

23
2ej.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores

CUAUTITLAN



V N A M

EFFECTO DE ALGUNOS FACTORES FISICOQUIMICOS SOBRE LA
PERMEACION DE CLORHIDRATO DE AMILORIDA, CONTENIDO
EN UN SISTEMA IONTOFORETICO DE LIBERACION

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

Que para obtener el título de
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

presenta

LUCILA GARCIA CONTRERAS

Director de Tesis

M. en C. FERNANDO A. ALVAREZ NUÑEZ

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

	Página
Indice de figuras	i
Indice de tablas	iii
I. Introducción.	1
I.1. Antecedentes.	1
I.2. Sistemas transdérmicos de liberación	2
I.3. Sistemas iontoforéticos de liberación	4
I.3.1. Definición.	4
I.3.2. Piel	4
I.3.2.1. Comportamiento de la piel ante la temperatura	5
I.3.2.2. Propiedades eléctricas de la piel	6
I.3.3. Mecanismo de permeación de fármacos facilitada por Iontoforesis.	6
I.3.4. Factores que afectan la velocidad de permeación en Iontoforesis.	7
I.3.5. Componentes de Sistemas Iontoforéticos.	11
I.3.5.1. TPIS.	12
I.4. Modelos para transporte iontoforético	13
I.4.1. Consideraciones cinético-termodinámicas	17

I.4.1.1. Teoría del complejo activado.	17
I.4.2. Importancia de las consideraciones cinético-termodinámicas en Iontoforesis.	19
I.5. Diseño Paramétrico de Taguchi (DPT).	21
I.5.1. Arreglo Ortogonal (AO) de factores y niveles.	23
I.6. Características del Clorhidrato de Amilorida.	25
II. Planteamiento del problema y objetivos.	26
II.1. El problema.	26
II.2. Objetivos.	26
III. Materiales y Métodos.	27
III.1. Materiales.	27
III.1.1. Reactivos.	27
III.1.2. Material biológico.	27
III.1.3. Equipo.	27
III.2. Métodos.	28
III.2.1. Métodos experimentales.	29
III.2.1.1. Diagrama general de Ishikawa.	29
III.2.1.2. Desarrollo del aparato.	29
III.2.1.3. Curvas de calibración.	30
III.2.1.4. Pruebas preliminares.	30

III.2.1.4.1. Permeación con membrana sintética.	31
III.2.1.4.2. Permeación con membrana biológica.	31
III.2.2. Ponderación de variables.	32
III.2.3. Arreglo Ortogonal.	33
III.2.4. Parámetros cinético-termodinámicos de activación de permeación.	34
IV. Resultados.	36
IV.1. Resultados de los experimentos sugeridos por el A.O. $L9(3^4)$.	36
IV.2. Análisis estadístico.	38
IV.3. Resultados para el mejor experimento.	43
IV.3.1. Cantidad permeada contra tiempo.	43
IV.3.2. Fracción permeada contra tiempo y Ln de la fracción permeada contra tiempo.	45
IV.3.3. Flujo contra tiempo.	47
IV.4. Parámetros cinético-termodinámicos de activación de permeación.	48
V. Discusión.	49
V.1. Desarrollo del sistema	49
V.2. Comportamiento del sistema de permeación.	51
V.3. Efecto de las variables sobre la velocidad de permeación.	55

V.3.1. Efecto de la intensidad de corriente (Ic).	55
V.3.2. Efecto de la solución receptora (SR).	56
V.3.3. Efecto de la interacción IC/SR.	57
V.3.4. Efecto de la temperatura (T).	58
V.4. Consecuencias cinético-termodinámicas.	58
VI. Conclusiones.	62
VII. Anexo 1.	63
VIII. Bibliografía.	64

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Esquema de rutas probables de penetración de fármacos a piel.	7
Figura 2. TPIS (Sistema Transdérmico Iontoforético Periódico).	13
Figura 3. Gráfico del perfil de energía libre como función de la posición en una membrana.	15
Figura 4. Términos cinético-temodinámicos para un sistema de permeación de fármacos por iontoforesis.	20
Figura 5. Estructura del Clorhidrato de Amilorida.	25
Figura 6. Diagrama de secuencia experimental.	28
Figura 7. Diagrama general de Ishikawa para Clorhidrato de Amilorida.	29
Figura 8. Diagrama final de Ishikawa para Clorhidrato de Amilorida.	32
Figura 9. Gráfico de los efectos factoriales de las variables estudiadas sobre la K_p .	40
Figura 10. Gráfico de los efectos factoriales de las variables estudiadas sobre "n".	42
Figura 11. Cantidad permeada (Q) contra tiempo.	44
Figura 12. Fracción permeada contra tiempo.	45
Figura 13. Ln de la Fracción permeada contra Ln del tiempo.	46

Figura 14. Flujo contra tiempo.

47

Figura 15. Efectos factoriales de las variables estudiadas sobre el coeficiente de transporte, donde se marcan diferentes zonas de transporte.

54

Figura 16. Valores cinético-termodinámicos para el experimento con K^p mayor.

60

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1.	Arreglo Ortogonal L ₉ (3 ⁴).	24
Tabla 2.	Arreglo Ortogonal L ₉ (3 ⁴), con las variables experimentales y sus respectivos niveles para Clorhidrato de Amilorida.	33
Tabla 3.	Valores promedio de K _p y "n", para Clorhidrato de Amilorida.	37
Tabla 4.	Efecto promedio de los niveles de las variables estudiadas sobre la K _p para cada experimento.	38
Tabla 5.	Efecto promedio de los niveles de las variables estudiadas sobre "n" para cada experimento.	38
Tabla 6.	Análisis de varianza (ANOVA), de las constantes de velocidad de permeación, K _p , originadas por el AO L ₉ (3 ⁴), para Clorhidrato de Amilorida.	39
Tabla 7.	Análisis de varianza (ANOVA), de los coeficientes de transporte exponencial, "n", originadas por el AO L ₉ (3 ⁴), para Clorhidrato de Amilorida.	41
Tabla 8.	Valores promedio de cantidad permeada por cm ² , (Q) (Figura 11), contra tiempo para el experimento con K _p mayor.	43
Tabla 9.	Valores promedio de fracción permeada contra tiempo (Figura 12) para el experimento con K _p mayor.	45

Tabla 10. Valores promedio de Ln de la fracción permeada contra Ln del tiempo (Figura 13), para el experimento con K _p mayor.	46
Tabla 11. Valores promedio de flujo contra tiempo (Figura 14), para el experimento con K _p mayor.	47
Tabla 12. Valores cinético-termodinámicos para la permeación de Clorhidrato de Amilorida.	48

I. INTRODUCCION.

I.1. Antecedentes.

La realidad del desarrollo y consumo de medicamentos nos muestra que actualmente las formas farmacéuticas preferidas son las orales, a pesar de presentar un índice de variabilidad elevado, en los niveles sanguíneos alcanzados de los fármacos en diferentes sujetos. Esta variabilidad es el resultado de circunstancias propias de la vía de administración, interviniendo factores como el pH del tracto gastrointestinal, la ingestión de diferentes comidas en diferentes cantidades y el metabolismo en el hígado. Algunos de estos factores de variabilidad pueden evitarse con la administración parenteral a través de inyectables e infusiones, aunque también traen consigo otros inconvenientes, además de que la liberación del o de los fármacos solo se pueden sostener por un tiempo limitado, después de una dosis administrada.

El desarrollo de los sistemas de liberación controlada ha significado hasta la fecha, una manera de mejorar el suministro de los fármacos al cuerpo del paciente. Estas nuevas formas de dosificación son un método novedoso de administración, que se fundamenta e tiene como objetivo el de dirigir el efecto farmacológico hacia un lugar específico del organismo, controlando la velocidad con que los fármacos son liberados y manteniendo dicha velocidad de suministro más o menos constante, de tal manera que la concentración de los fármacos en el sitio de acción permanezca en los niveles terapéuticos necesarios para reestablecer la salud del paciente, dado que significa un número menor de tomas o aplicaciones y en muchos casos la disminución o desaparición de efectos secundarios observados al alcanzar niveles del fármaco mayores a los necesarios, al aplicar las formas de dosificación en los cuales no se controla la velocidad de liberación.

La liberación controlada no significa unicamente la prolongación de la duración de un efecto determinado, sino también significa que ese efecto puede predecirse y reproducirse en su cinética de liberación (1).

I.2. Sistemas transdérmicos de liberación.

A pesar de que la piel ha sido usada por mucho tiempo para administrar fármacos, el efecto perseguido se limitaba a el área cercana a la aplicación, esto es, el objetivo había sido el de un efecto local. El uso de la piel como un órgano de entrada para fármacos con los cuales se persigue un efecto en otros órganos, es lo que actualmente se considera como novedoso. Uno de los principales problemas para pasar de un efecto local a uno sistémico es, sin duda, el control de la dosis. Este control es difícil si no se aplica siempre la misma cantidad de medicamento, sobre una superficie de piel determinada, lo que regularmente no se considera en una aplicación tópica. El segundo gran problema es la penetrabilidad y potencia de los fármacos, la cual debe de ser grande en ambos casos, primero para permitir el acceso a esta vía y segundo para alcanzar concentraciones que sean suficientes para obtener un efecto farmacológico adecuado, en órganos diferentes a la piel (2).

Aunque se ha reconocido desde hace casi un siglo, que la piel no es una barrera impermeable y que de hecho es permeable a ciertas sustancias químicas, la idea de emplearla como un "puerto de entrada" de fármacos al organismo es relativamente nueva y su desarrollo se inicia en los años 50's con la introducción del unguento de nitroglicerina. Esta forma de dosificación fué consecuencia de la observación de que los trabajadores de la industria de las municiones presentaban los efectos farmacológicos típicos de la administración de nitratos.

La introducción del unguento de la nitroglicerina no afectó el mercado de los nitratos, ni estimuló el interés por la liberación percutánea de fármacos. Sin embargo es en esa época que se desarrolla la investigación de la absorción percutánea (1).

Una cuestión básica para el desarrollo de los productos de administración percutánea es tratar de establecer cuales serían las posibles ventajas de esta vía en comparación con las otras. Las ventajas de la administración transdérmica y controlada de fármacos

incluye (2):

- 1) Evita el riesgo e inconvenientes de la vía intravenosa.
- 2) Evita la variabilidad de absorción y metabolismo asociado algunas veces con la vía oral.
- 3) Permite el uso de fármacos con vidas medias biológicas cortas.
- 4) Permite dosis menores debido a un metabolismo hepático menor y a la absorción continua.
- 5) Régimen de dosificación simplificado.
- 6) La administración de fármaco se interrumpe rápidamente al retirar el sistema de la piel.
- 7) Producción de niveles plasmáticos de fármaco constantes, sostenidos y controlados.
- 8) Mayor aceptación del paciente.

Las desventajas asociadas con los sistemas de liberación transdérmicos son debidas a la posibilidad de activación de respuestas alérgicas en la piel y a las propiedades de barrera de la misma, lo que los hace inconvenientes para fármacos que irriten o sensibilicen la piel y se encuentren restringidos por la superficie disponible en el mismo sistema de liberación para fármacos potentes que sean necesarios de administrar de manera crónica. Otras desventajas serían un costo mayor y posibles dificultades para la adaptación a la piel.

Con lo hasta ahora mencionado se pueden definir a los sistemas de liberación transdérmica como: sistemas que a través de absorción percutánea (paso de fármacos desde el exterior, por las capas de la piel, hasta la corriente sanguínea) proveen una liberación de fármacos preprogramada a una velocidad y por un periodo de tiempo establecido, para satisfacer necesidades terapéuticas específicas (2).

Dentro de los sistemas de liberación transdérmica más comunes actualmente, se pueden mencionar los ungüentos y los "parches transdérmicos". Además de éstos se encuentran otro tipo de sistemas como los sistemas iontoforéticos que continúan siendo investigados por sus amplias posibilidades para la administración transdérmica de fármacos.

I.3. Sistemas iontoforéticos.

La iontoforesis es un medio efectivo para administrar fármacos vía transdérmica, comparada con sistemas transdérmicos convencionales, ya que éstos últimos son limitados por las propiedades del tipo de fármacos que se incluyen en dicha formulación, además de que se tiene un mejor control de los niveles plasmáticos de fármaco.

I.3.1. Definición.

Iontoforesis es un proceso o técnica que involucra el transporte de moléculas iónicas (cargadas) a través de un tejido, mediante la aplicación de una corriente eléctrica a una solución de electrolito conteniendo las moléculas iónicas que van a ser permeadas, usando electrodos de polaridad apropiada (3-6).

Se puede distinguir la iontoforesis de otros fenómenos electrocinéticos como electroforesis y electroósmosis. Mientras que electroforesis involucra el movimiento de un coloide (como fase dispersa) permaneciendo constante el medio de dispersión, electroósmosis trata del movimiento de un líquido (como medio de dispersión) con la fase dispersa permaneciendo constante. En el caso de iontoforesis, lo que se mueve son iones en solución, no coloides (7).

I.3.2. Piel.

La piel es uno de los órganos más extensos del cuerpo humano. En un adulto promedio cubre más de 2 metros cuadrados de área superficial y recibe aproximadamente un tercio de toda la sangre circulando a través del cuerpo (8).

Microscópicamente la piel es un órgano multilaminado compuesto de tres capas histológicas: epidermis, dermis e hipodermis o tejido subcutáneo. (9).

El tejido subcutáneo está compuesto por tejido adiposo y músculo cutáneo. En la dermis se localizan todas las estructuras importantes

de la piel como folículos pilosos, músculo piloerector, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas, vasos sanguíneos y las terminaciones nerviosas. La epidermis que es la capa más externa, se compone de 2 partes principales, el estrato córneo y el estrato germinativo. El estrato córneo forma la parte más externa de la epidermis y consta de varias capas de células compactadas, alineadas, deshidratadas y queratinizadas que han perdido su núcleo. (8,10-12).

I.3.2.1. Comportamiento de la piel ante la temperatura.

La piel es considerada como una membrana biológica típica (8). Las membranas biológicas se componen en un 60% de proteínas y 40% de lípidos. Existen tres tipos de lípidos de membrana: triglicéridos, acilglicéridos y fosfolípidos.

La temperatura tiene gran efecto sobre los lípidos en membrana. No se puede variar fácilmente la temperatura a un lípido que se encuentra unido a un tejido, y a su vez a un organismo vivo; el comportamiento del lípido es el mismo que en cualquier organismo vivo, pero una vez que se aísla el tejido, sus lípidos sí pueden ser afectados por la temperatura.

Cullis y colaboradores (13) trabajaron con tejidos aislados y estudiaron el comportamiento de los lípidos en función de la temperatura aplicada. Su primer hallazgo fue que los lípidos (especialmente los triglicéridos) cambian su forma cristalina a una forma gel al aumentar la temperatura de 25 a 37°C, lo cual involucra un cambio en el orden de su estructura (polimorfismo), fenómeno también observado por Burnette y colaboradores (14). Otro fenómeno que descubrió Cullis, fue que el comportamiento de los lípidos en la membrana está influenciado por la temperatura. Así a 25°C y temperaturas inferiores, se encuentran en forma de bicapa; la permeación de sustancias es muy específica a esa temperatura, porque solo pueden pasar sustancias de carácter preferentemente lipofílico. A temperaturas mayores de 25°C y menores de 37°C se favorece la formación de estructuras hexagonales, de tal manera que se crean gran cantidad de poros a través de los cuales pueden pasar diferentes tipos de sustancias. Por último a temperatura de 37°C existen tres

configuraciones distintas: como bicapa, modelo hexagonal y en micelas, de ahí que la permeación de sustancias a esa temperatura es específica y limitada.

I.3.2.2. Propiedades eléctricas de la piel.

Se sabe que el estrato córneo es la principal barrera del cuerpo hacia la conductividad eléctrica (7, 9, 15). La conductividad eléctrica de los tejidos es proporcional al contenido de agua, y el contenido de agua en el estrato córneo es aproximadamente 20%, mucho menor que el nivel fisiológico normal del 70% (8). El estrato córneo tiene dos características eléctricas importantes. Primero tiende a polarizarse al aplicar un campo eléctrico continuamente, segundo, es el elemento más importante para la impedancia de la piel (16). La impedancia representa la oposición eléctrica total del estrato córneo al paso de corriente a través de él (7). Se ha reportado que la piel humana muestra una elevada impedancia a la corriente alterna de baja frecuencia pero la impedancia disminuye considerablemente al aumentar la frecuencia (9, 15).

I.3.3. Mecanismo de permeación de fármacos facilitada por iontoforesis.

Algunos investigadores (9,15,17,18) han visto la posibilidad que especialmente para especies iónicas, durante iontoforesis, los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas pueden actuar como probables caminos de difusión a través de la piel (Fig 1). Otros autores proponen que además de éstos caminos se forman otros "espacios celulares" en el estrato córneo debido a la corriente eléctrica. Se supone la formación de espacios, debido a que un potencial eléctrico puede alterar el arreglo molecular de los componentes de la piel. El "mecanismo de entrada flip-flop" puede ser un modelo adecuado para explicar la formación de poros dependiente del voltaje en el estrato córneo, que es rico en queratina (un polipéptido alfa helicoidal). El "flip-flop" de las hélices de polipéptidos puede ocurrir para formar un arreglo paralelo; se abren así los poros como resultado de la repulsión entre dipolos vecinos, y los iones y moléculas de agua fluirán en los canales de los poros para neutralizar los momentos

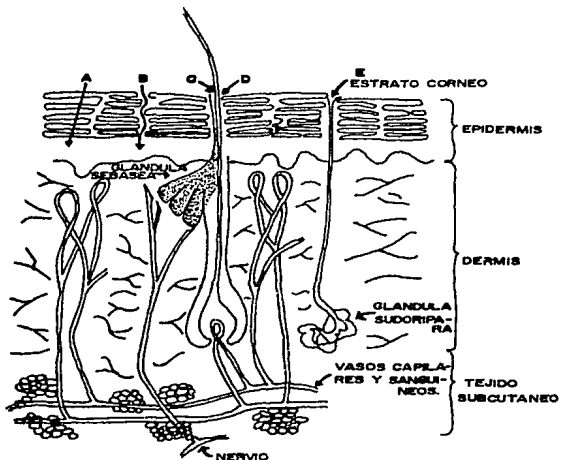


Figura 1. Esquema de las rutas probables de penetración. Los sitios probables son: A) Transcelular, B) Difusión a través de canales entre células, C) A través de glándulas sebáceas, D) A través de folículos pilosos, E) A través de glándulas sudoríparas. (Tomado de la referencia 21).

I.3.4. Factores que afectan la velocidad de permeación en Iontoforesis.

A. Carga.

La permeación iontoforética se ve favorecida mucho más para especies iónicas que para especies no ionizadas. Las moléculas de fármaco deben estar en estado ionizado con carga positiva o negativa. Los fármacos no iónicos también pueden ser permeados iontoforéticamente, si previamente se les ha inducido una carga; esto puede hacerse por adsorción del fármaco a un acarreador iónico o por entrapamiento en una miscela iónica (14,22-23).

B. Iones Extraños.

En algunos casos, si la concentración iónica que da el fármaco por sí misma es insuficiente para la óptima conducción de la corriente eléctrica, es necesario usar sales adicionales; pero en tal caso es importante demostrar los efectos del tipo y concentración de las sales usadas sobre la velocidad de permeación (17). Por otro lado, se ha demostrado que la presencia de especies amortiguadoras o iones de sal tiene efectos negativos sobre la permeación iontoforética, ya que esos iones extraños compiten con las moléculas cargadas de fármaco por la corriente eléctrica; es preferible que más de la mitad de la conductividad sea atribuida a moléculas cargadas de fármaco (22-26).

C. pH.

El pH es un factor importante para fármacos cuyo grado de ionización es dependiente del pH, cambiando el pH se puede inducir la carga del fármaco, por ejemplo, el clorhidrato de un anestésico local es mejor permeado iontoforéticamente a pH de 5, ya que las moléculas están cargadas positivamente a este pH. Al aumentar el pH, las moléculas se convierten en moléculas no ionizadas; es decir, el pH de la solución puede controlar su carga basada en su punto isoelectrónico. El pH de cualquier solución de fármaco puede ser manipulado para transportar el fármaco ya sea hacia el cátodo o hacia el ánodo. (5,19,20,26-29).

La permeación también está influenciada por la piel, debido al cambio en la carga en las proteínas estructurales, ya que la queratina en el estrato córneo tiene un punto isoelectrónico a pH entre 3 y 4, al aumentar el pH a más de 4, el estrato córneo adquiere una carga negativa y es más atractivo a iones positivos. (26). Burnette y Ongpipatanukul (14) demostraron que la piel actúa como membrana permeoselectiva para iones positivos debido al intervalo de pH del punto isoelectrónico de la queratina.

D. Fuerza Iónica.

La fuerza iónica está relacionada a la concentración de varios iones presentes en la solución. Se sabe que en solución, cada ión es rodeado por iones con carga contraria, y se espera que ejerzan un efecto de retardo sobre el movimiento del ión que se desea transportar

iontoforeticamente a través de un tejido. A mayor fuerza iónica habrá mayor concentración de iones extraños, lo cual resultará en una competencia por la corriente eléctrica (7).

E. Concentración.

Koizumi (30), Kasting (31), Keister (32) y Wearley (26), demostraron recientemente que la variación de la concentración de fármaco en el compartimento donador era proporcional a la penetración a voltaje constante. Aunque Del Terzo (23), concluye de sus investigaciones que la concentración es independiente de la penetración.

F. Tamaño Molecular.

Al aumentar el tamaño de una molécula aumentan sus características lipofílicas (no iónicas) y disminuyen sus posibilidades de ser permeadas iontoforeticamente. Por ejemplo en el caso de los alcoholes, al aumentar la longitud de la cadena alquímica aumentan sus propiedades lipofílicas y disminuye su transporte iontoforético (17,33-34).

G. Adición de un Mejorador Químico de Permeación.

Con el fin de usar menor cantidad de corriente, se ha propuesto el uso de agentes tensoactivos iónicos como el lauril sulfato de sodio (25) y no iónicos como polisorbatos (35) y mejoradores químicos de permeación como el etanol (36).

H. Tipo de piel.

Para estudios iontoforéticos se han probado distintos tipos de piel: con pelo, sin pelo y sin estrato córneo. La piel que da la mejor permeación es la piel sin pelo y sin estrato córneo, aunque la que da el mejor modelo para piel humana es la piel sin pelo. (17,23,37-38).

I. Factores electrónicos.

La cantidad de fármaco permeado por iontoforésis depende más de los factores electrónicos que del gradiente de concentración. La velocidad de movimiento de los iones transferidos es directamente proporcional al voltaje aplicado y la cantidad de iones transferidos es afectada por el flujo de corriente y su duración. (4,23,30,39-41).

Chien y colaboradores (15) llevaron a cabo un estudio de los factores electrónicos que podrían afectar la permeación de insulina en humanos por medio del control de glucosa en sangre. Los factores que manejaron son:

i) Tipo de corriente.- Demostraron que había un mejor control de glucosa con corriente directa alternada que con corriente directa. Por otra parte, Sanderson y colaboradores (25) observaron que con el tratamiento con corriente directa alternada se disminuían los riesgos de quemaduras en la piel debido a tratamiento iontoforético prolongado.

ii) Frecuencia.- Se sugiere que al aumentar la frecuencia aumenta la eficiencia en la permeación, esto debido a la disminución en la impedancia de la piel con el aumento de la frecuencia.

iii) Radio encendido/apagado.- Para investigar la influencia de este parámetro, se usaron tres diferentes radios encendido/apagado, y así determinar la proporción relativa del proceso de polarización-despolarización sobre la eficiencia del sistema iontoforético. El radio encendido/apagado que dió un mejor control en la glucosa sanguínea, fué 1:1, cuando la frecuencia era de 2 KHz, se concluye que el tiempo de polarización debe ser igual al tiempo de despolarización, ya que aparentemente cualquier residuo de polarización en la piel de los ciclos previos podría reducir la eficiencia en la permeación como se mostró en los otros radios encendido/apagado experimentados.

iv) También se estudió el efecto de varias formas de onda (incluyendo la cuadrada, sinusoidal y trapezoidal) sobre la permeación iontoforética de insulina. Los resultados sugieren que el tiempo requerido para obtener la máxima reducción en los niveles de glucosa sanguínea y la duración de su efectividad parece ser dependiente de la forma de onda usada, siendo la onda cuadrada la mejor.

J. Electrodo.

Deben estar hechos de un material que sea buen conductor. No deben causar variaciones en el pH. Su diseño debe ser muy cuidadoso con el

fin de prevenir cualquier posibilidad de quemaduras. El tamaño de los electrodos y la distancia entre ellos afecta directamente la conductividad de la piel (19).

1.3.5. Componentes de Sistemas iontoforéticos.

Hay un gran número de aparatos que han sido diseñados y utilizados; los investigadores tienen preferencia por cierto tipo de aparato, pero en general todos los sistemas se componen de:

1) Celda de difusión.

Aunque la tendencia general ha sido tratar de modificar la celda de difusión de dos compartimentos dependiendo de los objetivos que se persigan en cada trabajo (4,25,30,41,42), la mayor parte de los investigadores trabajó con la celda de dos compartimentos (9,14,18,19,22-23,26,31,39,43-47). Bellantone y colaboradores, (24) concluyen de sus investigaciones que éste tipo de celda es la más representativa de una situación *in vivo* y además es el menos complicado experimentalmente.

2) Electrodo.

La mayor parte de los aparatos *in vitro* utilizan un sistema de dos electrodos, uno en cada compartimento del aparato (16, 19, 23, 24, 26, 33, 48, 49). En este caso las medidas de corriente o voltaje se hacen entre los dos electrodos a través de la piel. Recientemente se ha trabajado una versión más sofisticada del diseño simple, el cual utiliza cuatro electrodos. (37, 48-50). Este sistema tiene la ventaja de que mide la caída de voltaje en la superficie de la piel y da una determinación más precisa del voltaje. La principal desventaja es su difícil manejo experimental.

Con respecto al material para construcción de los electrodos, lo más común son alambres de platino (4, 19, 23, 24, 30, 39-41, 45, 51), y de plata/cloruro de plata (14,22,25, 31, 39, 42, 43, 52), aunque también se han usado electrodos de vidrio (18). La principal ventaja de los electrodos de platino es que no precipitan proteínas como es el caso de los de plata/cloruro de plata, además de que su potencial

oxido-reductor es muy grande.

3) Sistema electrónico.

Hay una gran variabilidad con respecto a sistemas electrónicos usados, dependiendo de las condiciones que se quieran manejar durante el experimento. Generalmente no se describe con detalle el sistema electrónico usado.

4) Membrana.

Para algunos modelos se han empleado membranas sintéticas como celofán (39, 40), pero en general en todos los experimentos se han usado pieles de animales, desde piel de cerdo (22), de cobayo (30), de cadáver humano (14, 22, 25, 28, 40), células de permeación Valia-Chien (43,53), y la más empleada ha sido la piel de ratón (17,24,27,37,38,42,44-46,48), que casi siempre se extrae de la región abdominal; esto se debe a que es una de las regiones en que la piel es más delgada y con menor contenido de queratina. (11).

Además del tipo de piel, otra variable a controlar es el área de exposición; hay un intervalo utilizado de áreas muy grande, pero la más común es 0.64 cm^2 . (14, 18, 19, 23, 26, 31, 39, 42, 43, 51).

I.3.5.1. TPIS (Sistema transdérmico iontoforético periódico).

Con todos los conceptos teóricos y componentes mencionados anteriormente Chien y colaboradores (9), desarrollaron un aparato que denominaron Sistema Transdérmico Periódico Iontoterapéutico (TPIS), (Fig. 2). Este es capaz de dar pulsos de corriente con determinada forma de onda, intensidad de corriente variable y radio encendido/apagado para tiempos específicos de aplicación.

Consta de dos compartimentos: donador y receptor con la piel sujeta entre ambos y un par de electrodos (uno en cada compartimento) que van conectados al sistema electrónico con las características antes mencionadas.

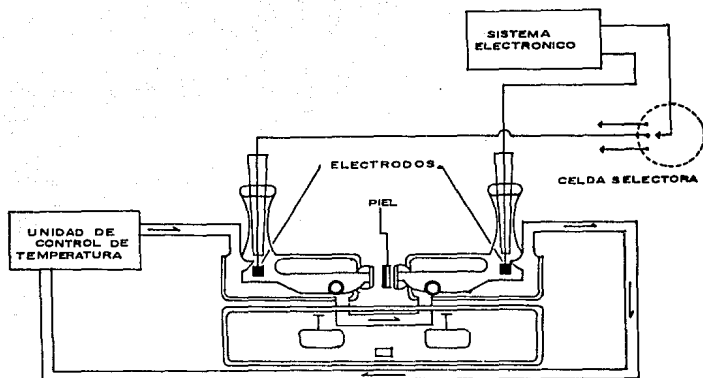


Figura 2. TPIS. (Tomado de la referencia 9).

I.4. Modelos para transporte iontoforético.

Para conocer adecuadamente el transporte iontoforético se debe contar con información completa acerca de las rutas que siguen a soluto y solvente, además del conocimiento total de las interacciones soluto-soluto, soluto-solvente, solvente membrana, y membrana soluto, se podría describir el transporte iontoforético basándose en el cálculo del efecto neto de todas las interacciones moleculares bajo la influencia de un campo aplicado (teoría dinámica molecular). Esta teoría tiene la ventaja de dar evidencia tanto del mecanismo de transporte y los factores físicos que tienen mayor influencia sobre él, pero desafortunadamente el metabolismo en el cuerpo humano es tan rápido que no se puede seguir, ni por las computadoras más rápidas, ya que el transporte molecular está en escala de picosegundos.

Uno de los modelos propuestos por Brunette (54) es una teoría probabilística por medio de una simulación Montecarlo del proceso de transporte iontoforético. Este proceso considera primero un transporte

por difusión pasiva (sin fuerza externa aplicada), el movimiento está dado por fluctuaciones térmicas al azar, que se ajusta al modelo de un proceso aleatorio. En una geometría unidimensional, se puede simular este proceso aleatorio generando números al azar entre 0 y 1, si el número aleatorio fué menor que 0.5, la molécula hace un movimiento de retroceso una distancia Δx , y por el contrario si el número es mayor que 0.5 se mueve hacia adelante una distancia Δx . Este proceso esta dado para cada molécula o grupo de moléculas, en el sistema. Después todas la moléculas se reacomodan y se repite el proceso. Cuando una fuerza externa es aplicada, como en el caso de la liberación iontoforética de fármacos, las probabilidades de movimiento de retroceso y avance, no son iguales, ya que la fuerza aplicada determina la dirección del movimiento, dependiendo de las características físicas de la molécula y de la polaridad de los electrodos. Por ejemplo, si el fármaco estuviera cargado positivamente y el compartimiento donador contiene al ánodo, el transporte será en dirección del compartimiento receptor. Esta tendencia se puede incorporar a la simulación de Montecarlo definiendo la probabilidad de movimiento hacia adelante como $0.5+a$ y la probabilidad de movimiento en la dirección contraria como $0.5-a$. La ventaja de este modelo es que todas las fuerzas externas, por ejemplo, la repulsión electrostática directa o flujo convectivo, y sus efectos en el transporte de soluto a través de la piel están incluidos dentro del parámetro "a"; también nos da información acerca del proceso de transporte como una función del tiempo, no solo en el estado estacionario. El inconveniente que presenta este modelo son las limitaciones impuestas por las propiedades de barrera de la piel, que cambian con el tiempo, de tal manera que este parámetro es muy empírico.

Otro modelo para transporte iónico esta basado en una extensión de la teoría de Eyring de velocidades absolutas (54). Básicamente el transporte es descrito como la transferencia de soluto sobre una serie de barreras energéticas (Figura 3). Cada barrera energética es caracterizada por una energía libre, ΔG , con la distancia entre las energías mínimas dada por λ .

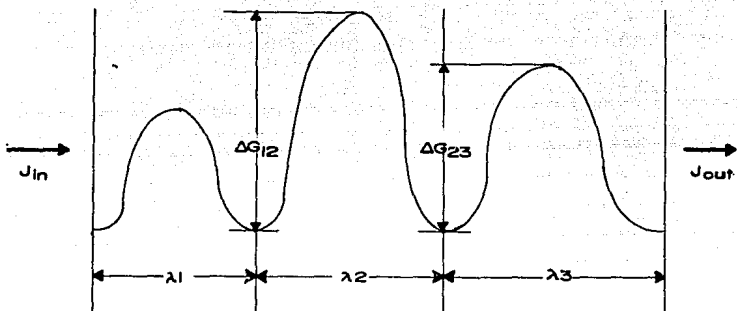


Figura 3. Gráfico del perfil de energía libre (ΔG) como función de la posición en una membrana (por ejemplo piel). Donde G_{ij} = barreras de energía, λ_i = distancia entre barreras; J = flujo de soluto.

La transferencia hacia adelante o hacia atrás en las barreras está dada por las constantes de primer orden k_{ji} y k_{ij} , de tal manera que la caracterización del flujo sería:

$$J_{ij} = \lambda_i (c_i k_{ij} - c_j k_{ji})$$

donde c_i es la concentración de soluto en la mínima energía. Tales ecuaciones de flujo, se pueden escribir para el transporte a través de cada barrera energética, y si se asume el estado estacionario, todas las ecuaciones de flujo se pueden escribir de la misma manera. Esta igualdad de flujos permiten eliminar todas las concentraciones intermedias, de tal manera que el flujo puede ser expresado en términos de las concentraciones de soluto libre en solución. Esta teoría tiene algunas ventajas, por ejemplo, en el transporte de un ión

a través de un poro en la membrana, es conocida la localización de grupos cargados, fijados en la membrana, entonces, se puede colocar una barrera energética apropiada en este lugar. Por otro lado considera, que hay una barrera energética localizada en la abertura del poro, que es relacionada a la energía necesaria para deshidratar el ión cuando pasa por el poro de la membrana.

Aunque la aplicación de la teoría de Eyring a transporte iontoforético parece ser adecuada porque es matemáticamente fácil de formular y parece dar una idea conceptual, hay algunos problemas con esta teoría. Como se mencionó anteriormente, hay muy poca información estructural disponible sobre el transporte iontoforético a través de la piel. Desde esta perspectiva, la piel representa una caja negra, en la cual se conocen las concentraciones iniciales y finales como función del tiempo, de tal manera que cuando se modela el proceso de transporte el número de barreras energéticas se convierte en arbitrario. Se obtiene un mejor arreglo si se incluye un mayor número de barreras en la descripción del transporte, lo que implica que el número de barreras a escoger es arbitrario. Lo que se ha hecho es incluir un número pequeño de barreras, para ajustar "adecuadamente" los datos, lo cual resulta en un número pequeño de barreras para modelar el transporte. El principal problema es que la teoría de Eyring requiere equilibrio configuracional entre las barreras, y esto no es confiable en un canal largo con pocas barreras como es la piel. Por ejemplo, colisiones térmicas intermedias ocurren conforme el ión brinca de una barrera energética a la otra. Otra limitación es que las constantes de velocidad (k) son descritas por las teorías absolutas de velocidad de reacción. Esto es

$$k = \nu \exp \left(\frac{-\Delta G}{RT} \right)$$

donde ν es el factor universal de frecuencia, ΔG es la energía libre, R es la constante universal de los gases, y T es la temperatura. Ya que solamente el producto $\nu \exp (-\Delta G/RT)$ puede ser determinado sin ambigüedad de la teoría, los valores absolutos de las alturas de la barrera energética no tienen significado. Por otro lado, otros autores establecen que la teoría es válida solo cuando la altura de las

barreras es mayor que kT (k = constante de Boltzman y T = temperatura, esta condición es importante ya que otros autores han encontrado que la altura de las barreras en ciertos canales biológicos es menor que kT . Una última limitación, es que para expresar los flujos en términos de concentraciones de soluto libres en solución, que son medibles, se tiene que asumir el estado estacionario. Además no hay información disponible y confiable de flujos dependientes del tiempo.

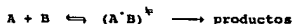
I.4.1. Consideraciones cinético termodinámicas.

De acuerdo a la teoría de Eyring antes mencionada y considerando todas sus limitaciones para describir el transporte iontoforético (como una aproximación), se propone la teoría del complejo activado, para calcular algunos parámetros cinético termodinámicos a partir de la constante de equilibrio en el estado de transición.

I.4.1.1. Teoría del complejo activado.

El postulado fundamental de esta teoría es que los reactantes (o estado inicial en un proceso), están siempre en equilibrio con complejos activados. El complejo activado, es la configuración de átomos que corresponde energéticamente a la parte más alta de la barrera de energía que separa a los reactantes de los productos (55).

El equilibrio se escribe



donde A y B son reactivos y $(A^*B)^{\ddagger}$ representa la complejo activado.

Una consideración fundamental de esta teoría, es que los reactivos estan en equilibrio con el complejo activado. Así se puede escribir la constante de equilibrio como

$$k^{\ddagger} = \frac{[(A^{\ddagger}B)^{\ddagger}]}{[A][B]} \quad (6)$$

6

$$[(A^{\ddagger}B)^{\ddagger}] = k^{\ddagger} [A][B] \quad (7)$$

La velocidad de reacción es igual a la concentración del complejo activado en la parte más alta de la barrera energética, multiplicado por frecuencia ν , de cruzar dicha barrera. Entonces

$$\text{Velocidad} = \nu [(A^{\ddagger}B)^{\ddagger}] \quad (8)$$

Sustituyendo $[(A^{\ddagger}B)^{\ddagger}]$ de (7) en (8)

$$\text{Velocidad} = \nu [A][B] k^{\ddagger} \quad (9)$$

Si la velocidad se escribe como

$$\text{Velocidad} = k' [A][B] \quad (10)$$

donde k' es la constante de velocidad, entonces

$$k' = \nu k^{\ddagger} \quad (11)$$

Por el método de Eyring-Polanyi de mecánica estadística (55) se sabe que

$$\nu = \frac{K_B T}{h} \quad (12)$$

donde K_B es la constante de Boltzman, h es la constante de Planck y T es la temperatura absoluta. De ahí que

$$k' = \frac{K_B T}{h} k^{\ddagger} \quad (13)$$

Cabe mencionar que la constante de velocidad que se menciona aquí, puede ser para cualquier transformación, esto es, cambio de calor,

masa, momentum.

La constante de velocidad expresada en la ecuación (13), puede ser ahora relacionada a cantidades termodinámicas de transformación (ΔG , ΔH , ΔS). Siendo los parámetros calculados, parámetros del estado de transición, (ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger). Estas consideraciones son muy importantes, ya que permiten la transformación de una constante cinética (k') a una constante de equilibrio (k^\ddagger).

Así, para ΔG

$$\Delta G^\ddagger = -R T \ln k^\ddagger \quad (14)$$

donde ΔG^\ddagger es la energía libre de activación o transición del sistema.

I.4.2. Importancia de las consideraciones cinético-termodinámicas en Iontoforesis.

En la actualidad no se cuenta con algún trabajo cinético-termodinámico aplicado a la permeación de fármaco por iontoforesis. Sin embargo, éste es importante para tener idea de los flujos y gastos energéticos en éste sistema. Los intercambios energéticos que ocurren pueden ser estimados a través de parámetros cinético-termodinámicos como E_a , ΔH^\ddagger , ΔG^\ddagger y ΔS^\ddagger .

Finalmente, de acuerdo a la teoría de Eyring propuesta por Brunette (54) para el transporte iontoforético y considerando todas sus limitaciones, se propone el siguiente modelo (Figura 4), como una aproximación al transporte iontoforético, con el propósito de calcular la constante de equilibrio en el estado de transición a fin de hacer una estimación de los parámetros cinético-termodinámicos.

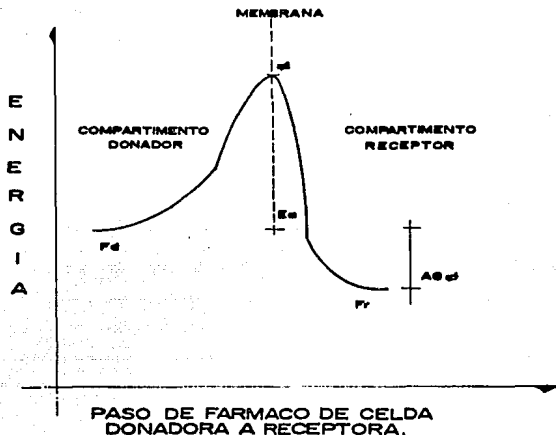


Figura 4. Términos cinético termodinámicos para un sistema de permeación de fármacos por Iontoforesis.

Donde:

F_d = Fármaco en la celda donadora.

F_r = Fármaco en la celda receptora.

\ddagger = Fármaco en la membrana.

E_a = Energía mínima requerida para el paso del fármaco a través de la piel, de compartimento donador a compartimento receptor.

AG_d = Energía libre de activación o transición del sistema.

1.5. Diseño Paramétrico de Taguchi, (DPT).

Genichi Taguchi, desarrolló una serie de técnicas relacionadas a la aplicación de arreglos ortogonales (AO) al diseño de experimentos clásico, que más tarde fueron llamadas "Diseño de Parámetros". El objetivo de este diseño es seleccionar las condiciones óptimas para que un producto y/o proceso sea menos susceptible a las variaciones que están fuera de control. Por otro lado, con el DPT se pueden

estudiar muchas variables a diferentes niveles en pocos experimentos, se pueden asignar las interacciones facilmente y el análisis de datos es muy sencillo.

Los AO son Diseños Factoriales altamente fraccionados, bajo los cuales se va a llevar a cabo la experimentación. El término ortogonal significa "balanceado", "separable" o "no mezclado", estos arreglos permiten separar los efectos producidos al variar un parámetro dado de otros parámetros.

En la selección del Arreglo Ortogonal se emplean los grados de libertad de la experimentación, que se determinan a partir del número de las variables e interacciones en estudio, tratando de hacer el ajuste que lleve a la selección del AO con el menor número de corridas experimentales.

La asignación de variables a las columnas del arreglo se hace en forma específica, por la necesidad de estudiar dichas variables e interacciones correspondientes o por la facilidad en la ejecución de la experimentación.

De acuerdo a Taguchi (57), existe una interacción entre dos factores cuando la condición del factor 1 modifica la respuesta debida a la condición del factor 2. Las interacciones pueden afectar de manera positiva o negativa la característica o variable a medir en un proceso.

Cuando se supone la existencia de una interacción, los factores son introducidos uno a la vez en el experimento. Si los efectos de una interacción son importantes (conociéndolos de antemano por experiencias previas), se asignan junto con los efectos principales de otras variables a determinadas columnas del arreglo ortogonal.

En el análisis estadístico de los resultados o datos experimentales, Taguchi introduce el término " F ", que representa el efecto de cada variable, interacción y error, en términos porcentuales a partir de la suma de cuadrados pura. El análisis regular determina los efectos principales o promedios para los factores o variables, de los cuales

se puede obtener la mejor combinación para el objetivo deseado (57).

Una vez realizado el análisis estadístico de los datos, se optimiza la investigación, generalmente utilizando los datos obtenidos del análisis regular, que generan la mejor combinación de variables y niveles, llamado "campeón de papel", bajo la cual se debe dar el mejor valor del parámetro de respuesta según el objetivo inicial. El experimento que se realiza con la mejor combinación de niveles es llamado "confirmatorio" (58).

Además de la ventajas anteriores del DPT, se pueden enunciar las siguientes, que se complementan con las desventajas del diseño experimental tradicional (59-60):

1) El D.P.T. tiene una gran variedad de módulos experimentales, permitiendo estudiar un gran número de variables con o sin igual número de niveles, siendo lo más importante la reproducibilidad de las conclusiones debido a que las diferencias entre los niveles de las variables se determinan como un efecto promedio, mientras se están variando las condiciones de otros parámetros.

2) Las técnicas de análisis de datos desarrolladas por Taguchi y comparadas con las de los diseños tradicionales, son sencillas en su cálculo e interpretación, de gran potencia y sensibilidad.

3) A diferencia de los diseños tradicionales, el D.P.T. permite estudiar los efectos de las interacciones, entre variables.

4) En contraste con el D.P.T., la prueba estadística F como herramienta de decisiones tiene algunas limitantes:

i) Dice si una variable es o no significativa, pero no da los niveles de significatividad.

ii) La sensibilidad de esta prueba disminuye al disminuir el número de grados de libertad.

iii) Solo se considera el error tipo I.

I.5.1. Arreglo Ortogonal (AO). de factores y niveles.

El arreglo ortogonal es un diseño experimental que muestra las condiciones experimentales. La notación, $L_a (b^c)$, es usada para representar el arreglo ortogonal, donde:

- a = Número de corridas experimentales.
- b = Número de niveles de cada factor (variables).
- c = Número de columnas en el arreglo.

En el presente estudio se usó un arreglo $L_9 (3^4)$; esto es, 9 experimentos de 4 factores a 3 niveles cada uno. Este arreglo se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1. Arreglo Ortogonal L9 (3^4)

Experimento	VARIABLE				Respuesta
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	Y1
2	1	2	2	2	Y2
3	1	3	3	3	Y3
4	2	1	2	3	Y4
5	2	2	3	1	Y5
6	2	3	1	2	Y6
7	3	1	3	2	Y7
8	3	2	1	3	Y8
9	3	3	2	1	Y9

Es importante notar que en condiciones iguales de variables y niveles un diseño factorial clásico requeriría 81 experimentos que al considerar 3 repeticiones se convierten en 243 experimentos contra 27 del arreglo ortogonal.

I.6. Características del Clorhidrato de Amilorida.

Se define como la sal monoclorhidrato de la Amilorida. Su nombre químico es monoclorhidrato de 3,5-diamino-N-N-(diaminometileno)-6-cloropirazincarboxamida. Tiene un peso molecular de 302.12 g/mol. Su estructura se muestra en la figura 5:

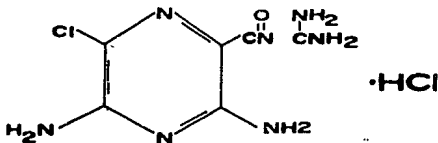


Figura 5. Estructura del Clorhidrato de Amilorida.

Es un polvo cristalino amarillo ó amarillo verdoso. Es prácticamente inodoro. Soluble en dimetilsulfóxido, ligeramente soluble en agua, isopropanol y etanol. Su solubilidad acuosa aumenta al disminuir el pH de la solución. Punto de fusión con descomposición a 288 °C. La constante de disociación de Clorhidrato de Amilorida indica que es una base orgánica moderadamente fuerte, con un pKa de 8.7.

Los métodos analíticos reportados para su determinación son: Espectrofotometría al ultravioleta, Espectroscopía de Infrarrojo, Cromatografía en capa fina y HPLC.

Es un diurético conservador de potasio con actividad antihipertensiva relativamente débil. Se indica como tratamiento alterno con diuréticos de tiazida en casos de hipertensión o para restaurar los niveles séricos de potasio. (61,62).

Se escogió esta sustancia como fármaco modelo por haber presentado las características requeridas para ser formulado en un Sistema Iontoforético de Permeación (63).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.

II.1. Problema.

En la actualidad los sistemas terapéuticos de liberación controlada han presentado ciertas ventajas que se han visto limitadas por las características farmacocinéticas de los principios activos que en ellos se incluyen. Existen sistemas alternos por medio de los cuales es posible minimizar dichas limitaciones, tal es el caso de los Sistemas Iontoforéticos de Permeación (TPIS).

La presente investigación pretende evaluar el comportamiento del Clorhidrato de Amilorida incluido en un TPIS, ante distintas condiciones. A su vez busca obtener los parámetros cinético-termodinámicos que caractericen a este sistema.

II.2. Objetivos.

- 1.- Desarrollar un Sistema Iontoforético para permeación de fármacos *in vitro*.
- 2.- Observar el efecto de algunas variables como intensidad de corriente, concentración de la solución receptora y temperatura sobre la permeación iontoforética de Clorhidrato de Amilorida por medio de un Arreglo Ortogonal dictado por el Diseño Paramétrico de Taguchi.
- 3.- Ponderar el efecto de cada una de las variables sobre la constante de permeación " K_p " y el coeficiente de modelo exponencial " n ".
- 4.- Caracterizar cinética y termodinámicamente un Sistema Terapéutico de Permeación Controlada (TPIS).

III. MATERIALES Y METODOS.

III.1. Materiales.

III.1.1. Reactivos.

- Clorhidrato de Amilorida (donado por Andre Bigaux).
- Cloruro de Sodio.

III.1.2. Material biológico.

- Ratones machos de aproximadamente 20 semanas de edad.

III.1.3. Equipo.

- Espectrofotómetro. Spectronic 21 (Bausch & Lomb).
- Balanza Analítica (Sauter 123).
- Baño de arena (Montado en la Sección de Tecnología Farmacéutica de la FES-C.)
- Termómetro (Braunner).
- Equipo de vidriería común (Pyrex).
- Equipo de disección.
- Sistema Iontoforético de Permeación (Fabricado en la Sección de Tecnología Farmacéutica de la FES-C.).

III.2. Métodos.

La secuencia experimental se muestra en la siguiente figura:



Figura 6. Secuencia experimental.

III.2.1. Métodos experimentales.

III.2.1.1. Diagrama General de Ishikawa.

En el siguiente diagrama se integran todas las variables que se considera pueden influir sobre los parámetros a medir, constante de permeación (KP) y coeficiente de transporte exponencial (n).

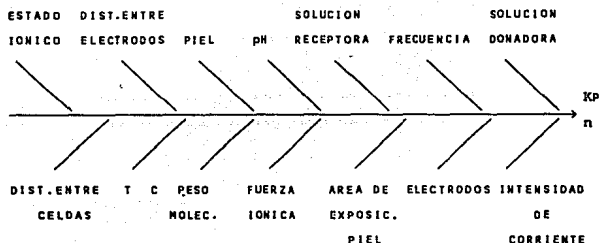


Figura 7. Diagrama general de Ishikawa.

III.2.1.2. Desarrollo del aparato.

El sistema iontoforético usado, es una modificación del TPIS desarrollado por Chien y colaboradores (9) y fue fabricado en la sección de Tecnología Farmacéutica de la FES Cuautitlán.

El TPIS modificado, se compone de:

- 1) Celda de difusión de vidrio, de 2 compartimentos con la membrana sujeta entre ambos, a presión por medio de un empaque de teflón. Cada uno de los compartimentos tiene dos orificios, uno de ellos para insertar el electrodo correspondiente, y el otro para la toma de muestra y agitación en el sistema.

2) Un par de electrodos, elaborados a partir de alambre de platino de 5 cm de largo, 0.05 cm de diámetro y recubiertos de vidrio, del tal forma que se mantuviera constante la superficie de contacto de la solución con el electrodo (0.4030 cm^2). Dichos electrodos, se acoplaban al sistema electrónico.

3) El sistema electrónico se diseñó de acuerdo a las condiciones óptimas reportadas por Chien y colaboradores (15). Estas condiciones fueron: Frecuencia = 2 KHz, radio encendido/apagado 1:1, forma de onda cuadrada e intensidad de corriente variable.

III.2.1.3. Curvas de calibración.

Para la cuantificación de Clorhidrato de Amilorida en el compartimento receptor, se utilizó el método espectrofotométrico; para lo cual se hizo un barrido con una solución de 0.02 mg/ml de clorhidrato de amilorida en cloruro de sodio 0.15 M. El clorhidrato de amilorida mostró máximos de absorción a longitud de onda de 208 y 280 nm, escogiéndose la primera, debido a que era el que proporcionaba una mayor sensibilidad.

Se corrieron tres curvas de calibración para clorhidrato de amilorida en soluciones de cloruro de sodio 0.10, 0.15 y, 0.20 M, para obtener así los datos de concentración en los experimentos de permeación.

III.2.1.4. Pruebas preliminares.

En base al diagrama general de Ishikawa, se corrieron algunas pruebas de permeación con la finalidad de elegir las variables que experimentalmente aportaran la mayor cantidad de información así como aquellas que pudiesen ser controladas de acuerdo a los recursos con los que se cuenta en el laboratorio.

III.2.1.4.1. Permeación con membrana sintética.

Durante las pruebas preliminares se realizaron experimentos con membranas de celofán, éstas se dejaron durante 24 h en agua antes de utilizarlas. Se corrieron una serie de experimentos que involucraron a las variables dictadas por el diagrama de Ishikawa, con el fin de hacer una comparación y observar las diferencias entre una membrana biológica y una membrana sintética.

III.2.1.4.2. Permeación con membrana biológica.

De igual manera que con las membranas sintéticas, se corrieron experimentos utilizando piel de ratón rasurado como membrana. Este periodo de la fase preliminar se dividió en dos partes, para la primera, se utilizó la piel con todas sus capas; en la segunda, se removió el estrato córneo con cinta adhesiva (30 veces).

III.2.2. Ponderación de Variables.

En base a la información deseada en esta investigación y a algunas consideraciones expuestas por los experimentos preliminares, se llegó al siguiente diagrama:

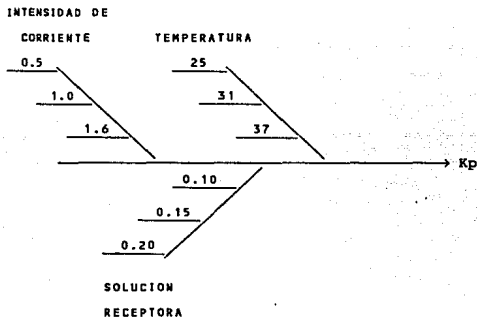


Figura 8. Diagrama final de Ishikawa.
Clorhidrato de Amilorida.

Donde:

Intensidad de Corriente [=] mA.

Temperatura [=] centígrados.

Solución Receptora [=] Molaridad.

III.2.3. Arreglo Ortogonal.

El Arreglo Ortogonal elegido se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 2. Arreglo ortogonal L₉ (3⁴), con las variables experimentales y sus respectivos niveles para Clorhidrato de Amilorida.

EXP.	Ic	Ic/SR	SR	T
1	0.5	I	0.10	25
2	0.5	N	0.15	31
3	0.5	T	0.20	37
4	1.0	R	0.15	37
5	1.0	A	0.20	25
6	1.0	C	0.10	31
7	1.6	I	0.20	31
8	1.6	O	0.10	37
9	1.6	N	0.15	25

Donde:

Ic = Intensidad de Corriente (mA).

Ic/SR = Interacción Intensidad de Corriente/Solución Receptora.

SR = Solución Receptora de NaCl (M).

T = Temperatura (Grados Centígrados).

III.2.4. Parámetros cinético-termodinámicos de activación de permeación.

La determinación de los parámetros cinético-termodinámicos de activación característicos de cada experimento de permeación, en condiciones específicas según DPT, se realizó de la siguiente manera:

1) ΔG^\ddagger , la Energía libre de Gibbs de activación para que se dé el proceso de permeación, se calculó de la siguiente forma, según el tratamiento de Eyring-Polanyi (64,65):

$$K = \frac{k_B T K^\ddagger}{\eta} \quad (13)$$

donde:

K = es una constante cinética, en este caso K_P .

T = Temperatura absoluta.

η = Constante de Planck, $6.62 \cdot 10^{-27}$ erg-s, ($6.62 \cdot 10^{-34}$ J-s).

k_B = Constante de Boltzman, $1.38 \cdot 10^{-16}$ erg K^{-1} , ($1.38 \cdot 10^{-23}$ J K^{-1}).

K^\ddagger = Constante de equilibrio del complejo activado.

como:

$$\Delta G^\ddagger = - R T \ln K^\ddagger \quad (14)$$

entonces de la ecuación (13) y (14) se tiene:

$$\Delta G^\ddagger = R T \ln \left[\frac{\eta K_P}{k_B T} \right] \quad (15)$$

2) Para E_a , energía de activación en el proceso de permeación y A , factor de frecuencia se usó la siguiente expresión:

$$K_P = A e^{-\left[\frac{E_a}{RT} \right]} \quad (16)$$

que en su forma linealizada se escribe como:

$$\ln K_p = \ln A - \frac{E_a}{R} \times \frac{1}{T} \quad (17)$$

La ecuación (17), mediante un tratamiento de regresión lineal en calculadora manual ayudó a obtener la E_a y el A . Para el uso de esta ecuación se usó un promedio de los tres experimentos a cada temperatura (25, 31 y 37°C).

3) Los restantes parámetros cinético-termodinámicos de activación, ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger , se obtuvieron asumiendo que el calor de activación está dado por:

$$\Delta H^\ddagger = E_a - R T \quad (18)$$

y la entropía de activación por:

$$\Delta S^\ddagger = \frac{\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger}{T} \quad (19)$$

IV. RESULTADOS.

Para determinar el comportamiento del sistema iontoforético de permeación a partir de los datos experimentales, se obtuvieron 2 constantes, la constante de velocidad de permeación (KP) y el coeficiente de transporte del modelo exponencial (n). Dichas constantes se obtuvieron de la siguiente manera:

a) Constante de velocidad de permeación (KP).

Se obtuvo a partir de la pendiente del gráfico de fracción permeada (FP) contra tiempo. Sabiendo que $FP = Mt/Ma$, donde Mt es la masa permeada a tiempo "t", y Ma es la masa máxima permeada.

b) Coeficiente de transporte del modelo exponencial (n).

Se sabe que

$$FP \propto t^n$$

entonces

$$FP = Kt^n$$

obteniendo el Ln en ambos lados de la ecuación

$$\text{Ln } FP = \text{Ln } K + n \text{ Ln } t$$

a partir de esta ecuación, se observa que la pendiente obtenida al graficar Ln FP contra Ln t es "n".

IV.1. Resultados de los experimentos sugeridos por el A.O. L9(3⁴).

Los resultados de "KP" y "n" para distintas condiciones experimentales de Clorhidrato de Amilorida se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores promedio (de las repeticiones 1 y 2) para Clorhidrato de Amlorida.

Experimento	Kp (10^6)	n*	
1	5.9140 (0.3507)	1.0714	(0.0083)
2	2.7315 (0.0332)	1.0147	(0.0066)
3	15.0960 (1.9571)	1.3389	(0.0289)
4	2.7275 (0.0304)	1.0199	(0.0250)
5	1.2722 (0.4142)	1.0066	(0.0324)
6	12.1480 (0.6562)	1.2969	(0.0478)
7	14.6875 (1.8151)	1.0040	(0.0141)
8	1.5255 (0.0813)	0.6271	(0.0138)
9	1.0002 (0.0464)	0.5933	(0.1238)

donde Kp [=] h⁻¹.

El valor entre paréntesis corresponde a la desviación estándar.

* Para saber si los valores de "n" obtenidos podían ser considerados igual, mayor o menor que 1 de realizó una prueba de hipótesis (ver anexo 1).

IV.2. Análisis estadístico.

En la tabla 4 se muestran los valores del efecto promedio del KP para Clorhidrato de Amilorida.

Tabla 4. Efecto promedio de los niveles de las variables estudiadas sobre la KP para cada experimento.
Clorhidrato de Amilorida.

NIVEL	VARIABLE			
	IC	IC/SR	SR	T
1	7.914E-4	7.774E-4	6.529E-4	2.729E-4
2	5.381E-4	1.843E-4	2.151E-4	9.855E-4
3	5.737E-4	9.415E-4	1.000E-3	6.448E-4

En la tabla 5 se muestran los valores de efecto promedio de "n" para Clorhidrato de Amilorida.

Tabla 5. Efecto promedio de los niveles de las variables estudiadas sobre la "n" para cada experimento.
Clorhidrato de Amilorida

NIVEL	VARIABLE			
	IC	IC/SR	SR	T
1	1.161	1.051	1.006	0.897
2	1.108	0.883	0.876	1.117
3	0.753	1.089	1.141	1.008

Donde "n" es el coeficiente de transporte de modelo exponencial.

**Tabla 6. Análisis de Varianza (ANOVA) de las constantes de velocidad de permeación, originados por el AO L9(3⁴).
Clorhidrato de Amilorida.**

FUENTE	GL	SC	V	F	S'	"p"
Ic	2	2.256E-7	1.128E-7	—	—	—
Ic/SR	2	1.904E-6	9.520E-7	8.440	1.678E-6	28.92
SR	2	2.020E-6	1.010E-6	8.954	1.794E-6	30.92
T	2	1.525E-6	7.625E-7	6.760	1.299E-6	22.39
e1	0	0.0000	—	—	—	—
e2	9	1.278E-7	1.420E-8	0.126	-8.874E-7	-15.20
(e)	2	2.256E-7	1.128E-7	—	1.918E-6	33.06
TOTAL	17	5.802E-6	3.431E-7	—	—	—

Donde:

GL = Grados de Libertad.

SC = Suma de Cuadrados.

V = Cuadrados Medios.

F = Varianza Relativa.

S' = Suma de Cuadrados Corregida.

"p" = Contribución en porciento.

e1 y e2 = Error primario y secundario respectivamente.

(e) = Error medio.

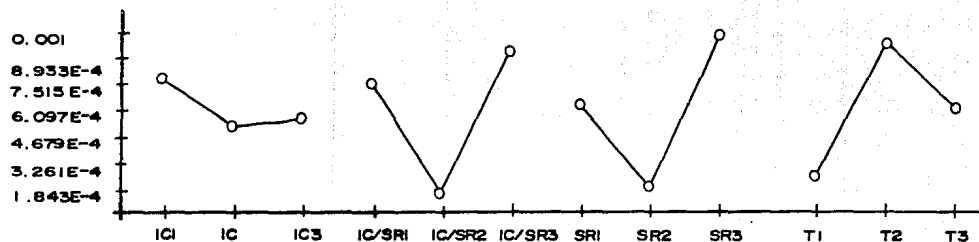


FIGURA 9. GRAFICO DE LOS EFECTOS FACTORIALES DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS SOBRE Kp

CLORHIDRATO DE AMILORIDA.

Tabla 7. Análisis de Varianza (ANOVA) de los coeficientes de transporte exponencial, originados por el AO L9(3⁴). Clorhidrato de Amilorida.

FUENTE	GL	SC	V	F	S'	"P"
Ic	2	0.590	0.295	_____	0.446	39.93
Ic/SR	2	0.144	0.072	4.098	_____	_____
SR	2	0.210	0.105	_____	0.066	5.91
T	2	0.145	0.072	1.459	0.001	0.09
e1	0	0.000	_____	1.000	_____	_____
e2	9	0.028	0.003	_____	-0.620	-55.50
(e)	2	0.144	0.072	0.042	1.224	109.50
TOTAL	17	1.117	0.066	_____	_____	_____

Donde:

GL = Grados de Libertad.

SC = Suma de Cuadrados.

V = Cuadrados Medios.

F = Varianza Relativa.

S' = Suma de Cuadrados Corregida.

"P" = Contribución en porcentaje.

e1 y e2 = Error primario y secundario respectivamente.

(e) = Error medio.

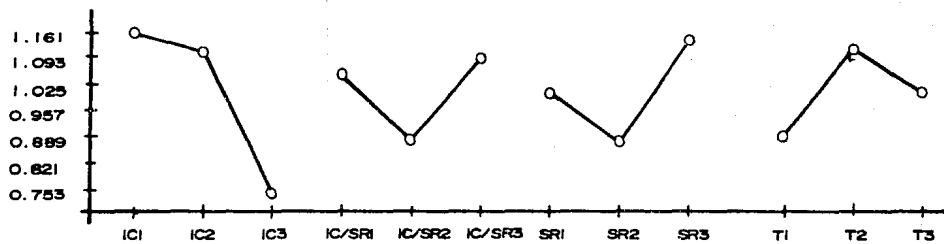


FIGURA 10. GRAFICOS DE LOS EFECTOS FACTORIALES DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS SOBRE "n".

CLORHIDRATO DE AMILORIDA.

IV.3. Resultados para el mejor experimento (experimento con Kp mayor).

A partir del análisis estadístico anterior, se determinó el mejor experimento, o el experimento con la Kp mayor. En las siguientes tablas y gráficas se muestran los parámetros obtenidos más importantes.

IV.3.1. Cantidad Permeada contra tiempo.

Tabla 8. Valores promedio de cantidad permeada por centímetro cuadrado (Q) contra tiempo (Fig. 11) para los experimentos con Kp mayor y Kp menor.
Clorhidrato de Amilorida.

TIEMPO (h)	CANTIDAD PERMEADA (mg/cm ²)	
	EXP. Kp MENOR	EXP. Kp MAYOR
1	0.079434	0.176839
2	0.103694	0.539075
3	0.134058	1.013986
4	0.160075	1.456872
5	0.182630	1.862497
6	0.204314	2.337729
7	0.250281	2.562934
8	0.286302	3.041446

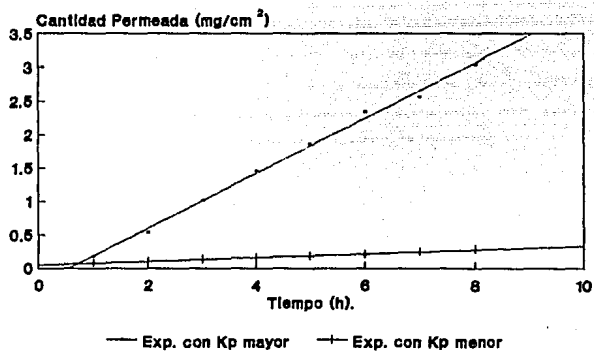


Figura 11. Cantidad Permeada contra Tiempo.

IV.3.2. Fracción Permeada contra tiempo y Ln de la Fracción Permeada contra tiempo.

Tabla 9. Valores promedio de Fracción Permeada contra Tiempo (Fig. 12) para el experimento con K_p mayor. Clorhidrato de Amilorida.

TIEMPO (h)	FRACCION PERMEADA (10^3)
1	0.6125
2	1.9165
3	3.6020
4	5.1165
5	6.5355
6	8.3945
7	9.3050
8	11.1930

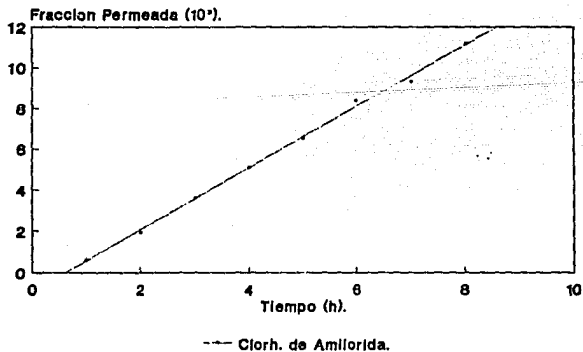


Figura 12. Fracc. Permeada contra Tiempo

Tabla 10. Valores promedio de Ln de la Fracción Permeada contra Tiempo (Fig.13) para el experimento con K_p mayor. Clorhidrato de Amilorida.

Ln TIEMPO	Ln FRACCION PERMEADA
0.00000	-7.39876
0.69315	-6.25878
1.09861	-5.62763
1.38629	-5.27550
1.60944	-5.03067
1.79176	-4.78124
1.94591	-4.68390
2.07944	-4.50439

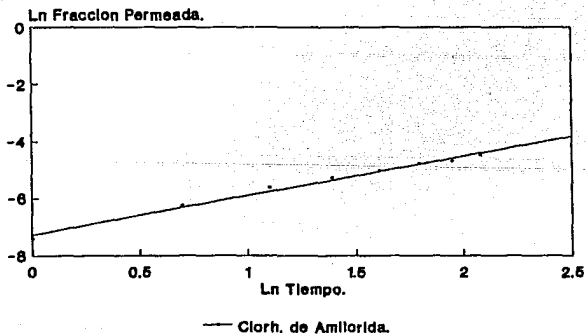
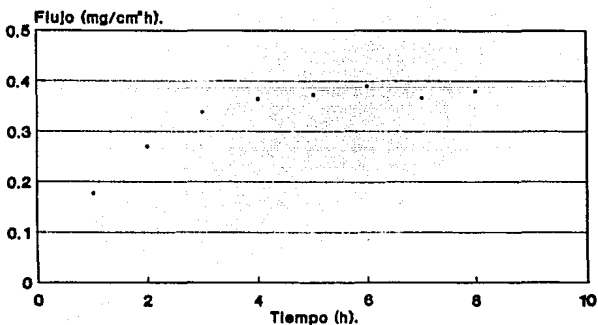


Figura 13. Ln Fraccion Permeada contra Ln Tiempo.

IV.3.3. Flujo.

Tabla 11. Valores promedio de Flujo contra Tiempo (Fig.14) para el experimento con KP mayor. Clorhidrato de Amilorida.

TIEMPO (h)	FLUJO (mg/cm ² h)
1	0.176839
2	0.269538
3	0.337995
4	0.364218
5	0.372499
6	0.389621
7	0.366133
8	0.380181



• Clorh. de Amilorida.

Figura 14. Flujo contra Tiempo.

IV.4. Parámetros cinético-termodinámicos de activación de Permeación.

Tabla 12. Valores cinético-termodinámicos para la permeación de Clorhidrato de Amilorida.

EXP.	$K^{\ddagger} (10^{20})$	ΔG	ΔH	ΔS	E_a
1	2.640	26 599.55	12 577.06	-47.06	13 167.10
2	1.197	27 611.20	12 567.18	-49.49	..
3	6.490	27 118.57	12 563.30	-46.99	..
4	1.170	28 170.17	..	-50.37	..
5	0.568	27 506.09	12 577.06	-50.10	..
6	5.325	26 712.78	12 565.18	-46.54	..
7	6.440	26 598.34	..	-46.16	..
8	0.579	28 602.37	12 563.30	-51.77	..
9	0.447	27 647.18	12 577.06	-50.57	..

donde:

- K^{\ddagger} = Constante de equilibrio del complejo activado.
- ΔG = Energía libre de transición de Gibbs (cal/mol).
- ΔH = Calor de activación de transición (cal/mol).
- ΔS = Entropía de transición (cal/mol/k).
- E_a = Energía de activación (cal/mol).

Los parámetros anteriores fueron calculados de acuerdo al procedimiento descrito en el capítulo de material y métodos.

V. DISCUSION.

V.i. Desarrollo del sistema.

Considerando los datos reportados, se montó un sistema que cumpliera con las características necesarias para el logro de los objetivos de esta investigación. Este sistema es una modificación del TPIS desarrollado por Chien y colaboradores (9).

Los componentes del TPIS modificado son los siguientes:

1) Celda de difusión de vidrio de dos compartimentos.

Bellantone y colaboradores (24) demostraron que la mejor celda de difusión para estudios iontoforéticos es la de dos compartimentos, que es la más representativa de condiciones *in vivo*, además de ser la menos compleja experimentalmente. En adición a esto, el área de contacto entre los dos compartimentos juega un papel importante por lo que se mantuvo constante (0.64 cm^2).

2) Sistema electrónico.

En base a los estudios de Chien y colaboradores (15) sobre factores electrónicos que afectan la permeación de fármacos, se diseñó el sistema electrónico. Las características de este sistema permiten que:

- a) Se pueda variar la intensidad de corriente, lo cual hizo posible el estudio de la influencia de la cantidad de corriente sobre la permeación de fármaco.
- b) Por el tipo de corriente utilizada (directa con pulsos), no se observan daños a la piel, como quemaduras producidas por tratamiento iontoforético prolongado (8 horas en este caso).
- c) Debido a la frecuencia (2 KHz), forma de onda (cuadrada) y relación encendido/apagado (1:1) se disminuya la impedancia de la piel; se evitan residuos de polarización de ciclos previos, ya que el tiempo de polarización es igual al tiempo de despolarización (5×10^{-4} segundos). Estas últimas características son de suma importancia, ya que evitan cambios irreversibles en la permeabilidad de la piel.

3) Electrodo.

Se utilizó un sistema de dos electrodos de platino (4,23,24,30,39,41,45,51). Tiene la ventaja de que no precipita proteínas aunque se reporta que causan caída en el pH y burbujas de gas en la solución cuando se aplican altas densidades de corriente (19).

La distancia entre electrodos y piel es una variable importante a controlar, por lo que se mantuvo constante desde la fabricación de las celdas, que contaban con orificios especiales para los electrodos. En cuanto al área de contacto de los electrodos con las soluciones receptora y donadora, también fue constante (0.4030 cm^2) recubriendo parte del alambre de platino con vidrio. Los electrodos se fijaron a las celdas por medio de tapones de corcho. Dichos tapones tuvieron el inconveniente de que por ser un material muy poroso y a consecuencia de las temperaturas manejadas, había cierta evaporación de solvente y acumulación de fármaco en ellos. Se recomendaría buscar otro medio de adaptación para los electrodos, o cambiar el material del tapón por otro menos poroso.

4) Piel.

Durante las pruebas preliminares, se observó que las membranas sintéticas como el celofán dan una buena permeación, pero no son representativas de condiciones *in vivo*.

Posteriormente se usó piel de ratón sin pelo, considerada como modelo adecuado para piel humana (17,23,37,43). La piel se extrajo de la región abdominal que es mas delgada y con menor contenido de queratina (8,11), pero se observó que no había buena permeación del fármaco durante las 8 horas, por lo que se decidió eliminar el estrato córneo, que es la principal barrera de permeación en piel. Behl y colaboradores (17) reportan un aumento de 3 a 4 veces en la permeabilidad al quitar el estrato córneo. Para este experimento, se usó el método propuesto por Wearley (43), que consiste en remover el estrato córneo con cinta adhesiva. Cabe señalar que este método tiene baja reproducibilidad y se recomendaría comprobar si en realidad todo el estrato córneo es eliminado.

En los experimentos dictados por el arreglo ortogonal, se obtuvieron los cortes de piel del mismo ratón, aunque de distintas zonas de la región abdominal, prefiriéndose esto a las diferencia que existiría en la piel si se usaran dos ratones.

Otros factores que fueron considerados para el montaje experimental aunque no son parte directa del sistema son los siguientes:

5) Control de la temperatura.

Primero se intentó controlar la temperatura con un baño de agua, aunque el sistema mostró variaciones hasta de $\pm 5^{\circ}\text{C}$, por lo que se le acopló un reóstato, pero seguía mostrando variaciones de $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Finalmente el método de control de temperatura que mejor funcionó (variaciones de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) fué un baño de arena controlado por un reóstato; esto se explica porque la capacidad calorífica de la arena es mayor que la del agua.

6) Agitación del sistema.

En términos estrictos, la agitación del sistema no fué controlada debido a las características del mismo; y ya que es un factor importante, se sugiere controlarlo para posteriores investigaciones.

7) Toma de muestras.

Se tomó un volumen de solución receptora suficiente para leer al espectrofotómetro devolviéndolo posteriormente al sistema con la finalidad de evitar errores experimentales en la cuantificación el fármaco por el volumen tan pequeño de la celda.

V.2. Comportamiento del sistema de permeación.

En general para los 9 experimentos, el sistema sigue una tendencia lineal durante las 8 horas. Específicamente en el caso del experimento con la K_p mayor, estas tendencias se pueden observar en las figuras 11 y 12. Además durante el tratamiento de los datos para obtención de K_p y "n" los coeficientes de determinación (r^2) fueron siempre mayores de 0.97 para los 9 experimentos. Este comportamiento lineal había sido reportado previamente para sistemas iontoforéticos (24,36,51,53).

En la figura 11 se observa el contraste de los valores de las pendientes para el experimento con K_p mayor y experimento con K_p menor, se aprecia la influencia de las condiciones elegidas de cada una de las variables involucradas en la experimentación.

Una de las grandes ventajas reportadas para las sistemas iontoforéticos (5,24,31,42,52), es que se disminuye considerablemente el tiempo de latencia (t_{lag}). Desafortunadamente en este trabajo no se pudo determinar el tiempo de latencia del sistema iontoforético usado, ya que los intervalos de muestreo durante las primeras horas de la experimentación, fueron muy grandes. Es recomendable, para trabajos posteriores, muestrear a intervalos de tiempo más cortos durante las primeras horas de la experimentación para poder obtener este dato.

Se probó estadísticamente con 95% de confianza el valor de "n" para los 9 experimentos (tabla 3) y de acuerdo al modelo exponencial (66-67), se obtuvieron 3 tipos de coeficientes de transporte que se pueden clasificar de la siguiente forma:

$n = 1$ para los experimentos 1,2,4,5,6,7 y 9.

$0.5 < n < 1.0$ para el experimento 8.

$n > 1.0$ para el experimento 3.

Cabe hacer mención de que el experimento 3 es el experimento con K_p mayor y el experimento 8 es de los de menor K_p . Entonces, el tipo de transporte que siga el Clorhidrato de Amilorida en el sistema iontoforético, está en función de los niveles de las variables manejadas, lo cual lleva a pensar que sería posible controlar el tipo de transporte y la magnitud de la K_p de un sistema iontoforético, controlando los niveles en las variables involucradas (Figura 15). Bellantone y colaboradores (24) llegaron a argumentos similares; afirman que las velocidades de transporte pueden ser optimizadas ajustando la composición iónica y utilizando densidades de corriente y modelos considerados como fisiológicamente apropiados.

En sí, en el proceso de iontoforesis, el transporte de moléculas de fármaco se efectúa por la imposición de un gradiente de potencial eléctrico a través de la piel, involucrando un efecto convectivo en el flujo de moléculas de fármaco en el sentido de la corriente. Mecánicamente el término flujo convectivo inducido por corriente es debido a electroósmosis y a un efecto del número de transporte (que se define como la fracción total de carga que puede llevar un ión) (6,14,16,19,20,33,46,47,50).

Con respecto al flujo de Clorhidrato de Amilorida para el experimento con K_p mayor (Figura 14), se observa que el estado estacionario se alcanza hasta después de 3 horas de permeación. Esto concuerda con lo reportado por Glikfeld (46), sin embargo, según Miller (42), el estado estacionario se puede alcanzar entre 1 y 5 horas dependiendo de la solubilidad del fármaco.

Es importante señalar que el comportamiento de flujo presenta las mismas tendencias para los 9 experimentos.

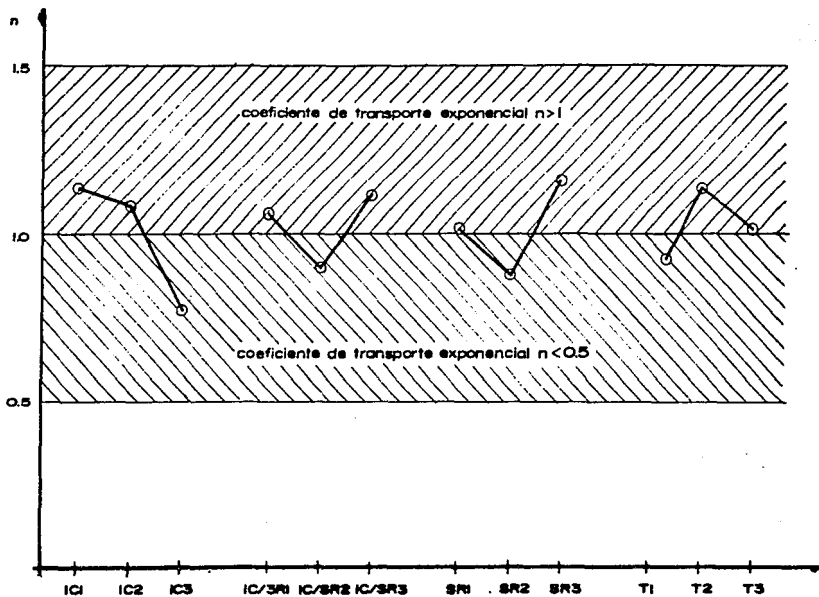


FIGURA 15. EFECTOS FACTORIALES DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS SOBRE EL COEFICIENTE DE TRANSPORTE DONDE SE MARCAN DIFERENTES ZONAS DE TRANSPORTE.

V.3. Efecto de las variables sobre la velocidad de permeación.

El D.P.T. junto con el ANOVA presentados en las tablas 2,6 y 7, y las figuras 9 y 10, permiten analizar el efecto de cada variable por separado.

V.3.1. Efecto de la intensidad de corriente (I_c).

Se sabe que el paso de moléculas iónicas a través de membranas biológicas por difusión pasiva, está extremadamente limitada por las características de éstas (67); de hecho moléculas como éstas son transportadas a través de las membranas por transporte activo, es decir, requieren aportación de cierta cantidad de energía.

El efecto de la intensidad de corriente es importante para la permeación de moléculas iónicas, porque mediante el paso de una corriente eléctrica con determinadas características, se reducen las limitaciones impuestas por la piel, permitiendo el paso de especies iónicas.

Para el Clorhidrato de Amilorida, en la tabla 7 se observa que la intensidad de corriente es la variable que más contribuye al mecanismo de transporte (39.93%). Esto corresponde con lo reportado por otros autores (4,23,30,39-41), que indican que el mecanismo de transporte de los iones de fármaco a través de piel depende de la corriente eléctrica aplicada al sistema.

Por el contrario, la tabla 6 reporta que esta variable es la que aporta una contribución mínima a la velocidad de permeación (K_p), este hecho no significa que la intensidad de corriente no influya sobre la velocidad de permeación, más bien, la contribución de otros factores es mayor.

En las figuras 9 y 10 se aprecia que el nivel de intensidad de corriente que dió una K_p y "n" mayores fue 0.5 mA, esto no corresponde a lo esperado. Una posible explicación para este fenómeno puede ser que la piel se comporta como una membrana biológica típica, es decir, poco conductora de la electricidad además de presentar cierta

impedancia. Dicha impedancia puede ser consecuencia de que con el método utilizado para remover es estrato córneo, no se haya eliminado en su totalidad.

V.3.2. Efecto de la solución receptora (SR).

La concentración de la solución receptora es de gran importancia para la permeación iontoforética de fármacos. En la tabla 6 se observa que este factor contribuye en 30.92% a la K_p , que es la aportación más grande en comparación con otras variables.

El objeto de haber variado la concentración de la solución receptora, obedece al hecho de que el Clorhidrato de Amilorida es una base relativamente débil ($pK_a = 8.7$), por lo tanto en solución, está poco disociada, y en consecuencia la concentración iónica que da por sí misma es insuficiente para la óptima conducción de la corriente. El uso de NaCl es por dos motivos: representar a los fluidos biológicos, y lo más importante, inducir la conductividad inicial en el sistema iontoforético (51), ya que se ha comprobado que los iones sodio del compartimiento receptor acarrean una porción de la corriente eléctrica a través de la piel (31). Por otro lado, Behl y colaboradores (17) recomiendan el uso de sales adicionales para fármacos poco disociados.

El efecto de la solución receptora se explica por la fuerza iónica. La fuerza iónica está dada por la concentración y el número de cargas de las especies en solución; al manejar 3 diferentes concentraciones se manipula la fuerza iónica de la solución. A concentraciones de 0.10, 0.15 y 0.20 M, se tienen fuerzas iónicas de 1.88×10^{-3} , 2.82×10^{-3} y 3.76×10^{-3} M respectivamente.

En la figura 9 se observa que a mayor concentración, mayor K_p ; se puede decir que al aumentar la fuerza iónica, aumenta la K_p , por lo que los iones adicionados ayudan al paso de moléculas de fármaco. Sin embargo, este comportamiento no se sigue a fuerza iónica intermedia, donde la K_p presenta un valor mínimo. Una posible explicación es que a fuerza iónica intermedia se tiene una concentración 0.15 M aproximadamente 0.9% de NaCl, que es la concentración isotónica de sales a nivel fisiológico; a ésta concentración no habría alteración

de las condiciones normales de la membrana por un cambio en la isotonicidad del medio, por lo tanto se comporta como membrana biológica normal (poco permeable a iones).

Alternamente, se puede afirmar que no hay efecto negativo en la velocidad de permeación por adición de sales; primero, porque hay un balance iónico entre el compartimento donador y el compartimento receptor que se aprecia haciendo un análisis de las cargas que aportan el fármaco y la sal a las soluciones: una molécula de Clorhidrato de Amilorida en solución aporta una carga positiva, y una carga negativa, una molécula de NaCl aporta una carga positiva y una carga negativa; y segundo, porque la concentración iónica de NaCl adicionada es muy baja, aún a la concentración más alta (22,24). Sería interesante averiguar que sucede a concentraciones mayores a 0.2M.

V.3.3. Efecto de la interacción Ic/SR.

La interacción Ic/SR evaluada en este trabajo, se eligió de experiencias de otros autores (19,38,49), donde al manipular uno y otro factor, se vieron tendencias cruzadas importantes, de hecho esta interacción surge de que el efecto de una misma intensidad de corriente puede tener distintos efectos de acuerdo a la actividad iónica de la solución.

La tabla 6 muestra una contribución de 28.02% de la interacción Ic/SR a la Kp y en la figura 9 se observa que el nivel 3 es el que da una Kp mayor. En dicha figura también se puede apreciar que la tendencia que sigue la interacción es igual a la seguida por SR, por lo que el efecto de la interacción se explica en gran parte por el comportamiento de SR. Tales resultados corresponden con lo reportado por Masada y colaboradores (49) que establecen que dicha interacción causa una desviación positiva de predicciones teóricas para la velocidad de permeación.

La contribución de la interacción Ic/SR al mecanismo de transporte no es significativa, lo que también concuerda con las investigaciones de Masada y colaboradores, quienes encontraron que la interacción tiene

un efecto no significativo sobre el transporte iontoforético para corrientes superiores a 0.5 mA.

V.3.4. Efecto de la temperatura.

El efecto de la temperatura sobre la permeación iontoforética se explica por el comportamiento de los lípidos en la membrana. No se puede variar fácilmente la temperatura a un lípido que se encuentra unido a un tejido, y a su vez a un organismo vivo; el comportamiento del lípido es el mismo que en cualquier organismo vivo, pero una vez que se aísla el tejido, sus lípidos sí pueden ser afectados por la temperatura, como es el caso del tejido utilizado en la experimentación (13,68).

En las figuras 9 y 10 se observa que la mayor K_p y " n " están dadas a 31 °C, esto obedece a la formación de poros en la membrana por las estructuras hexagonales que predominan a esa temperatura. Se obtienen K_p y " n " menores a 37 °C en parte a causa de la configuración de los lípidos en la membrana (en bicapa, modelo hexagonal y micelas) y en parte por el cambio de lípidos de la forma cristalina a la forma gel. La K_p y " n " más pequeñas a 25 °C también son consecuencia de la configuración en bicapa de los lípidos. Esto se podría comprobar adecuadamente con técnicas de fotomicrografía y marcado de moléculas.

V.4. Consecuencias cinético-termodinámicas de permeación.

El presente estudio da las tendencias preliminares de la cinética de activación para la permeación de Clorhidrato de Amilorida. Cabe hacer mención de que los datos obtenidos, son solo estimaciones debido a que como se mencionó en la introducción, el modelo de velocidades absolutas de Eyring tiene una serie de limitantes descritas por Brunette (54). Pero es aceptable hasta cierto punto, para efectos de hacer una aproximación a la caracterización cinético termodinámica del sistema.

De acuerdo al método de Eyring-Polanyi de mecánica estadística se transformó K_p (constante de velocidad) a K^{\ddagger} (constante de equilibrio para el estado de transición) para el cálculo de todos los parámetros

cinético-termodinámicos.

Los datos para ΔG^\ddagger expuestos en la tabla 12 indican que el proceso de permeación de Clorhidrato de Amilorida es un proceso no espontáneo, indicado por el signo (+) de ΔG^\ddagger , entonces, para que el paso de fármaco del compartimento donador al compartimento receptor se lleve a cabo se debe proporcionar una energía externa que en este caso es la corriente eléctrica. Esta energía equivale a la Energía de Activación del sistema (E_a) que es de 13,167.10 cal/mol, pudiendo definirla como la cantidad mínima de energía que se debe suministrar al sistema para que una mol de fármaco pase del compartimento donador a compartimento receptor. El valor de E_a es un valor aproximado, obtenido de efectos promedio, es decir, está dado para distintas condiciones de I_c y SR , por lo que debe considerarse como una mera estimación.

Para el caso del mejor experimento, los valores se pueden observar incluidos en el siguiente gráfico que les da un mayor sentido físico:

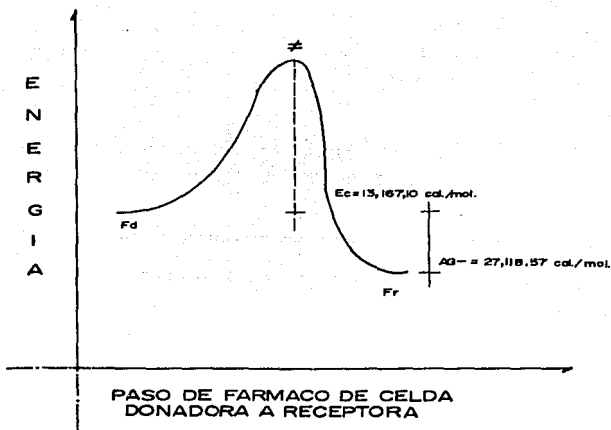


Figura 16. Valores cinético-termodinámicos para el experimento con KP mayor.

Donde:

F_d = Fármaco en la celda donadora.

F_r = Fármaco en la celda receptora.

\neq = Fármaco en la membrana.

E_a = Energía mínima requerida para que una mol de fármaco pase del compartimiento donador al compartimiento receptor.

ΔG^{\neq} = Energía libre de activación o de transición del sistema.

Los datos de ΔH^{\neq} mostrados en la tabla 12 indican que el paso de fármaco a través de la membrana se da mediante una transformación de tipo endotérmico, es decir, que para llevar a cabo el proceso debe haber una absorción de energía externa suministrada al sistema por la corriente eléctrica aplicada, en este proceso de permeación, la energía total debe estar entre 12,563.30 y 12,577.06 cal/mol.

Los valores de ΔS^{\neq} reportados en la tabla 12, dan idea del sentido que

lleva el flujo energético en el sistema. El signo (-) en el ΔS^f indica que el sistema pasa de un estado menos entrópico (más ordenado), a uno más entrópico (menos ordenado).

Finalmente, la caracterización cinético-termodinámica del sistema y proceso de permeación es la siguiente: ΔH (+) proceso endotérmico; ΔS (-) tendencia entrópica con el universo y ΔG (+) proceso espontáneo con requerimiento energético para su realización.

VI. CONCLUSIONES.

1.- Se desarrolló un sistema iontoforético para seguir la permeación de fármacos iónicos *in vitro*, presentando grandes perspectivas para usarse como sistemas de liberación controlada de fármacos.

2.- La combinación de las variables (I_c , SR y T) son importantes para K_p y "n" de Clorhidrato de Amilorida, porque al manipular los niveles de las variables estudiadas, varía el tipo de transporte y la magnitud de la K_p .

3.- El DPT fue una herramienta de gran utilidad para estudiar por separado el efecto de varios parámetros sobre K_p y "n" determinando así la contribución a la variación de cada uno de ellos. La contribución de los factores en orden descendente de importancia es, para K_p : SR, $I_c/SR, T$ e I_c ; y para "n": I_c , SR, T e I_c/SR .

4.- Se determinaron los flujos y gastos energéticos del sistema iontoforético de permeación. Los parámetros calculados ΔG , ΔS y ΔH indican que es un proceso no espontáneo y requiere una energía mínima de 13,167.10 cal/mol para que se lleve a cabo el proceso de permeación de Clorhidrato de Amilorida.

VII. ANEXO 1.

Para comprobar estadísticamente el valor de n se realizó la siguiente prueba de hipótesis:

$H_0 : 1 = 1.0$

$H_1 : 1 \neq 1.0$

Regla de decisión:

Si t_c está entre $\pm t_c$ aceptar H_0 .

Con 95% de confianza y grados de libertad ($n - 1 = 1$) $t_c = 12.706$.

EXP.	n	s	\bar{x}	t_c	Regla de decisión
1	1.0714	0.0083	5.8689	12.1656	aceptar H_0 ; $n = 1$
2	1.0147	0.0066	0.0047	3.1498	"
3	1.3389	0.0289	0.0204	16.5839	rechazar H_0 ; $n \neq 1$
4	1.0199	0.0250	0.0177	1.1257	aceptar H_0 ; $n = 1$
5	1.0066	0.0324	0.0229	0.2881	"
6	1.2939	0.0478	0.0338	8.7841	"
7	1.0040	0.0141	0.0099	0.4011	"
8	0.6271	0.0138	0.0098	-38.2100	rechazar H_0 ; $n \neq 1$
9	0.5933	0.1238	0.0875	- 4.6458	aceptar H_0 ; $n = 1$

VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Chien, Y.W. "TRANSDERMAL CONTROLLED SYSTEMIC MEDICATIONS". *Marcel Dekker, USA.* (1987).
- 2.- Wood, W.R. *Drug Deliv. Syst.* "TRANSDERMAL DRUG DELIVERY SYSTEMS". Special Issue. Enero, 40 (1986).
- 3.- Lescure, F.; Gurny, R; Doelker, E. y Augustynski, J. *Pharm. ACTA Helv.* "UTILISATION DU PRINCIPE DE I'IONTOPHORESE OU DE I'ELECTROPHORESE POUR LE CONTROLE DE LA LIBERATION DE SUBSTANCES MEDICAMENTEUSES" 64, 210-219 (1989).
- 4.- Inada, H.; Endoh, M.; Katayama, K.; Kakemi, K. y Koizumi, T. *Chem. Pharm. Bull.* " FACTOR AFFECTING SULFISOXAZOLE TRANSPORT THROUGH EXCISED RAT SKIN DURING IONTOPHORESIS" 37, 1870-1873 (1989).
- 5.- Slough, C.L.; Spinelli, M.J. y Kasting, G.B. *J. Membr. Sc.* "TRANSDERMAL DELIVERY OF ETIDRONATE (EHDP) IN THE PIG VIA IONTOPHORESIS" 35, 161-165 (1988).
- 6.- Pikal, M.j. *Pharm. Res.* "TRANSPORT MECHANISMS IN IONTOPHORESIS I. A THEORETICAL MODEL FOR THE EFFECT OF ELECTROSMOTIC FLOW ON FLUX ENHACEMENT IN TRANSDERMAL IONTOPHORESIS" 7, 118-126 (1990).
- 7.- Banga, A.J. y Chien, Y.W. *J. Cont. Rel.* "IONTOPHORETIC DELIVERY OF DRUGS: FUNDAMENTALS, DEVELOPMENTS AND BIOMEDICAL APPLICATIONS" 7, 1-24 (1988).
- 8.- Cormack, David H. "HISTOLOGIA DE HAM" *Harla*, 9a. ed. México (1989).
- 9.- Chien, Y.W.; Siddiqui, O.; Shi, W.M; Lelawongs, P. y Liu, J.C. *J. Pharm. Sc.* "DIRECT CURRENT IONTOPHORETIC TRANSDERMAL DELIVERY OF PEPTIDE AND PROTEIN DRUGS" 78, 376-383 (1989).

- 10.- Elias, P.M. *Drug Dev. Res.* "STRUCTURE AND FUNCTION OF THE STRATUM CORNEUM PERMEABILITY BARRIER" 13, 97-105 (1988).
- 11.- Chien, Yie W. "NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEMS" *Marcel Dekker Inc.*, New York (1982).
- 12.-Foreman, M.I. *Drug Dev. and Ind. Pharm.* "STRATUM CORNEUM HYDRATION: CONSEQUENCES FOR SKIN PERMEATION EXPERIMENTS" 12, 461-463 (1986).
- 13.- Cullis, P.R.; Hope, M.J. y Hicock, C.P. *Chemistry and Physics of Lipids* "LIPID POLYMORPHISM AND THE ROLES OF LIPIDS IN MEMBRANES" 40, 127-144 (1986).
- 14.- Burnette, R.R. y Ongpipattanakul B. *J.Pharm. Sc.* "CHARACTERIZATION OF THE PERMSELECTIVE PROPERTIES OF EXCISED HUMAN SKIN DURING IONTOPHORESIS" 76, 765-773 (1987).
- 15.- Liu, J.C.; Sun Y.; Siddiqui, O.; Chien, Y.W.; Shi, W. y Li, J. *Int J. Pharm.* "BLOOD GLUCOSE CONTROL IN DIABETIC RATS BY TRANSDERMAL IONTOPHORETIC DELIVERY OF INSULIN" 44, 197-204 (1988).
- 16.- Pikal, M.J. y Shah, S. *Pharm. Res.* "TRANSPORT MECHANISMS IN IONTOPHORESIS II: ELECTROSMOTIC FLOW AND TRANSFERENCE NUMBER MEASUREMENTS FOR HAIRLESS MOUSE SKIN" 7, 213-221 (1990).
- 17.- Behl, C.R.; Kumar, S.; Malick, A.W.; Del Terzo, S.; Higuchi, W.I. y Nash, R.A. *J. Pharm. Sc.* "IONTOPHORETIC DRUG DELIVERY: EFFECTS OF PHYSICOCHEMICAL FACTORS ON THE SKIN UPTAKE OF NONPEPTIDE DRUGS" 78, 355-360 (1989).
- 18.- Burnette, R.R. y Ongpipattanakul, B. *J. Pharm. Sc.* "CHARACTERIZATION OF THE PORE TRANSPORT PROPERTIES AND TISSUE ALTERATION OF EXCISED HUMAN SKIN DURING IONTOPHORESIS" 77, 132-137 (1988).

- 19.- Lelawonga, P.; Liu, J.C.; Siddiqui, O. y Chien, Y.W. *Int. J. Pharm.* "TRANSDERMAL IONTOPHORETIC DELIVERY OF ARGININE- VASOPRESSIN (I): PHYSICOCHEMICAL CONSIDERATIONS" 56, 13-22 (1989).
- 20.- Srinivasan, V. y Higuchi, W.I. *Int. J. Pharm.* "A MODEL FOR IONTOPHORESIS INCORPORATING THE EFFECT OF CONVECTIVE SOLVENT FLOW" 60, 133-138 (1990).
- 21.- Tyle, P. *Pharm. Res.* "IONTOPHORETIC DEVICES FOR DRUG DELIVERY" 3, 318-326 (1986).
- 22.- Phipps, J.B.; Padmanabhan, R.V. y Lattin, G.A. *J. Pharm. Sc.* "IONTOPHORETIC DELIVERY OF MODEL INORGANIC AND DRUG IONS" 78, 365-369 (1989).
- 23.- Del Terzo, S.; Behl, C.R. y Nash, R.A. *Pharm. Res.* "IONTOPHORETIC TRANSPORT OF A HOMOLOGOUS SERIES OF IONIZED AND NONIONIZED MODEL COMPOUNDS: INFLUENCE OF HYDROPHOBICITY AND MECHANISTIC INTERPRETATION" 6, 85-90 (1989).
- 24.- Bellantone, N.H.; Rim, S.; Francoeur, M.L. y Rasadi, B. *Int. J. Pharm.* "ENHANCED PERCUTANEOUS ABSORPTION VIA IONTOPHORESIS I. EVALUATION OF AN IN VITRO SYSTEM AND TRANSPORT OF MODEL COMPOUNDS" 30, 63-72 (1986).
- 25.- Sanderson, J.E.; Del Riel, S. y Dixon, R. *J. Phar. Sc.* "IONTOPHORETIC DELIVERY OF NONPEPTIDE DRUGS: FORMULATION OPTIMIZATION FOR MAXIMUM SKIN PERMEABILITY" 78, 361-364 (1989).
- 26.- Wearley, L.; Liu, J.C. y Chien Y. W. *J. Contr. Rel.* "IONTOPHORESIS-FACILITATED TRANSDERMAL DELIVERY OF VERAPAMIL I. IN VITRO EVALUATION AND MECHANISTIC STUDIES" 8, 237-250 (1989).
- 27.- Miller, L.L. y Smith, G. *Int. J. Pharm.* "IONTOPHORETIC TRANSPORT OF ACETATE AND CARBOXYLATE IONS TROUGH HAIRLESS MOUSE SKIN. A CATION EXCHANGE MEMBRANE MODEL" 49, 15-22 (1989).

- 28.- Siddiqui, O.; Roberts, M.S. y Polack, A.E. *J. Pharm. Pharmacol.* "IONTOPHORETIC TRANSPORT OF WEAK ELECTROLYTES THROUGH THE EXCISED HUMAN STRATUM CORNEUM" 41, 430-432 (1989).
- 29.- Robinson, J.R. y Lee, V.H. "CONTROLLED DRUG DELIVERY". FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS. *Marcel Dekker Inc.*, New York (1987).
- 30.- Koizumi, T.; Kakemi, M.; Katayama, K.; Inada, H.; Sudeji, K. y Kawasaki, M. *Chem. Pharm. Bull.* "TRANSFER OF DICLOFENAC SODIUM ACROSS EXCISED GUINEA PIG SKIN ON HIGH FREQUENCY PULSE IONTOPHORESIS. I. EQUIVALENT CIRCUIT MODEL" 38, 1019-1021 (1990).
- 31.- Kasting, G.B.; Merrit, E.W. y Keister, J.C. *J. Membr. Sc.* "AN IN VITRO METHOD FOR STUDYING THE IONTOPHORETIC ENHANCEMENT OF DRUG TRANSPORT THROUGH SKIN" 35, 137-159 (1988).
- 32.- Kasting, G.B. y Keister, J.C. *J. Contr. Rel.* "APPLICATION OF ELECTRODIFFUSION THEORY FOR A HOMOGENEOUS MEMBRANE TO IONTOPHORETIC TRANSPORT THROUGH SKIN" 8, 195-210 (1989).
- 33.- Pikal, M.J. y Shah, S. *Pharm. Res.* "TRANSPORT MECHANISMS IN IONTOPHORESIS III. AN EXPERIMENTAL STUDY OF THE CONTRIBUTIONS OF ELECTROOSMOTIC FLOW AND PERMEABILITY CHANGE IN TRANSPORT OF LOW AND HIGH MOLECULAR WEIGHT SOLUTES" 7, 222-229 (1990).
- 34.- Miller, L.L.; Smith, G.A.; Chang, A. y Zhou, Q.X. *J. Contr.r. Rel.* "ELECTROCHEMICALLY CONTROLLED RELEASE" 6, 293-296 (1987).
- 35.- Tojo, K.; Chiang, C.C.; Doshi, U. y Chien Y.W. *Drug Dev and Ind. Pharm.* "STRATUM CORNEUM RESERVOIR CAPACITY AFFECTING DYNAMICS OF TRANSDERMAL DRUG DELIVERY" 14, 561-572 (1988).
- 36.- Srinivasan, V.; Su, M.H.; Higuchi, W.I. y Behl, C.R. *J. Pharm. Sc.* "IONTOPHORESIS OF POLYPEPTIDES: EFFECT OF ETHANOL PRETREATMENT OF HUMAN SKIN" 79, 588-591 (1990).

- 37.- Srinivasan, V.; Higuchi, W.I.; Sims, S.M.; Ghanem, A.H. y Behl, C.R. *J. Pharm. Sc.* "TRANSDERMAL IONTOPHORETIC DRUG DELIVERY: MECHANISTIC ANALYSIS AND APPLICATION TO POLYPEPTIDE DELIVERY" 78, 370-375 (1989).
- 38.- Sarpodatar, P.P. y Zatz, J.L. *Drug Dev. and Ind. Pharm.* "PERCUTANEOUS ABSORPTION ENHACEMENT BY NONIONIC SURFACTANTS" 13, 15-37 (1987).
- 39.- Bannon, Y.B.; Corish, J. y Corrigan, O.I. *Drug Dev. and Ind. Pharm.* "IONTOPHORETIC TRANSPORT OF MODEL COMPOUNDS FROM A GEL MATRIX ACROSS A CELLOPHANE MEMBRANE" 13, 2617-2630 (1987).
- 40.- Bannon, Y.B.; Corish, J.; Corrigan, O.I. y Masterson, J.G. *Drug Dev. and Ind. Pharm.* "IONTOPHORETICALLY INDUCED TRANSDERMAL DELIVERY OF SALBUTAMOL" 14, 2151-2166 (1988).
- 41.- Koizumi, T.; Kakemi, M.; Katayama, K.; Inada, H.; Sudeji, K. y Kawasaki, M. *Chem. Pharm. Bul.* "TRANSFER OF DICLOFENAC SODIUM ACROSS EXCISED GUINEA PIG SKIN ON HIGH FREQUENCY PULSE IONTOPHORESIS. II. FACTORS AFFECTING STEADY-STATE TRANSPORT RATE" 38, 1022-1023 (1990).
- 42.- Miller, L.L.; Kolaskie, G.A. y Smith, G.A. *J. Pharm. Sc.* "TRANSDERMAL IONTOPHORESIS OF GONADOTROPIN RELEASING HORMONE (LHRH) AND TWO ANALOGUES" 79, 490-493 (1990).
- 43.- Wearley, L.L.; Chien, Y.W. *Int. J. Pharm.* "IONTOPHORETIC TRANSDERMAL PERMEATION OF VERAPAMIL (III): EFFECT OF BINDING AND CONCENTRATION GRADIENT ON REVERSIBILITY OF SKIN PERMEATION RATE" 59, 87-94 (1990).
- 44.- Lambert, W.J.; Higuchi, W.I.; Knutson, K. y Krill, S.L. *J. Pharm. Sc.* "EFFECTS OF LONG-TERM HYDRATION LEADING TO THE DEVELOPMENT OF POLAR CHANNELS IN HAIRLESS MOUSE STRATUM CORNEUM" 78, 925-928 (1989).

- 45.- Glikfeld, P.; Cullander, C.; Hinz, R.S. y Guy, R.H. *Pharm. Res.* "A NEW SYSTEMS FOR AN IN VITRO STUDIES OF IONTOPHORESIS" 5, 443-446 (1988).
- 46.- Glikfeld, P.; Hinz, R.S. y Guy, R.H. *Pharm. Res.* "NONINVASIVE SAMPLING OF BIOLOGICAL FLUIDS BY IONTOPHORESIS" 6, 988-990 (1989).
- 47.- Wearley, L.L.; Chien, Y.W. *Pharm. Res.* "ENHACEMENT OF THE IN VITRO SKIN PERMEABILITY OF AZYDOTHYIMIDINE (AZT) VIA IONTOPHORESIS AND CHEMICAL ENHACER" 7, 43-40 (1990).
- 48.- Srinivasan, V.; Higuchi, W.I. y Su, M.H. *J. Contr. Rel.* "BASELINE STUDIES WITH FOUR-ELECTRODE SYSTEM: THE EFFECT OF THE SKIN PERMEABILITY INCREASE AND WATER TRANSPORT ON THE FLUX OF A MODEL UNCHARGED SOLUTE DURING IONTOPHORESIS" 10, 157-165 (1989).
- 49.- Masada, T.; Higuchi, W.I.; Srinivasan, V.; Rohr, U.; Fox, J.; Behl, C. y Pons, S. *Int. J. Pharm.* "EXAMINATION OF IONTOPHORETIC TRANSPORT OF IONIC DRUGS ACROSS SKIN: BASELINE STUDIES WITH THE FOUR-ELECTRODE SYSTEM" 49, 57-62 (1989).
- 50.- Sims, S.M.; Higuchi, W.I. y Srinivasan, V. *Int. J. Pharm.* "SKIN ALTERATION AND CONVECTIVE SOLVENT FLOW EFFECTS DURING IONTOPHORESIS I. NEUTRAL SOLUTE TRANSPORT ACROSS HUMAN SKIN" 69, 109-121 (1991).
- 51.- Tu, Y.H.; Allen, L.V. *J. Pharm. Sc.* "IN VIVO IONTOPHORETIC STUDIES USING A SYNTHETIC MEMBRANE" 78, 211-213 (1989).
- 52.- Wearley, L.; Lui, J.C. y Chien, Y. W. *J. Contr. Rel.* "IONTOPHORESIS FACILITATED TRANSDERMAL DELIVERY OF VERAPAMIL I. IN VITRO EVALUATION AND MECHANISTIC STUDIES" 8, 237-250 (1989).
- 53.- Lelawongs, P.; Liu, J.C. y Chien, Y.W. *Int. J. Pharm.* "TRANSDERMAL IONTOPHORETIC DELIVERY OF ARGININE-VASOPRESIN (II): EVALUATION OF ELECTRICAL AND OPERATIONAL FACTORS. 61, 179-188 (1991).

- 54.- Hadgraft, J. y Guy, R. "TRANSDERMAL DRUG DELIVERY" *Marcel Dekker Inc.*, New York (1989).
- 55.- Castellan, Gilbert W. "FISICOQUIMICA" *Fondo Educativo Interamericano*, México (1976).
- 56.- Martin, Alfred; Swarbrick, James y Cammarata, Arthur "PHYSICAL PHARMACY" *Lea & Febiger*, 3rd. ed. Philadelphia (1983).
- 57.- Yuin, Mu y Moore, H.W. "QUALITY ENGINEERING PRODUCTS AND PROCESS DESIGN OPTIMIZATION (Based on the work of Dr. Genichi Taguchi)" *American Supplier Inst. Inc.* Dearborn, Mi. (1986).
- 58.- D'Errico, J.H. y Zaino, A. *Technometrics* "STATISTICAL TOLERANCING USING A MODIFICATION OF TAGUCHI'S METHOD" 30, 397-405 (1988).
- 59.- Sullivan, P.L. *Quality Progress* "THE POWER OF TAGUCHI METHODS" Junio, 76-79 (1987).
- 60.- Adams, B.M. y Woodall, W.H. "AN ANALYSIS OF TAGUCHI'S ON-LINE PROCESS-CONTROL PROCEDURE UNDER A RANDOM WALK MODEL" 31, 401-413 (1989).
- 61.- "THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, XXI". United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, Md. (1985).
- 62.- Florey, Klaus. "ANALYTICAL PROFILES OF DRUG SUBSTANCES" Vol. 15. *Academic Press, Inc.* Florida (1986).
- 63.- Herness, M.S. *J. Comparative Physiology A*. "EFFECT OF AMILORIDE ON BULK FLOW AND IONTOPHORETIC TASTE STIMULI IN THE HAMSTER" 160, 281-288 (1987).
- 64.- Atkins, P.W. "FISICOQUIMICA" *Fondo Educativo Interamericano*, México (1985).

65.- Alvarez, N. Fernando A. "CARACTERIZACION CINETICO-TERMODINAMICA DE ALGUNOS SISTEMAS POLIMERICOS HINCHABLES, CON USO POTENCIAL COMO RESERVORIOS DE LIBERACION CONTROLADA DE FARMACOS". Tesis de grado. ITESM Campus Monterrey (1989).

66.- Peppas, N. *Pharm. ACTA Helv.* "ANALYSIS OF FICKIAN AND NONFICKIAN DRUG RELEASE FROM POLYMERS" 60, 4 (1985).

67.- Ritger P.L. y Peppas, N. J. *Contr. Rel.* "A SIMPLE EQUATION FOR DESCRIPTION OF SOLUTE RELEASE II. FICKIAN AND ANOMALOUS RELEASE FROM SWELLABLE DEVICES" 5, 37-42 (1987).

68.- Rawn, David J. "BIOQUIMICA" Mc Graw Hill- Interamericana, Barcelona (1990).