calcular una concentración plasmática a alcanzar y sería igual a 0.08 ng mL^{-1} , que es muy similar a lo reportado por el fabricante del parche ($0.04 - 0.07 \text{ ng mL}^{-1}$). Este resultado refuerza aún más la buena calidad de los experimentos realizados. Por otra parte, la porción recta de la gráfica en la Figura 4.9-b se ajustó con un modelo lineal. El valor de la pendiente de la ecuación de ajuste es el valor flujo para film para liberación de E2 más membrana optimizada y fue 0.8481 mg h^{-1} . Utilizando la Ecuación 4.3 se obtuvo un valor de concentración plasmática alcanzable de 1.2 ng mL^{-1} , y que cubre ampliamente los niveles terapéuticos requeridos para E2 ($0.04 - 0.06 \text{ ng mL}^{-1}$).

Estos resultados demostraron que la membrana de QUI optimizada que reproduce la cantidad de E2 acumulado en función del tiempo (flujo) para parche-EPD puede ser utilizada para el desarrollo de un sistema de administración transdermal. Además, este sistema provee una herramienta con potencial utilidad en el modelado matemático de los fenómenos de transporte durante estudios de absorción.

1.4 CONCLUSIONES

- Se determinó el valor de cantidad de E2 acumulado por unidad de tiempos y de K_p para fragmentos de EPD obtenidos a partir de la piel completa de 1 paciente. Los valores de K_p son del orden de los reportados en la bibliografía.
- La aplicación de un diseño experimental de superficies de respuesta y de la función deseabilidad durante el proceso de optimización permitió calcular las condiciones experimentales óptimas para preparar una membrana de QUI que reproduce el perfil de liberación – absorción obtenido para EPD.
- El desarrollo de un prototipo de sistema de administración transdermal y su evaluación en estudios de liberación – absorción permitió obtener perfiles semejantes a los obtenidos con parches comerciales y la membrana optimizada. Este ensayo indicó que la membrana optimizada puede ser utilizada en las etapas tempranas del proceso de desarrollo de un sistema de administración transdermal.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

La droga 17 β -estradiol fue seleccionada para el desarrollo de este trabajo de tesis debido a su uso extensivo y a la alta relevancia en la terapia hormonal. El estudio de los procesos difusivos de esta droga a través de fragmentos de epidermis humana y a través de membranas de quitosan, fue la base para el desarrollo de un sistema de administración transdermal de estradiol. Para realizar los estudios de los procesos de difusión se trabajó con la celda vertical de Franz y el equipo para ensayos de disolución.

Si bien en la actualidad la nanotecnología está tomando relevancia, la tecnología de membranas continua teniendo importantes aplicaciones en medicina y farmacia (Stamatialis y col., 2008). Sólo por mencionar algunos ejemplos:

- Sistemas de liberación controlada de drogas (capas protectoras impermeables, reservorios, capa que controla la liberación, cubierta adhesiva y matriz) son todas membranas a base de polímeros.
- La insuficiencia renal requiere de diálisis en donde básicamente la sangre se extrae del cuerpo y pasa a través de una membrana que elimina los desechos y líquidos adicionales, para regresar luego al cuerpo.
- Membranas que permiten la oxigenación extracorpórea de la sangre y se utilizan en ocasiones donde los pulmones del paciente no pueden funcionar correctamente.
- Membranas para hígados artificiales, que partiendo del mismo principio que la diálisis realizan labores de limpieza del plasma a la vez que le aportan determinados componentes capaces de compensar el mal funcionamiento del órgano.
- Membranas para ingeniería de tejidos, como soporte para el crecimiento de células.

Para lograr los objetivos de esta tesis y poner a punto un modelo experimental *in vitro* para el diseño de un sistema de administración transdermal, se trabajó con membranas de quitosan. Se utilizaron herramientas quimiométricas ya que la manipulación controlada de ciertas variables de formulación mediante el diseño estadístico de experimentos puede llevar a la preparación de una membrana con una dada composición (membrana optimizada) de modo de lograr con ella el mismo flujo que se obtuvo con un fragmento de epidermis humana. Tanto en la celda vertical de Franz como en el equipo para ensayos de disolución se realizaron diseños experimentales con el objetivo de obtener un modelo estadístico que relacione la

variable respuesta (cantidad de estradiol por unidad de tiempo) con variables independientes que se pueden controlar durante la preparación de las membranas. El modelo obtenido en la celda no se pudo aplicar al diseño de una membrana optimizada, probablemente porque el valor de respuesta deseado no estuvo incluido en el rango para el cual se obtuvo el modelo o porque éste no tiene en cuenta otros factores concernientes a la preparación de las membranas o propios del sistema, y que tienen una influencia significativa en el flujo de estradiol. Por otra parte, el modelo obtenido en el equipo para ensayos de disolución permitió encontrar las condiciones experimentales para preparar una membrana optimizada. Si bien los niveles de las variables independientes son muy similares entre los 2 sistemas, existen diferencias en los resultados ya que por ejemplo, el tiempo de entrecruzamiento que afectó en forma significativa la respuesta en la celda no lo hizo en el equipo para ensayos de disolución. Aunque sí se mantuvo el tipo de influencia, un aumento del tiempo de entrecruzamiento llevó en ambos casos a un aumento del flujo de estradiol. Estas diferencias se deben seguramente a las características propias de cada sistema: en la celda se da la partición de la droga entre una solución y la membrana, mientras que en el equipo para ensayos de disolución, es entre un sistema polimérico que contiene la droga y la membrana. En la celda además, el fluido del compartimiento receptor es mantenido termostáticamente a 37.0 °C y bajo agitación moderada, no así el compartimiento donante; en el otro sistema si bien la droga en el interior del parche tampoco se encuentra en agitación, es un sólo compartimiento y todo el sistema está a la misma temperatura. Las burbujas de aire pueden disminuir la cantidad de droga difundida. En la celda, de formarse estas burbujas quedan depositadas debajo de la membrana, en el otro sistema estas burbujas por acción de la agitación ascienden a la superficie del líquido y desaparecen. Si bien en la celda se trabajó con oclusión del compartimiento donante, en la mayoría de los ensayos no se recuperó el total de volumen, de modo que un 5.0-8.0 % del líquido se evaporó durante el ensayo. Esto ocasionó una concentración de la droga en la solución donante, aunque al mismo tiempo iba siendo agotada a medida que difundía. De todos modos este comportamiento no ocurre en el equipo de disolución.

El uso de diseños estadísticos de experimentos presenta ventajas: versatilidad, disminución del número de experiencias y por lo tanto del tiempo de experimentación y costos, programación ordenada de experiencias; pero las membranas optimizadas son únicas para una dada epidermis y droga. Es decir, una membrana de quitosán con una composición particular optimizada no puede ser usada para simular el flujo de cualquier droga a través de cualquier epidermis.

Las *relaciones cuantitativas estructura - actividad* (QSARs, del inglés *Quantitative Structure-Activity Relationships*) son usadas generalmente para relacionar propiedades de compuestos con la actividad biológica. Cuando los QSARs son aplicados en la estimación de la absorción transdermal se los suele llamar *relaciones cuantitativas estructura - permeabilidad* (QSPRs o QSPeRs, del inglés *Quantitative Structure-Permeability Relationships*), y son relaciones lineales entre la permeabilidad de compuestos en estado estacionario y propiedades fisicoquímicas y/o estructurales de la molécula que permea (Moss y Cronin, 2002; Magnusson y col., 2004). La naturaleza estadística de dichas relaciones significa que mientras más datos se utilicen para derivar la relación, más confiable será la predicción que se obtenga de ella. La mayor parte de modelos QSPRs se realizaron para coeficientes de permeabilidad y tienen la forma general, $\text{Log } K_p = a - b + c$, donde a se relaciona con las propiedades hidrofílicas-hidrofóbicas y de partición de la droga en la piel, b con el peso molecular y c es un término independiente. También se han realizado QSPRs para flujos, en lugar de coeficiente de permeabilidad. Otras propiedades de las drogas que se pueden utilizar son el punto de fusión, solubilidad en agua y el número de átomos disponibles para formar enlaces de hidrógeno. Los primeros QSPRs aparecieron en la década de 1990 (Potts y Guy, 1992) y se han ido modificando al ampliarse las bases de datos disponibles para su elaboración. Por lo tanto, una alternativa a los modelos estadísticos obtenidos de diseños experimentales como los presentados en esta tesis, podrían ser modelos QSPRs realizados con una única membrana de polímero y una familia de compuestos. De esta manera en lugar de buscar a través de una optimización estadística una membrana que reproduzca en forma precisa y exacta un valor de respuesta, se podría utilizar siempre la misma membrana para predecir la potencial aplicación de una droga en forma transdermal. Esto sería en los primeros estudios que realiza un investigador en las etapas iniciales de desarrollo farmacéutico, y en caso de no disponer de ningún fragmento de piel o animal de experimentación.

Las experiencias adicionales realizadas con las membranas permitieron obtener más información sobre la relación entre propiedades de las membranas y del estradiol. Los resultados obtenidos sobre todo a través de los estudios de resonancia magnética nuclear pulsada permiten empezar a proponer ideas para entender el mecanismo mediante el cual el estradiol difunde o se libera desde una membrana de quitosán. Siendo los microporos hidrofóbicos en apariencia muy importantes en estos fenómenos de transporte.

En cuanto al modelo *in vitro* propuesto en esta tesis, los resultados obtenidos en el equipo para ensayos de disolución satisfacen ampliamente los objetivos propuestos. Además cubre las necesidades planteadas por otros autores sobre posibilidad de contar con una membrana que presente una función barrera y que pueda ser utilizada en ensayos de liberación. De hecho, modelos *in vitro* para simulación de determinados ambientes para el estudio de liberación controlada de drogas están siendo evaluados con éxito; como ejemplo simulación de ambiente intragástrico (Kalantzi y col., 2008) o incluso un soporte a base de quitosan que imita el microambiente de un tumor cerebral y permite el desarrollo de células malignas dando lugar a una plataforma casi ideal para el estudio de nuevos agentes terapéuticos o de nuevas formulaciones (Kievit y col., 2010). En cuanto al prototipo de parche desarrollado para liberación controlada de estradiol, éste presenta varios de los requisitos que debe cumplir un buen sistema transportador de droga:

- No tóxico ni irritante, a priori se sabe que el quitosan es un polímero biocompatible, y además ampliamente utilizado en la manufactura de sistemas de liberación. La formulación utilizada en esta tesis fue evaluada *in vivo* por otros autores (Dhanikula y Panchagnula, 2004) siendo la respuesta inflamatoria mínima.
- Es estable, una pérdida de peso del 5.0 % indicó una elevada estabilidad luego de la inmersión en la solución receptora toda la noche.
- Cosméticamente aceptable, el film es traslúcido y transparente y de una leve tonalidad amarilla.
- Farmacológicamente inerte, de la composición del mismo (quitosan, estradiol, poloxamer y glicerol) el único ingrediente activo es el estradiol.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Finalizar los ensayos con resonancia magnética nuclear pulsada con membranas sometidas a distintas temperaturas, tratadas con óxido de deuterio y en presencia de la hormona. Se deben realizar para poder establecer un mecanismo de transporte más completo.

Continuar trabajando en el desarrollo del sistema de administración transdermal y realizar ensayos de solubilidad de la hormona en la formulación para poder trabajar a concentraciones por encima de la saturación y de esa manera garantizar una liberación controlada de orden cero. Ensayar distintas cargas de droga y evaluar como se comporta la membrana optimizada frente a tales modificaciones. En el desarrollo de

este sistema, será importante la información obtenida de las experiencias de los Capítulos 3 y 4: la influencia del tiempo de entrecruzamiento en propiedades tales como contenido de agua y flujo de estradiol; y los excipientes utilizados en la formulación del film de liberación que modifican la velocidad de liberación.

REFERENCIAS

- Abraham, A. (1961) *The principles of nuclear magnetism*. The Clarendon Press, Oxford, Inglaterra.
- Ahlstrom, L.; Cross, S.; Mills, P. (2007) *The effects of freezing skin on transdermal drug penetration kinetics*. J Vet Pharmacol Therap 30: 456-463.
- Alemdaroglu, C.; Zelihagül, D.; Selebi, N.; Zor, F.; Oztürk, S.; Erdogan, D. (2006). *An Investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor*. Burns 32: 319-327.
- Annual Books of ASTM Standards. *Standard Practice for Diluted Solution Viscosity of Polymers*. (1993).
- Annual Books of ASTM Standards. *Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials*. (2005).
- Araujo, P.; Brereton R. (1996a) *Experimental Design I. Screening*. Trends Anal Chem 15: 26-31.
- Araujo, P.; Brereton R. (1996b) *Experimental Design II. Optimization*. Trends Anal Chem 15: 63-70.
- Balázs, N.; Sipos, P. (2007) *Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan*. Carbohydr Res 342: 124-130.
- Barry, B. (1983) Capítulo 1: *Structure, function, disease, and topical treatment of human skin*. Capítulo 2: *Basic principles of diffusion through membranes*. Capítulo 4: *Properties that influence percutaneous absorption*. Capítulo 5: *Methods for studying percutaneous absorption*. En: *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*. (Ed: Swarbrick, J.) Marcel Dekker Inc., Nueva York, EEUU.
- Barry, B. (2001) *Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery*. Eur J Pharm Sci 14: 101-114.
- Bautista-Baños, S.; Hernández-Lauzardo, A.; Velázquez-del Valle, M.; Hernández-López, M.; Barka, E.; Bosquez-Molina, E.; Wilson, C. (2006). *Chitosan as a potential natural compound to control pre and post harvest diseases of horticultural commodities*. Crop Protection 25: 108-118.
- Bella Cruz, A.; Surdi, M.; Cenci, M.; Rodriguez, C. (2008). *Tetracycline release from chitosan films*. Lat Am J Pharm 27: 360-363.
- Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.; Felt, O.; Peppas, N.; Gurny, R. (2004) *Structure and interactions in covalently and ionically cross-linked chitosan hydrogels for biomedical applications*. Eur J Pharm Biopharm 27: 19-34.
- Bettini, R.; Catellani, P.; Santi, P.; Massimo, G.; Peppas, N.; Colombo, P. (2001) *Translocation of drug particles in HPMC matrix gel layer: effect of drug solubility and influence on release rate*. J Control Release 70: 383-391.

- Bhumkar, D.; Pokharkar, V. (2006) *Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note*. AAPS PharmaSciTech 7: E1-E6.
- Bittelli, M.; Flury, M.; Campbell, G.; Nichols, E. (2001). *Reduction of transpiration through foliar application of chitosan*. Agric For Meteorol 107: 167-175.
- Bosman, I.; Lawant, A.; Avegaart, S.; Ensing, K.; de Zeeuw, R. (1996) *Novel diffusion cell for in vitro transdermal permeation, compatible with automated dynamic sampling*. J Pharm Biomed Anal 14: 1015-1023.
- Boulais, N.; Misery, L. (2007) *Merkel Cells*. J Am Acad Dermatol 57: 147-165.
- Braeken, L.; Ramaekers, R.; Zhang, Y.; Maes, G.; van der Bruggen, B.; Vandecasteele, C. (2005) *Influence on hydrophobicity on retention in nanofiltration of aqueous solutions containing organic compounds*. J Membr Sci 252: 195-203.
- Bronaugh, R.; Brown, R.; Bunge, A.; Driver, J.; Flynn, G.; Gregg, B.; Guy, R.; Harnmerstrom, K.; Hoang, K.; Jarabek, A.; Kinerson, R.; Marzulli, F.; MaDougal, J.; Mostaghim, N.; Schaum, J. (1992) *Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications*. Exposure Assessment Group. Office of Health and Environmental Assessment. Environmental Protection Agency, EEUU. <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=30001L2F.txt>
- Burkatovskaya, M.; Tegos, G.; Swietlik, E.; Deminova, T.; Castano, A.; Hamblin, M. (2006). *Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice*. Biomaterials 27: 4157-4164.
- Capitani, D.; Crescenzi, V.; De Angelis, A.; Segre, A. (2001) *Water in hydrogels. An NMR study of water/polymer interactions in weakly cross-linked chitosan networks*. Macromolecules 34: 4136-4144.
- Cárcamo Gatica, C. (2005) *Preparación de films de complejo polieléctrolito quitosano-alginato y comparación de sus propiedades mecánicas y biológicas con films de quitosano*. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2005/carcamo_c/sources/carcamo_c.pdf
- Chen, G.; Gong, S.; Du, J.; Ma, R.; Zhou, R.; Liu, L. (1990) *Transdermal permeability of estradiol through human skin of different body regions in vitro*. Acta Pharmacol Sin 11: 57-59.
- Chen, R.; Hwa, H. (1996). *Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane*. Carbohydrate Polym 29: 353-358.
- Chi, F.; Cheng, W. (2006). *Use of Chitosan as Coagulant to Treat Wastewater from Milk Processing Plant*. J Polym Environ 14: 411-417.
- Chilcott, R.P.; Barai, N.; Beezer, A.E.; Brain, S.I.; Brown, M.B.; Bunge, A.L.; Burgess, S.E.; Cross, S.; Dalton, C.H.; Dias, M.; Farinha, A.; Finnin, B.C.; Gallagher, S.J.; Green, D.M.; Gunt, H.; Gwyther, R.L.; Heard, C.M.; Jarvis, C.A.; Kamiyama, F.; Kasting, G.B.; Ley, E.E.; Lim, S.T.; Mcnaughton, G.S.; Morris, A.; Nazemi, M.H.; Pellett, M.A.; Du Plessis, J.; Quan, Y.S.; Raghavan, S.L.; Roberts, M.; Romonchuk, W.; Roper, C.S.; Schenk, D.; Simonsen, L.; Simpson, A.; Traversa,

- B.D.; Trottet, L.; Watkinson, A.; Wilkinson, S.C.; Williams, F.M.; Yamamoto, A.; Hadgraft, J. (2005) *Inter and intralaboratory variation of in vitro diffusion cell measurements: An international multicenter study using quasi-standardized methods and materials*. J Pharm Sci 94: 632-638.
- Cordero, J.; Alarcon, L.; Escribano, E.; Obach, R.; Domenech, J. (1997) *A comparative study of the transdermal penetration of a series of nonsteroidal antiinflammatory drugs*. J Pharm Sci 86: 503-508.
- Córdoba-Díaz, M.; Nova, M.; Elorza, B.; Córdoba-Díaz, D.; Chantres, J.; Córdoba-Borrego, M. (2000) *Validation protocol of an automated in-line flow-through diffusion equipment for in vitro permeation studies*. J Control Release 69: 357-367.
- Costa, P.; Sousa Lobo, J.M. (2001) *Modeling and comparison of dissolution profiles*. Eur J Pharm Sci. 13: 123-133.
- Cross, S.; Magnusson, B.; Winckle, G.; Anissimov, Y.; Roberts, M. (2003) *Determination of the Effect of Lipophilicity on the in vitro Permeability and Tissue Reservoir Characteristics of Topically Applied Solutes in Human Skin Layers*. J Invest Dermatol 120: 759-764.
- Del Río Armas, L. (2002). *Obtención y caracterización de películas de quitosana para ser utilizadas como matrices para la dosificación de los principios activos: Tramadol y Vimang*. Trabajo de Diploma, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba.
- Derringer, G.; Suich, R. (1980). *Simultaneous optimization of several response variables*. J Qual Technol 12: 214-219.
- Dhanikula, A.; Panchagnula, R. (2004). *Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel*. AAPS J 6: 1-12.
- Díez-Sales, O.; Pérez-Sayas, E.; Martín-Villodre, A.; Herráez-Domínguez, M. (1993) *The prediction of percutaneous absorption: I. Influence of the dermis on in vitro permeation models*. Int J Pharm 100: 1-7.
- Dureja, H.; Tiwary, A.; Gupta, S. (2001). *Simulation of skin permeability in chitosan membranes*. Int J Pharm 213: 193-198.
- Elias, P.M. (1981) *Epidermal Lipids, membranes, and keratinization*. Int J Dermatol 20: 1-19.
- El-Malah, Y.; Nazzal, S.; Khanfar, N. (2006) *D-Optimal mixture design: optimization of ternary matrix blends for controlled zero-order drug release from oral dosage forms*. Drug Dev. Ind. Pharm. 32: 1207-1218.
- European Commission. Health & Consumer Protection Directorate (2004) *Guidance Document on Dermal Absorption*. http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/guidance/wrkdoc20_rev_en.pdf
- Feldstein, M.M.; Raigorodskii, I.M.; Iordanskii, A.L.; Hadgraft, J. (1998). *Modeling of percutaneous drug transport in vitro using skin-imitating Carbosil membrane*. J Control Release 52: 25-40.

- Flynn, G.; Yalkowsky, S.; Roseman, T. (1974) *Mass transport phenomena and models: theoretical concepts*. J Pharm Sci 63: 479-510.
- Food and Drug Administration (FDA) (1997) *Guidance for Industry, Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070237.pdf>
- Food and Drug Administration (FDA) (2001) *Guidance for Industry. Bioanalytical method validation*. U.S. Department of Health and Human Services. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>
- Franz, T. (1975) *Percutaneous Absorption: on the relevance of in vitro data*. J Invest Dermatol 69: 190-195.
- Franz, T.; Lehman, P.; Franz, S.; North-Root, H.; Demetrulias, J.; Kelling, C.; Moloney, S.; Gettings, S. (1993) *Percutaneous Penetration of N-Nitrosodiethanolamine through human skin (in vitro): Comparison of Finite and Infinite Dose Applications from Cosmetic Vehicles*. Fundamental and Applied Toxicology 21: 213-221.
- Galey, W.; Lonsdale, H.; Nacht, S. (1976) *The in Vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water*. J Invest Dermatol 67: 713-717.
- Geneser, F. (1993) Capítulo 17: *Piel*. En: *Histología*. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España.
- Grupo de trabajo de menopausia y postmenopausia. *Guía de práctica clínica sobre la menopausia y postmenopausia* (2004) Barcelona: Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, Asociación Española para el Estudio de la Menopausia, Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria y Centro Cochrane Iberoamericano. <http://www.cochrane.es/files/GPC-menopausia- definitiva.pdf>
- Gupta, D.; Haile, A. (2007). *Multifunctional properties of cotton fabric treated with chitosan and carboxymethyl chitosan*. Carbohydrate Polym 69: 164-171.
- Guy, R.; Hadgraft, J. (2003) Capítulo 1: *Feasibility assessment in topical and transdermal delivery: mathematical models and in vitro studies*. En: *Transdermal Drug Delivery*. (Ed.: Swarbrick, J.) Marcel Dekker Inc., New York, EEUU.
- Hamed, E.; Sakr, A. (2001) *Application of multiple response optimization technique to extended release formulations design*. J. Control. Release 73: 329-338.
- Harish Prashanth, K.; Tharanathan, R. (2005). *Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis*. Biochim Biophys Acta 1722: 22-29.
- Hirai, A.; Odani, H.; Nakajima, A. (1991) *Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy*. Polymer Bulletin 26: 87-94.
- Hopke, P. (2003) *The evolution of chemometrics*. Anal Chim Acta 500: 365-377.
- Hou, S.Y.; Mitra, A.K.; White, S.H.; Menon, G.K.; Ghadially, R.; Elias, P.M. (1991) *Membrane structures in normal and essential fatty acid-deficient stratum corneum: characterization by ruthenium tetroxide staining and x-ray diffraction*. J Invest Dermatol 96:215-223.

- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human use. ICH Harmonised Tripartite *Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology*. (2005). <http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q2A>
- Iordanskii, A.L.; Feldstein, M.M.; Markin, V.S.; Hadgraft, J.; Plate, N.A. (2000). *Modeling of the drug delivery from a hydrophilic transdermal therapeutic system across polymer membrane*. Eur J Pharm Biopharm 49: 287-293.
- Jiang, H.; Kim, Y.; Arote, R.; Nah, J.; Cho, M.; Choi, Y.; Akaike, T.; Cho, C. (2007). *Chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier*. J Control Release 117: 273-280.
- Johnson, M.; Blankschtein, D.; Langer, R. (1995) *Permeation of steroids through human skin*. J Pharm Sci 84: 1144-1146.
- Kalantzi, L.; Page, R.; Nicolaidis, E.; Digenis, G.; Reppas, P. (2008) *In vitro methods can forecast the effects of intragastric residence on dosage form performance*. Eur J Pharm Sci 33: 445-451.
- Kanitakis, J. (2002) *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*. Eur J Dermatol 12: 390-401.
- Khan, T.; Peh, K.; Ching, H. (2002) *Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods*. J Pharm Pharmaceut Sci 5: 205-212.
- Kielhorn, J.; Melching-Kollmub, S.; Mangelsdorf, I. (2005) *International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria: Dermal Absorption*. World Health Organization. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc235.pdf>
- Kievit, F.; Florczyk, S.; Leung, M.; Veiseh, O.; Park, J.; Disis, M.; Zhang, M. (2010) *Chitosan-alginate 3D scaffolds as a mimic of the glioma tumor microenvironment*. Biomaterials 31: 5903-5910.
- Kim, D.; Jeong, Y.; Choi, C.; Rohb, S.; Kangc, S.; Jang, M.; Naha, J. (2006). *Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles*. Int J Pharm 319: 130-138.
- Kumagai, H.; Mac Naughtan, W.; Farhat, I.; Mitchell, J. (2002) *The influence of carrageenan on molecular mobility in low moisture amorphous sugars*. Carbohydrate Polymers 48: 341-349.
- Kurita, K. (2006). *Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans*. Marine Biotechnol 8: 203-226.
- Lárez Velásquez, C. (2003). *Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos*. Rev Iberoamer Polim 4: 91-109.
- Lárez Velásquez, C. (2006). *Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro*. Avances en Química 1: 15-21.
- Lavertu, M.; Xia, Z.; Serreji, A.; Berrada, M.; Rodrigues, A.; Wang, D.; Buschmann, M.; Gupta, A. (2003) *A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan*. J Pharm Biomed Anal 32: 1149-1158.

- Lim, L.Y.; Wan, L.S.C. (1995). *Heat treatment of chitosan films*. Drug Dev Ind Pharm 21: 839-846.
- Lundstedt, T.; Seifert, E.; Abramo, L.; Thelin, B.; Nyström, A.; Pettersen, J.; Bergman, R. (1998) *Experimental design and optimization*. Chemometr Intell Lab Syst 42: 3-40.
- Magnusson, B.; Pugh, W.; Roberts, M. (2004) *Simple Rules Defining the Potential of Compounds for Transdermal Delivery or Toxicity*. Pharm Res 21:1047-1054.
- Malgor, L.A.; Valsecia, M.E. (2000) *Farmacología Médica*. Volumen 1: *Farmacología General y del Sistema Nervioso Autónomo*. Capítulo 2: *Farmacología General*. *Farmacocinética*
http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma/indice_v1.htm
- Massart, D.; Vandeginste, B.; Buydens, S.; De Jong, S.; Lewi, P.; Smeyers-Verbeke, J. (1997) Capítulo 8: *Straight Line Regression and Calibration*. En: *Handbook of chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Elsevier, Amsterdam, Países Bajos.
- Mc Daniel, W. (1991) Method 200.3 *Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements in biological tissues*. Environmental Services Division, U.S. Environmental Protection Agency, 23-29.
<http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=20017TYT.txt>
- Megrab, N.; Williams, A.; Barry, B. (1995) *Oestradiol permeation across human skin, silastic and snake membranes: the effects of ethanol/water co-solvent systems*. Int J Pharm 116: 101-112.
- Mello, R.; Bedendo, G.; Nome, F.; Fiedler, F.; Laranjeira, M. (2006). *Preparation of chitosan membranes for filtration and concentration of compounds under high pressure process*. Polym Bull 56: 447-454.
- Minghetti, P.; Casiraghi, A.; Montanari, L.; Monzani, M. (1999) *In vitro skin permeation of Sinitrodil, a member of a new class of nitrovasodilatador drugs*. Eur. J. Pharm. Sci. 7: 231 – 236.
- Montgomery, D. (1991). Capítulo 1: *Introducción*. Capítulo 16: *Métodos y diseños de superficie de respuesta*. En: *Diseño y análisis de experimentos*. Grupo Editorial Iberoamericana, México.
- Moore, J.W.; Flanner, H.H. (1996) *Mathematical comparison of dissolution profiles*. Pharm. Tech. 20: 64-74.
- Moss, G.; Cronin, M. (2002) *Quantitative structure–permeability relationships for percutaneous absorption: re-analysis of steroid data*. Int J Pharm 238: 105-109.
- Myers, R.H.; Montgomery, D. (1995). Capítulo 6: *The analysis of Response Surfaces*. En: *Response Surface Methodology*. A Wiley Interscience Publication John Wiley and Sons. INC, Nueva Jersey, EEUU.
- Naik, J.; Kalia, Y.; Guy, R. (2000) *Transdermal Drug Delivey: overcoming the skin's barrier function*. PSTT 3: 318 – 326.
- Neto, C.; Dantas, T.; Fonseca, J.; Pereira, M. (2005). *Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly(ethylene oxide) addition*. Carbohydrate Research 340: 2630-2636.

- Nghiem, L.; Schäfer, A.; Waite, T. (2002) *Adsorptive interactions between membranes and trace contaminants*. Desalination 147: 269-274.
- Nghiem, L.; McCutcheon, J.; Schäfer, A.; Elimelech, M. (2004) *The role of endocrine disruptors in water recycling: risk or mania?* Water Sci Technol 50: 215-220.
- Nogales, A.; Ezquerra, T.A.; Rueda, D.R.; Martínez, F.; Retuert, J. (1997). *Influence of water on the dielectric behaviour of chitosan films*. Colloid Polym Sci 275: 419-425.
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (2004a). *Guidance document for the conduct of skin absorption studies*. OECD Series on testing and assessment. Number 28.
[http://apli1.oecd.org/olis/2004doc.nsf/linkto/env-jm-mono\(2004\)2](http://apli1.oecd.org/olis/2004doc.nsf/linkto/env-jm-mono(2004)2)
- Potts, R.O.; Francoeur, M.L. (1991) *The influence of stratum corneum morphology on water permeability*. J Invest Dermatol 96: 495-499.
- Rana, V.; Babita, K.; Goyal, D.; Tiwary, A. (2004) *Optimization of chitosan films as a substitute for animal and human epidermal sheets for in vitro permeation of polar and non polar drugs*. Acta Pharm 54: 287-299.
- Rana, V.; Babita, K.; Goyal, D.; Tiwary, A. (2005). *Sodium citrate crosslinked chitosan films: optimization as substitute for human/rat/rabbit epidermal sheets*. J Pharm Pharmaceut Sci 8: 10-17.
- Ravi Kumar, M. (2000). *A review of chitin and chitosan applications*. React Funct Polym 46: 1-27.
- Remuñán-López, C.; Bodmeier, R. (1997) *Mechanical, water uptake and permeability of cross-linked chitosan glutamate and alginate films*. J Control Release 44: 215-225.
- Retuert, J.; Fuentes, S.; González, G.; Benavente, R. (2000). *Thermal Effect on the Microhardness of Chitosan Films*. Bol Soc Chil Quim 45: 323-327.
- Rhazi, M.; Desbrieres, J.; Tolaimate, A.; Rinaudo, M.; Vottero, P.; Alagui, A.; El Meray, M. (2002). *Influence of the nature of the metal ions on the complexation with chitosan. Application to the treatment of liquid waste*. Europ Polym J 38: 1523-1530.
- Ritthidej, G.; Phaexhamud, T.; Koizumi, T. (2002). *Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films*. Int J Pharm 232: 11-22.
- Ruan, R.; Chen, P. (1998) Capítulo 1: *Nuclear Magnetic Resonance Techniques*. Capítulo 2: *Aspects of water in food and biological systems*. Capítulo 3: *Rapid determination of moisture contents in food and biological materials*. En: *Water in food and biological materials*. Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, EEUU.
- Ruel-Gariepy, E.; Leclair, G.; Hildgen, P.; Gupta, A.; Leroux, J-C. (2002) *Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules*. J Controlled Release 82: 373-383.

- Sathivel, S.; Liu, Q.; Huang, J.; Prinyawiwatkul, W. (2007). *The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (Oncorhynchus gorbuscha) fillets during frozen storage*. J Food Eng 83: 366-373.
- Senel, S.; McClure, S. (2004). *Potential applications of chitosan in veterinary medicine*. Adv Drug Deliv Rev 56: 1467-1480.
- Scheuplein, R.J.; Blank, I.H. (1971) *Permeability of the skin*. Physiol Rev 51: 702-747.
- Schmook, F.; Meingassner, J.; Billich, A. (2001) *Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in vitro percutaneous absorption*. Int J Pharm 215: 51-56.
- Scott, R.; Walker, M.; Dugard, P. (1986) *In vitro percutaneous absorption experiments: A technique for the production of intact epidermal membranes from rat skin*. J Soc Cosmet Chem 37: 35-41.
- Scott, R.; Dugard, P.; Ramsey, J. (1987) *In vitro absorption of some o-phthalate diesters through human and rat skin*. Environ Health Perspect 74: 223-227.
- Shah, J.; Kaka, I.; Tenjarla, S.; Lau, S.; Chow, D. (1994) *Analysis of percutaneous permeation data II. Evaluation of lag time method*. Int J Pharm 109: 283-290.
- Shu, X.; Zhu, K. (2002) *The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for control drug release*. Eur J Pharm Biopharm 54: 235-243.
- Srinivasa, P.; Ramesh, M.; Kumar, K.; Tharanathan, R. (2004). *Properties of chitosan films prepared under different drying conditions*. J Food Eng 63: 79-85.
- Stamatialis, D.; Papenburg, B.; Gironés, M.; Saiful, S.; Bettahalli, S.; Schmitmeier, S.; Wessling M. (2008) *Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering*. J Membr Sci 308: 1-34.
- Swarbrick, J.; Lee, G.; Brom, J. (1982) *Drug permeation through human skin: I. Effect of Storage conditions of skin*. J Invest Dermatol 78: 63-66.
- Thacharodi, D.; Panduranga Rao, K. (1995). *Development and in vitro evaluation of chitosan-based transdermal drug delivery systems for the controlled delivery of propranolol hydrochloride*. Biomaterials 16: 145-148.
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) (1996) Human Medicines Evaluation Unit. Note for Guidance on Quality of Modified Release Products: A. Oral Dosage Forms; B. Transdermal Dosage Forms; Section I (Quality).
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003664.pdf
- Thein Han, W.; Stevens, W. (2004). *Transdermal Delivery Controlled by a Chitosan Membrane*. Drug Dev Ind Pharm 30: 397-404.
- US Pharmacopeia 30, 2007a. US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, p. 285.
- US Pharmacopeia 30, 2007b. US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, p. 2074.

- van den Dries, I.; van Dusschoten, D.; Hemminga, M. (1998) *Mobility in maltose-water glasses studied with $^1\text{H-NMR}$* . J Phys Chem 102: 10483-10489.
- van den Dries, I.; van Dusschoten, D.; Hemminga, M.; van der Linden, E. (2000) *Effects of water content and molecular weight on spin probe and water mobility in malto-oligomers glasses*. J Phys Chem 104: 10126-10132.
- van de Sandt, J.J.M.; van Burgsteden, J.A.; Cage, S.; Carmichael, P.L.; Dick, I.; Kenyon, S.; Korinth, G.; Larese, F.; Limasset, J.C.; Maas, W.J.M.; Montomoli, L.; Nielsen, J.B.; Payan, J.P.; Robinson, E.; Sartorelli, P.; Schaller, K.H.; Wilkinson, S.C.; Williams, F.M. (2004) *In vitro skin predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study*. Regulatory Toxicology and Pharmacology 39: 271-281.
- Veiga Ochoa, M.; Ruiz Caro, R. (2004). *El Quitosano: usos farmacéuticos y biológicos*. Revista de la O.F.I.L. 14: 33-42.
- Vikhoreva, G.; Kildeeva, N.; Ustinov, M.; Nochevkina, Y. (2002). *Fabrication and Study of the Degradability of Chitosan Films*. Fibre Chem 34: 407-411.
- Vilchez Maldonado, S. (2005). *Nuevos Tratamientos de Lana con Enzimas*. Trabajo de Tesis Doctoral, Departamento de Tecnología de Tensioactivos del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales, Universidad de Barcelona, España. http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0619106-115304/00.SVM_PREVIO.pdf
- Villarino, N.F.; Landoni M.F. (2006) *Administración transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica*. Analecta Veterinaria 26:28-37.
- Vishu Kumar, A.; Varadaraj, M.; Lalitha, R.; Tharanathana, R. (2004). *Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization*. Biochim Biophys Acta 1670: 137-146.
- Wahid, A.; Sridhar, B.; Shivakumar, S. (2008) *Preparation and evaluation of transdermal drug delivery system of etoricoxib using modified chitosan*. Ind J Pharm Sci 70: 455-460.
- Wang, W.; Bo, S.; Li, S.; Qin, W. (1991) *Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation*. Int J Biol Macromol 13: 281-285.
- Wang, X.; Du, Y.; Fan, L.; Liu, H.; Hu, Y. (2005). *Chitosan- metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and Structure-activity study*. Polym Bull 55: 105-113.
- Warren, M. (2004) *A comparative review of the risks and benefits of hormone replacement therapy regimens*. Am J Obstet Gynecol 190:1141-1167.
- Webster, A.; Halling, M.; Grant, D. (2007). *Metal complexation of chitosan and its glutaraldehyde cross-linked derivative*. Carbohydrate Res 342: 1189-1201.
- Wu, B.; Houb, S.; Yin, F.; Li, J.; Zhao, Z.; Huang, J.; Chen, Q. (2007). *Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode*. Biosens Bioelectron 22: 838-844.

-
- Yamamoto, A.; Kawada, J.; Yui, T.; Ogawa, K. (1997). *Conformational Behavior of Chitosan in the Acetate Salt: An X-Ray Study*. *Biosci Biotech Biochem* 61: 1230-1232.
- Yanming, D.; Congyi, X.; Jianwei, W.; Mian, W.; Yusong, W.; Yonghong, R. (2001) *Determination of degree of substitution for N-acylated chitosan using IR spectra*. *Sci China* 44: 216-224.
- Yoo, J.W.; Lee, C.H. (2006) *Drug delivery systems for hormone therapy*. *J Control Release* 112: 1–14
- Zhang, Y.; Xue, C.; Xue, Y.; Gao, R.; Zhang, X. (2005) *Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction*. *Carbohydrate Research* 340: 1914-1917.
- Zotkin, M.; Vikhoreva, G.; Smotrina, T.; Derbenev, M. (2004). *Thermal Modification and Study of the Structure of Chitosan Films*. *Fibre Chem* 36: 16-20.