

35
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“ OPTIMIZACION DE UN SISTEMA IONTOTERAPEUTICO DE
PERMEACION CONTROLADA: USO DE LA INGENIERIA DE CALIDAD ”**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A N :

**GUADALUPE OLIVARES DELGADO
HECTOR BRISEÑO MAGALDI**

DIRECTOR DE TESIS:

**M. EN C. FERNANDO A.
ALVAREZ NUÑEZ**



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	ii
I. Introducción.	1
I.1. Antecedentes.	1
I.2. Características de la piel.	3
I.3. Propiedades Eléctricas de la Piel.	5
I.4. Estrato Córneo como Barrera de Permeación Transdérmica.	7
I.5. Ruta y Mecanismo de Permeación Iontoforético.	8
I.5.1. Flujo Electrosmótico y Convectivo.	8
I.5.2. Transporte Iónico Vía Poros.	11
I.5.3. Hidratación de la Piel.	12
I.6. Componentes del Sistema Iontoforético.	14
I.6.1. Sistema de Permeación.	14
I.6.2. Sistema Electrónico.	15
I.6.3. Sistema de Electrodo.	15
I.6.4. Membrana de Permeación.	15
I.6.5. Sistema Regulador de Temperatura.	16

	Página
I.7. Diseño Paramétrico de Taguchi.	17
I.7.1. Optimización.	17
I.7.2. Arreglo Ortogonal de Factores y Niveles.	18
I.8. Características de los Fármacos.	20
I.8.1. Naproxén.	20
I.8.2. Fosfato Sódico de Hidrocortisona.	21
II. Planteamiento del Problema.	22
II.1. Objetivos.	23
III. Parte Experimental.	24
III.1. Material.	24
III.2. Equipo.	24
III.3. Método.	24
III.3.1. Evaluaciones Previas.	24
III.3.2. Arreglo Ortogonal.	26
III.3.3. Obtención de la Muestra de Piel.	27
III.3.4. Montaje del Sistema Iontoterapéutico.	27
III.3.5. Toma de Muestra de Piel.	28

	Página
IV. Resultados.	29
IV.1. Resultados de los Experimentos del Arreglo Ortogonal.	29
IV.2. Análisis Estadístico.	30
IV.3. Condiciones para la Optimización.	33
IV.4. Resultados para los Experimentos en Condiciones Óptimas y No Óptimas.	33
V. Discusión.	47
V.1. Sistema Iontoterapéutico.	47
V.1.1. Celdas de Difusión.	47
V.1.2. Sistema Electrónico.	47
V.1.3. Sistema de Electrodo.	48
V.1.4. Membrana de Permeación (Piel).	49
V.2. Comportamiento del Sistema Iontoterapéutico.	50
V.3. Optimización.	52
V.4. Efectos de las Variables sobre la Kp.	54
V.4.1. Intensidad de Corriente.	54
V.4.2. Temperatura.	55
V.4.3. Estrato Corneo.	55
V.4.4. Solución Receptora.	56

	Página
V.4.5. pH.	57
V.4.6. Concentración.	58
VI. Conclusiones.	59
Anexo 1.	60
VII. Referencias.	61

Indice de Figuras.

	Página
Figura 1. Estructura de la piel. (corte transversal).	4
Figura 2. (a-b)Efecto de moléculas cargadas sobre el flujo de moléculas neutras en presencia de un campo eléctrico. (b)Flujo en un poro cargado o electroósmosis.	9
Figura 3. Diagrama del Sistema Iontoterapéutico.	28
Figura 4. Gráfico de los efectos promedio de los niveles de las variables sobre la Kp.	31
Figura 5. Gráfico de cantidad permeada contra tiempo. (Naproxén Sódico).	35
Figura 6. Gráfico de fracción permeada contra tiempo. (Naproxén Sódico).	37
Figura 7. Gráfico de flujo contra tiempo. (Naproxén Sódico).	39
Figura 8. Gráfico de cantidad permeada contra tiempo. (Fosfato Sódico de Hidrocortisona).	41
Figura 9. Gráfico de fracción permeada contra tiempo. (Fosfato Sódico de Hidrocortisona).	43
Figura 10. Gráfico de flujo contra tiempo. (Fosfato Sódico de Hidrocortisona).	45

Indice de Tablas.

	Página
Tabla 1. Arreglo ortogonal $L_8(2^7)$.	19
Tabla 2. Condiciones experimentales.	20
Tabla 3. Arreglo ortogonal $L_8(2^7)$, con las variables experimentales y sus respectivos niveles.	26
Tabla 4. Valores de la constante de permeación (Kp) vs tiempo para cada experimento del arreglo ortogonal.	29
Tabla 5. Efecto promedio de los niveles de las variables sobre la Kp.	30
Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA) de las Kp dadas por el arreglo ortogonal.	32
Tabla 7. Condiciones óptimas y no óptimas.	33
Tabla 8. Valores de cantidad permeada vs tiempo. (Naproxén Sódico).	34
Tabla 9. Valores de fracción permeada vs tiempo. (Naproxén Sódico).	36
Tabla 10. Valores de flujo vs tiempo. (Naproxén Sódico).	38
Tabla 11. Valores de cantidad permeada vs tiempo. (Fosfato Sódico de Hidrocortisona).	40

I. INTRODUCCION

La administración transdérmica de fármacos ha ganado mucha atención en los últimos años, debido a que hay un gran número de fármacos que sufre degradación gastrointestinal y/o biotransformación en el hígado, además; la eficiencia terapéutica del fármaco y su intervalo de seguridad se alcanzan reduciendo el tamaño y el número de dosis.

Un sistema tradicional de liberación transdérmica de fármacos sigue un proceso de difusión pasiva, siendo considerado el estrato corneo la mayor barrera para la difusión de moléculas. Los fármacos no ionizables presentan relativa permeabilidad para atravesar la piel vía difusión pasiva, mientras que los ionizables (péptidos, etc) presentan baja o nula permeabilidad impidiendo por lo tanto que estos migren a través del estrato corneo. (1,2,3,4)

Se ha observado que ciertas sustancias ionizables al aplicar un campo eléctrico aumentan su permeabilidad, por lo que difunden más fácilmente a través de la piel. (2,5)

I.1. Antecedentes.

El potencial que presenta la electricidad como una aplicación biomédica fue empleada aún antes de que este fuera estudiado, cuando el físico griego AETius prescribió el shock del Torpedo "descarga eléctrica producida por un pez" para el tratamiento de la gota. El probablemente no tenía idea alguna de la importancia que esto tomaría al paso del tiempo. (2,6)

La idea de aplicar corriente eléctrica para aumentar la penetración de moléculas a través del tejido superficial fue descrita por Veratti en 1747. Pero los primeros experimentos bien documentados acerca del transporte de fármacos a través de la piel por medio de una corriente eléctrica fueron hechos por Leduc. (2,6,7)

El proceso que induce un incremento en la permeación de moléculas de soluto siguiendo el flujo de una corriente eléctrica a través de una membrana se llama IONTOFORESIS. (2,5,8,12,13)

Anteriormente la definición de iontoforesis solo se refería a la permeación de moléculas ionizadas, pero ahora se sabe que moléculas neutras también son afectadas al aplicar una corriente. (8,9,14,18,24,33).

La iontoforesis ha encontrado un uso amplio en varias situaciones clínicas, las primeras aplicaciones se limitaban a la liberación de iones metálicos pero después fué usada en una amplia variedad de fármacos. La iontoforesis ha sido aplicada en la liberación de fármacos en muslo, articulaciones, oído, área dental, cervix, ojos y piel. (1,2,8,36)

Una aplicación muy común de la iontoforesis es en el tratamiento de la hiperhidrosis en dermatología, es muy efectiva para la administración de anestésicos locales, otra aplicación de este tipo de sistemas es en la administración de potentes medicamentos contra el dolor en el tratamiento de enfermedades crónicas; como en el caso del cancer en etapas finales, artritis, etc. (2,8,36)

El aumento en la liberación iontoforética puede deberse a:

1) El voltaje aplicado, el cual ejerce una influencia directa sobre el flujo de solutos cargados a través del gradiente de potencial electroquímico; 2) Un aumento en la permeabilidad de la piel (alteración de las propiedades de la piel) al aplicar corriente eléctrica; 3) El flujo convectivo del agua.
(2,8,9,10,11,12,13,14,)

I.2. Características de la Piel.

La piel, uno de los órganos más extensos y accesibles del cuerpo humano, recibe aproximadamente una tercera parte de la sangre circulante, actúa como una barrera protectora contra ataques externos físicos y químicos, ayuda a regular la temperatura corporal y juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea, la piel es también el iniciador de la vitamina D.
(16,17)

La piel está formada fundamentalmente por 3 capas de función y estructura diferentes; La epidermis, la dermis y la hipodermis o tejido subcutáneo.
fig.1

La epidermis, la capa más externa actúa como una barrera protectora contra bacterias, irritantes químicos, alérgenos y en general cualquier agente extraño al organismo que quiera penetrar a través de ella, constituye además la primera barrera de permeación percutánea de fármacos.

La epidermis consta de una capa basal de células que constantemente se dividen y lentamente pasan a formar el estrato córneo constituido por células muertas, planas sin núcleo y queratinizadas, esta constituye la capa más externa de las que conforman a la epidermis, está compuesto por aproximadamente 40% de proteínas (principalmente queratina) y 20% de agua, el resto

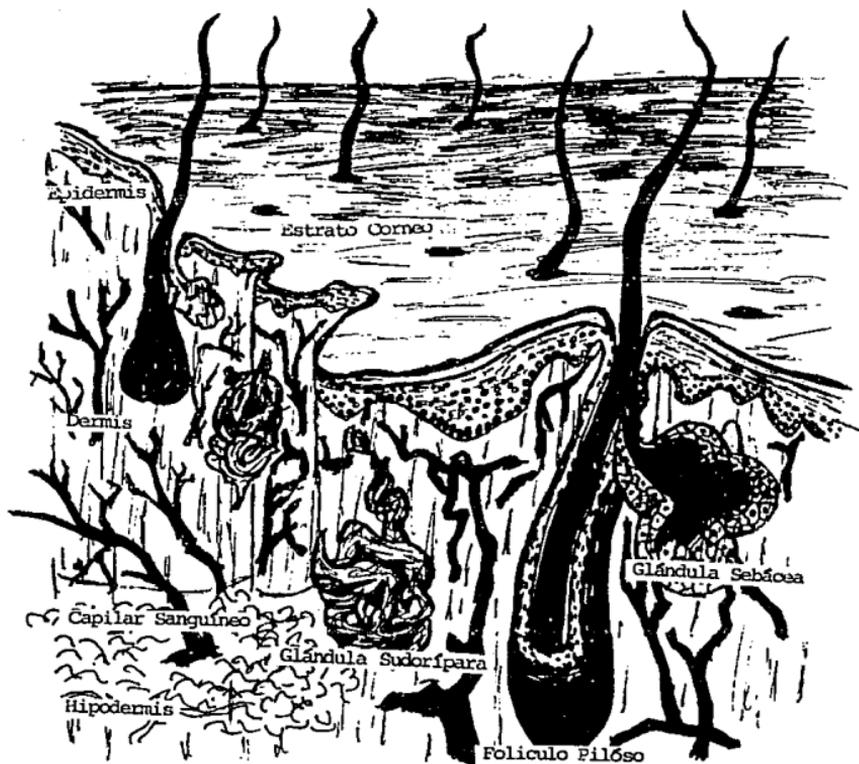


Fig.1 Estructura de la piel (Corte transversal)

está constituido por lípidos(16), selectivamente enriquecido con ceramidas, esteroleos libres y ácidos grasos libres, con pequeñas cantidades de fosfolípidos, ésteres de esteroles, triglicéridos, sulfato de colesterol e hidrocarburos. Aunque no se conoce el papel preciso de estos componentes, el estrato corneo insoluble parece proporcionar un esqueleto estructural rígido para las células cornificadas, un puente para la inserción de filamentos de queratina y una gran barrera de resistencia para los asaltos químicos externos. Además posee una permeabilidad selectiva, y regula la relativa hidratación de la piel.(17)

La dermis, abajo de la epidermis, es un tejido conectivo que contiene gran cantidad de fibras nerviosas, vasos sanguíneos, folículos pilosos, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas y fibras musculares. Su estructura se hace responsable de las propiedades elásticas de la piel.

La hipodermis es una capa aislada de tejido conectivo que contiene gran cantidad de células adiposas y cuya función principal es conservar el calor corporal y amortiguador de golpes externos. (16)

I.3. Propiedades Eléctricas de la Piel.

Las propiedades eléctricas de la piel están dominadas por el estrato corneo, la cual se considera la placa menos conductiva de la piel. El estrato corneo esta compuesto de células callosas que son buenas aisladoras, forman la principal barrera del cuerpo a la conductividad eléctrica. La relativa conductividad de varios tejidos es equivalente al contenido de agua. El estrato corneo contiene aproximadamente 20% de agua, este porcentaje es bajo comparado con el 70% que contienen otros

órganos, por lo cual se comporta como una resistencia eléctrica y es un elemento importante en la impedancia de la piel. (2,18).

Los tejidos biológicos como la piel poseen la propiedad de capacitancia debido a su habilidad para almacenar electrones y son así eléctricamente capacitores (condensadores). (2) Cuando un circuito eléctrico presenta capacitancia y elementos de resistencia, se dice que es reactivo, y se dice que presenta impedancia más que resistencia. La impedancia representa el total de la oposición del circuito al pasar corriente a través de él. Se ha visto que la impedancia de la piel humana disminuye al aumentar la frecuencia (2,18)

Cuando una corriente directa simple es usada para facilitar la penetración de moléculas, una polarización electroquímica ocurre en la piel. Esta polarización opera contra el campo de corriente aplicado y se reduce así la magnitud de corriente que entra y por lo tanto la eficiencia de la iontoforesis. Otra desventaja que se presenta con el uso de Corriente Directa simple es la producción de quemaduras. (2,19)

Para evitar y minimizar la formación de corriente polarizada se ha propuesto el uso de Corriente Directa pulsada (ciclos con un periodo de solo microsegundos). El modo de pulso es un voltaje de Corriente Directa el cual es alternado periódicamente en *on* y *off* (encendido y apagado). En el estado *on* las moléculas cargadas son forzadas a entrar en la piel y el estrato corneo es polarizado, el tiempo *off* le da oportunidad a la piel para despolarizarse retornando a sus condiciones iniciales. La relación *on/off* controla el tiempo de los procesos de polarización y despolarización en cada ciclo, esta relación varía con la frecuencia aplicada. Se ha visto que una menor energía es requerida para vencer la barrera del estrato corneo y

disminuir la impedancia que puede ser lograda aplicando corriente con una frecuencia y relación *on/off* apropiada. (2,18).

I.4. Estrato Corneo como Barrera de Permeación Transdérmica.

No todas las capas de la piel son igualmente permeables, la epidermis es mucho menos permeable que la dermis y esto se atribuye a la resistencia mostrada por el estrato corneo debido a sus componentes. (16)

Hipotéticamente el mecanismo por el cual el estrato corneo es una barrera consiste de dos partes: 1) El movimiento de moléculas extrañas a través del estrato corneo es lento, es decir la energía de activación para el proceso de difusión es generalmente alta. 2) Capacidad reservoria, para algunas moléculas al menos una fracción del material es retenido dentro del estrato corneo. (20,21)

La absorción de fármacos a través de la piel intacta puede ocurrir por las siguientes vías:

- a) A través de las células del estrato corneo.
- b) Por las apéndices de la piel como son las glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas y folículos pilosos.

La difusión a través de los folículos pilosos y glándulas sudoríparas es importante en el caso de iones, compuestos polifuncionales y moléculas con gran tamaño. Sin embargo, su contribución es limitada, debido a que la superficie de la epidermis es de 100 a 1000 veces mayor que la de los apéndices. (16)

I.5. Ruta y Mecanismo de Permeación Iontoforético.

1.5.1. Flujo Electroosmótico.

El conocer los caminos que una molécula puede seguir para atravesar la piel es de gran importancia porque de la información que se tenga, se podrá comprender en gran medida como una molécula con o sin carga es capaz de atravesar la barrera lipídica durante la iontoforesis.

También dicha información puede decir que componentes de la piel son más susceptibles a sufrir daño por el flujo eléctrico al que es sometida.

Rosendal (22) mostró que el punto isoeléctrico de la piel es de 3-4. Lo que implica que a un pH fisiológico la piel puede actuar como una red fija de carga negativa, esta red está conformada en gran medida por un gran número de proteínas, residuos aminoácidos, etc., los cuales tienen carga negativa (debido a grupos funcionales como los carboxílicos entre otros).(23)

En esencia la piel actúa como una membrana de intercambio iónico (24,15), en consecuencia, moléculas monovalentes con carga positiva pueden atravesar la piel más fácilmente que moléculas monovalentes con carga negativa. Esto se debe a que la densidad de la red con carga negativa produce un potencial electrostático que actúa como barrera contra el transporte de iones con carga negativa (efecto de oclusión de Donnan) (18,25).

Como resultado por el transporte preferencial de iones positivos con respecto a los iones negativos, cuando se aplica un voltaje a través de la piel (iontoforesis) un -momentum- será transferido a el solvente a partir de un ion positivo y no de uno negativo,

esto dará como resultado un volumen de flujo neto de moléculas en dirección del movimiento de los iones positivos (flujo electroosmótico). (13,27,28,29,30,31,37). Fig. 2.

El flujo convectivo también está involucrado en el transporte de moléculas neutras como se verá más adelante. (8,14,18,24,33,36).

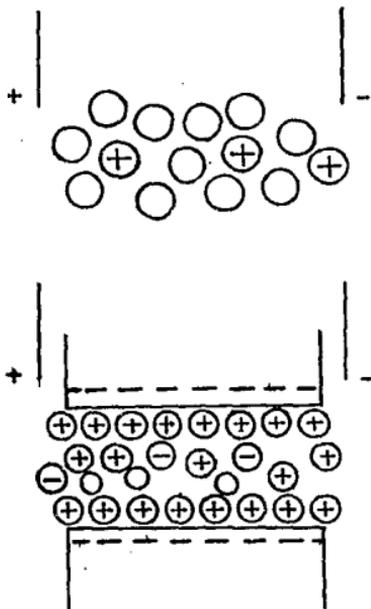


Fig.2. (a-b) Efecto de moléculas cargadas sobre el flujo de moléculas neutras en presencia de un campo eléctrico. (círculos vacíos representan solvente o soluto no cargado). (b) Flujo en un poro cargado o electroósmosis.

Es importante considerar que no solo el solvente contribuye al flujo total de materia a través de la piel, también el soluto contribuye, por efecto del número de transporte, por lo que es mejor usar el término flujo de volumen que flujo de solvente.

El número de transporte es definido como la fracción total de carga acarreada por una especie ionizada dada. (24,36).

El transporte de iones se complica aún más cuando se trata de iones polivalentes, por ejemplo el Ca^{2+} es un catión que debería ser preferentemente transportado a través de la piel en comparación con el Cl^- , sin embargo esto no ocurre, la razón por la que el Ca^{2+} no es fácilmente transportado a través de la piel, se cree se encuentra en la diferencia entre la energía libre de los sitios de interacción y la energía libre de hidratación del Ca^{2+} . (34)

No se sabe que tanto pueda alterarse la densidad de carga de la piel y por consiguiente presentarse un cambio en el transporte de solutos (mayor permeabilidad de la piel) (35) cuando la afinidad de un ion polivalente por los sitios negativos sea muy alta.

Burnette y Ongpipattanakul (24) midieron el flujo iontoforético anódico de manitol en presencia y ausencia de Ca^{2+} , el flujo pasivo de manitol (molécula polar neutra) a través de la piel humana es mínimo comparado con el flujo iontoforético, por lo que se puede despreciar el transporte debido a la difusión pasiva. La adición de Ca^{2+} a la solución donadora, mostró una marcada disminución del flujo de volumen a través de la piel. (24,36).

Tentativamente esto ocurre porque el Ca^{2+} se puede fijar a los sitios negativos de la piel, ocasionando un decremento en la movilidad de los iones monovalentes tanto catiónicos como

aniónicos (24) dando como resultado una disminución en el flujo de volumen. Los resultados obtenidos en este experimento aportan bases muy fuertes para apoyar la teoría de que el flujo convectivo se ve involucrado en el transporte iontoforético de una molécula. neutra(4,36).

Para una molécula menos polar, la influencia del flujo convectivo es apenas detectable, esto puede deberse a que la difusión pasiva es lo suficientemente fuerte como para confundirse con el flujo convectivo, o bien porque la molécula es muy lipofílica por lo que es transportada de otra forma, por ejemplo intercelularmente.(36)

I.5.2. Transporte Iónico Vía Poros.

Parece que al menos en parte, el transporte iontoforético de moléculas a través de la piel ocurre vía poros (1,2,14,27,36,38, 39).

Burnette y Ongpipattanakul (39) han realizado un experimento en el que se visualiza el movimiento de un colorante (fluoresceína) con carga vía poros. Con ayuda de microscopía un poro fué localizado y se colocó un microelectrodo a través de este observándose una diferencia de potencial máxima en este sitio, además, la diferencia de potencial decrece de una manera simétrica al mover el microelectrodo del centro del poro.

Cuando se aplica un potencial eléctrico a través de la piel se puede alterar el arreglo molecular de los componentes de la piel. Esta alteración puede producir algunos cambios en la permeabilidad de la piel.

El mecanismo flip-flop puede ser un mecanismo operacional para explicar la formación de poros en el estrato corneo (Rico en queratina y alfa helical polipéptido) dependiente del voltaje aplicado.

Este mecanismo sugiere que al aplicar un voltaje a través de la piel origina un cambio en la estructura de las hélices polipeptídicas. Los poros entonces se abren como resultado de la repulsión entre dipolos vecinos, moléculas de agua e iones pueden fluir en los poros formados para neutralizar el momento dipolo. Este fenómeno puede originar un aumento en la permeabilidad de la piel. (1,2)

Considerando la compleja estructura que tiene la piel y la forma que esta puede alterarse (lo cual se desconoce en gran medida) al ser sometida a condiciones -relativamente- adversas durante un tratamiento iontoterapéutico. Es incorrecto creer que todo el transporte de moléculas con carga ocurre vía poros. Wahlberg ha demostrado que Na^+ y Hg^{2+} pueden penetrar en forma pasiva en piel de cerdo de Guinea en zonas donde no hay folículos o glándulas. Esto sugiere que los iones pueden penetrar el estrato corneo a través de células queratinizadas (queratinocitos). Concluyéndose que no todos los iones pasan a través de poros, algunos iones pasan intercelularmente, estos atajos intercelulares son más importantes cuanto más hidratada se encuentra la piel. (40)

I.5.3. Hidratación de la Piel.

La hidratación a la que es sometida la piel durante el tiempo que dura un estudio iontoforético *in vivo* e *in vitro* es un factor muy importante en la permeación de la piel. (1,41)

El efecto de la hidratación en un estudio *in vitro* utilizando piel de ratón (sin pelo) ha sido estudiado por Behl(8) observando que para algunos alcanos, el coeficiente de permeabilidad aumentó casi al doble debido al tiempo de hidratación a que se sometió la piel (más de 30 horas).

Behl sugiere que este aumento en la permeación se debe a un cambio en la estructura lipídica del estrato corneo o en la doble capa (mosaico fluido).

Lambert y colaboradores (41), suponen que el incremento en la permeación de moléculas (hidrocortisona, bromuro de tetraetilamonio) a través de la piel se debe al aumento de la ruta polar en el estrato corneo. La ruta polar pueden ser canales acuosos en el estrato corneo, aunque no hay evidencias absolutas de esto.

Lambert propone el siguiente modelo de permeación de solutos a través del estrato corneo:

$$P_{total(t)} = P_{lipid} + P_{polar}$$

donde la permeabilidad de la ruta polar aumenta con el tiempo mientras que la ruta lipídica permanece constante.

Lo expuesto por Lambert y col.(41), supone la formación de nuevos canales para la entrada de molécula a través del estrato corneo.

Pero que sucede con los poros (folículos, glándulas sudoríparas) ya existentes al someter la piel a una constante hidratación.

Burnette y Ongpipattankul estudiaron el efecto que produce la hidratación de la piel en el transporte iontoforético de $^{36}\text{Cl}^-$

través de piel de humano. Los poros inicialmente tienen un diámetro determinado y al hidratar la piel dicho diámetro se ve disminuído en forma gradual debido al hinchamiento que sufre la piel, además; la densidad de carga en el poro es menor a un principio, siendo menos selectiva la piel por los cationes, por lo que el flujo será mayor. (24,36).

Si la cantidad de poros es pequeña, la densidad de corriente en estos será alta aunque la densidad de corriente por unidad de área de la piel sea relativamente baja, con la posibilidad de que una elevada densidad de corriente provoque daños a la piel. (24,36).

I.6. Componentes del Sistema Iontoforético.

I.6.1. Sistema de Permeación.

Ya que la iontoforesis es relativamente nueva, hay pocos tipos de aparatos *in vitro* reportados en la literatura (8,42) Generalmente es usado un sistema simple de celdas de difusión de dos compartimentos para experimentos iontoforéticos. (4,8,11,42, 43,50). Un compartimento donador, donde es colocado el fármaco en solución, un compartimento receptor, que generalmente es llenado con solución buffer o soluciones salinas isotónicas. La tendencia ahora se encamina en modificar el sistema anterior, un buen ejemplo puede hallarse en los estudios de Bellantone y colaboradores (8). Las celdas de permeación están diseñadas de tal manera que la membrana sea colocada entre las dos celdas con una área de permeación constante.

Cada celda cuenta con una entrada para el electrodo (ánodo o cátodo, según la carga del fármaco). El compartimento receptor cuenta además con una entrada para la toma de muestra.

1.6.2. Sistema Electrónico.

Se ha visto que el uso de Corriente Directa simple presenta serias desventajas, como quemaduras y la minimización de la eficiencia de corriente por polarización de la piel.(1,2) Por lo que se ha propuesto el uso de Corriente Directa pulsada. Los estudios reportados usan en general un prototipo de un Sistema Iontoterapéutico Periódico Transdérmico donde la fuente de poder construída pueda proporcionar la Corriente Directa requerida con el modo de pulso deseable, el cual puede ser ajustado variando la la frecuencia, forma de onda, relación *on/off* y la Intensidad de Corriente de acuerdo al estudio a realizar.(1,2,18)

1.6.3. Sistema de Electrodo.

La mayoría de los aparatos *in vitro* utilizan un sistema de dos electrodos uno en cada compartimento del aparato. Recientemente se ha desarrollado un sistema de cuatro electrodos, el cual tiene la ventaja de que las mediciones de voltaje son en la superficie de la piel proporcionando una medición más precisa.

El cambio de pH que a menudo acompaña el uso de electrodos metálicos puede ser evitado empleando un electrodo de Ag/AgCl (2). pero tiene el inconveniente de precipitar proteínas y péptidos.(18). Diversos investigadores han trabajado con electrodos de platino, regulando el pH por medio de un buffer (8,9,12,18,46,52).

1.6.4. Membrana de Permeación.

Para estudios intoforéticos lo más deseable es el uso de un modelo humano *in vivo*, lo cual no es práctico. Una elección apro-

ximada es el uso de piel de cadáver humano, pero como se ve el modelo posee ciertas dificultades, especialmente en término de disponibilidad de muestras de piel apropiada. Además hay factores que no son posibles de controlar como: género, edad, raza, sitio y calidad de piel del donador.

Extrapolando conocimientos y experiencias ganadas en estudios de difusión pasiva, y basándose en las diferencias y similitudes histológicas a la piel humana, para estudios iontoforéticos la piel de animal sin pelo (cerdo, rata, ratón, mono, etc.) proporcionan un buen modelo de la piel humana. (8).

El modelo más empleado ha sido el de ratón (4,5,8,9,15,31,41,46 51). La piel se extrae generalmente de la región abdominal que es la más delgada y con menor contenido de queratina. (16).

I.6.5. Sistema Regulador de Temperatura.

Un factor que debe ser considerado para el montaje experimental aunque no es parte directa del mismo, es el control de la temperatura.

En varios estudios la temperatura es controlada mediante un baño de agua recirculante. (3,9,12,24).

Cuenca y Garduño (50) intentaron controlar la temperatura con un baño de agua, el sistema mostró variaciones de $\pm 5^{\circ}\text{C}$. por lo que se acopló un reóstato, con esta adaptación el sistema mostró variaciones de $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Finalmente el método de control de temperatura que mejor funcionó fué un baño de arena controlado por un reóstato, con variaciones de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

I.7. Diseño Paramétrico de Taguchi.

I.7.1. Optimización.

Un método sistemático de optimización de un diseño para hacerlo más robusto a variaciones externas, sin aumentar el costo del mismo, ha sido desarrollado por Genichi Taguchi. (48). Este método es llamado Diseño Paramétrico.

El término -robusto- implica que las variables o factores involucrados en el diseño sean lo menos sensibles a variaciones ambientales para que el diseño sea lo más consistente posible y por consiguiente reproducible.

Los diseños paramétricos son técnicas relacionadas al diseño de experimentos clásico por medio de Arreglos ortogonales.

Los arreglos ortogonales, son diseños factoriales altamente fraccionados, que permiten separar los efectos producidos por una variable a diferentes niveles, de otras variables con sus respectivos niveles.

Por medio de los arreglos ortogonales se puede evaluar un gran número de variables a diferentes niveles, manejando un número pequeño de experimentos; ahorrándose tiempo y dinero.

También se puede evaluar una interacción entre dos factores introduciendo en el arreglo cada factor por separado y asignando la interacción como tal (ej. temperatura-solución receptora) en una columna aparte del arreglo ortogonal.

En el análisis estadístico de los datos obtenidos, Taguchi introduce el término -rho- que indica en forma porcentual la

contribución (efecto) de cada variable sobre los resultados obtenidos.

Por medio del arreglo ortogonal se determinan los niveles óptimos de cada variable del sistema.

Los pasos a seguir en el diseño de un sistema son:

- 1.-Diseño del Sistema. Diseño del prototipo.
- 2.-Diseño Paramétrico. Determinación de los niveles óptimos de los parámetros individuales del sistema, hasta hacerlo lo más robusto posible.
- 3.-Tolerancia del Diseño. Determinación de la contribución de cada parámetro hasta que la variación de las características se encuentren en un rango estrecho.

1.7.2. Arreglo Ortogonal de Factores y Niveles.

El arreglo ortogonal es una agrupación de experimentos en el que se manejan las diferentes condiciones experimentales. La notación utilizada para representar el arreglo ortogonal es la siguiente: $L_a(b^c)$.

donde:

L = arreglo.

a = número de experimentos a realizar.

b = número de niveles de cada variable.

c = número de columnas en el arreglo ortogonal.

En el presente estudio se utilizó un arreglo $L_8(2^7)$, es decir; ocho experimentos con siete variables a dos niveles cada una. Este arreglo se muestra en la tabla 1.

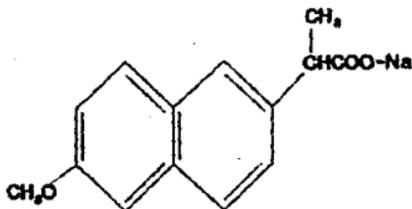
Tabla 1 Arreglo Ortogonal $L_8(2^7)$

Experimento	Variable							Respuesta
	A	B	C	D	E	F	G	
1	1	1	1	1	1	1	1	Y_1
2	1	1	1	2	2	2	2	Y_2
3	1	2	2	1	1	2	2	Y_3
4	1	2	2	2	2	1	1	Y_4
5	2	1	2	1	2	1	2	Y_5
6	2	1	2	2	1	2	1	Y_6
7	2	2	1	1	2	2	1	Y_7
8	2	2	1	2	1	1	2	Y_8

Es importante notar, que en condiciones iguales de variables y niveles un diseño factorial clásico requeriría 128 experimentos que al considerar tres repeticiones se convierten en 384 experimentos contra 24 experimentos del arreglo ortogonal con sus repeticiones.

1.8. Características de los Fármacos.

1.8.1. Naproxén.



Acido (+)-metoxi-alfa-metil-2-naftalenacético

Polvo blanco cristalino con p.f 150°C, prácticamente insoluble en agua, 1 en 25de etanol y 1 en 5 de cloroformo.

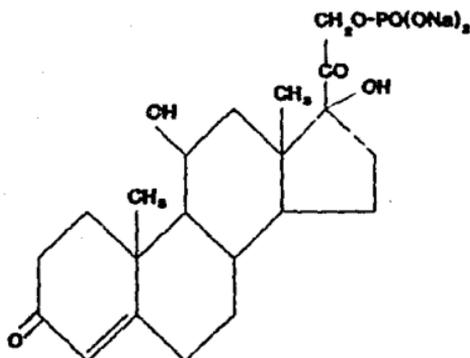
Constante de disociación pKa 4.2 (25°C)

Espectro U.V. Acido-acuosa. - 262nm, 272 nm, 315 nm y 328 nm.

Alcali-acuosa - 261nm, 271 nm, 316 nm y 330 nm.

El naproxén es una fármaco sintético derivado del ácido fenilpropiónico. El naproxén tiene propiedades analgésicas, antipiréticas y anti-inflamatorias; efectos atribuidos a su capacidad de interferir con la biosíntesis de prostaglandinas, tromboxano y prostaciclina a nivel de las prostaglandinsintetasas, así mismo inhibe la agregación plaquetaria y prolonga el tiempo de protrombina. El naproxén se absorbe bien por tracto gastrointestinal, alcanzando concentraciones plásmaticas máximas entre 1-2 horas después de su administración oral. (49).

I.8.2. Fosfato Sódico de Hidrocortisona.



$C_{21}H_{29}Na_2O_8P$

Polvo blanco cristalino e inodoro, soluble en 1 en 4 de agua, ligeramente soluble en etanol, prácticamente insoluble en cloroformo y éter.

ESPECTRO U.V. El espectro de absorción en la región ultravioleta de una solución 1 en 100,000 de la muestra en metanol, exhibe máximas y mínimas a las mismas longitudes de onda que las de la solución similar con las SRef de hidrocortisona concominadamente medidas y las respectivas absorptividades calculadas sobre las bases secas, a la longitud de onda máxima absorbancia de cerca de 242nm. (49).

Es utilizado en la artritis reumatoide, carditis reumática, enfermedades renales, edema cerebral y úlcera péptica.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente se ha dado gran énfasis a la liberación de fármacos a través de la ruta transdérmica. Ya que la piel es altamente impermeable a la mayoría de las sustancias químicas, los investigadores tienen visto los caminos para aumentar la permeabilidad de la piel. Algunas limitaciones mayores para la liberación transdérmica de fármacos como son los requerimientos de bajo peso molecular, dosis bajas, coeficientes de partición w/o pueden ser superados por la liberación iontoforética. Esto especialmente para fármacos ionizados y muy prometedor para péptidos y proteínas. (1,2,4,6,8,11,13,31,42,43,51).

Un estudio de esta índole, que involucra muchas variables, implica la realización de un gran número de experimentos; por lo tanto que el costo sea excesivo y el tiempo de investigación largo, lo anterior puede ser superado empleando un Diseño Paramétrico de Taguchi.

El análisis estadístico permite determinar la contribución de cada variable sobre el comportamiento del sistema. Al conocer la influencia de cada variable se puede elegir el nivel a trabajar de cada una y así, manipular la respuesta del sistema según convenga.

El presente trabajo pretende seleccionar el nivel óptimo de cada variable involucrada en la experimentación para optimizar un Sistema Iontoterapéutico de Permeación Controlada.

II.1. Objetivos.

-Mejorar el diseño del Sistema Iontoterapéutico para la Permeación de fármacos *in vitro*.

-Evaluar el efecto de las diferentes variables involucradas en la liberación iontoforética (temperatura, concentración, pH, estrato corneo, solución receptora, intensidad de corriente y fármaco).

-Optimizar el Sistema Iontoterapéutico mediante el uso del Diseño Paramétrico de Taguchi.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Material.

- a) Fosfato Sódico de Hidrocortisona (Syntex México S.A.)
- b) Naproxen sódico (Syntex México S.A).
- c) Cloruro de potasio.
- d) Sulfato de potasio.
- e) Fosfato de potasio monobásico.
- f) Hidróxido de sodio.

III.2. Equipo.

- a) Sistema Iontoterapéutico:
 - 1) Celdas de difusión (donadora y receptora).
 - 2) Electrodo de platino.
 - 3) Fuente de poder.
 - 4) Reóstato.
 - 5) Parrilla.
 - 6) Baño de arena.
- b) Espectrofotómetro. Spectronic 21 Baush and Lomb.
- c) Potenciómetro. Corning pH meter model 7.

III.3. Método.

III.3.1. Evaluaciones Previas.

En base a lo reportado por Cuenca y Garduño (50) y por García (47), las condiciones de experimentación (con sus diferentes niveles) a trabajar se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Condiciones Experimentales.

Factor	Nivel
Intensidad de Corriente (I.C.)	0.0 mA 1.0 mA
Temperatura (T°)	25°C 37°C
Estrato Corneo (E.C.)	con sin
Solución Receptora (S.R.)	KCl K ₂ SO ₄
pH	8 9
Tipo de Fármaco (T.F.)	FSH* NS*
Concentración Fármaco (C)	10 mg/ml 30 mg/ml

* FSH = Fosfato Sódico de Hidrocortisona.

NS = Naproxén Sódico.

Realización del barrido para determinar la longitud de onda de absorción máxima para Fosfato Sódico de Hidrocortisona (FSH) y Naproxén Sódico (NS). 240nm y 225nm respectivamente.

Elaboración de la curva de calibración para FSH y NS en las soluciones receptoras (KCl y K₂SO₄).

3.3.2. Arreglo Ortogonal.

El Arreglo Ortogonal elegido se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 3. Arreglo ortogonal $L_8(2^7)$, con las variables experimentales y sus respectivos niveles.

EXP.	I.C.	°T	E.C.	S.R.	pH	T.F.	C.
1	0.0	25	con	KCl	8	FSH	10
2	0.0	25	con	K ₂ SO ₄	9	NS	30
3	0.0	37	sin	KCl	8	NS	30
4	0.0	37	sin	K ₂ SO ₄	9	FSH	10
5	1.0	25	sin	KCl	9	FSH	30
6	1.0	25	sin	K ₂ SO ₄	8	NS	10
7	1.0	37	con	KCl	9	NS	10
8	1.0	37	con	K ₂ SO ₄	8	FSH	30

Donde:

I.C. = Intensidad de Corriente (mA).

T° = Temperatura (°C).

E.C. = Estrato Corneo.

S.R. = Solución Receptora (isotónica).

T.F. = Tipo de Fármaco.

NS (Naproxén Sódico) FSH (Fosfato Sódico de Hidrocortisona).

C. = Concentración (mg/ml).

III.3.3. Obtención de la Muestra de Piel.

Ratones macho de aproximadamente tres meses de edad son sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente es eliminado el pelo de la región media abdominal así como el exceso de tejido adiposo (15,52). Con el uso de unas tijeras la piel es retirada.

En el caso de los experimentos donde es utilizada la piel sin estrato corneo este es removido pegando y despegando 10 veces una cinta adhesiva (14).

III.3.4. Montaje del Sistema Iontoterapéutico.

Una vez obtenida la piel ésta es colocada entre el compartimento donador y receptor, con el estrato corneo dirigido hacia el compartimento donador. (51,52). El área promedio de piel expuesta a la permeación es de 0.7288 cm^2 .

El compartimento donador es llenado con solución de fármaco en buffer de fosfatos a cada uno de los valores de pH utilizados. Mientras que el compartimento receptor es llenado con solución isotónica de KCl o K_2SO_4 .

Los dos fármacos en su forma ionizada presentan carga negativa por lo que los electrodos son colocados de la siguiente forma: el cátodo en el compartimento donador y el ánodo en el receptor. Los electrodos se encuentran conectados a una fuente de poder con corriente directa (C.D) pulsada que envía una Intensidad de corriente de 1.0 mA con una frecuencia de 2 mil hertz Con un forma de onda cuadrada y una razón on/off 1:1. (18) Fig.3.

La temperatura es controlada 25 y $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por medio de una cama de arena colocada sobre una parrilla la cual se encuentra regulada por un reóstato.

III.3.5. Toma de Muestra.

Cada experimento tiene una duración de 24 horas y el muestreo se realizó de la siguiente manera:

- cada 5 min durante la primera media hora.
- posteriormente cada 10 min hasta completar la hora.
- las siguientes 7 horas se muestrea cada hora.
- de la hora 20-24 cada hora.

Las muestras son tomadas del compartimento receptor y son leídas en el espectrofotómetro de luz U.V. El volumen es regresado al compartimento. En caso de ser necesario hacer dilución de la muestra, el volumen tomado es 0.5 ml y dicho volumen es recuperado de la primera dilución que se realice.

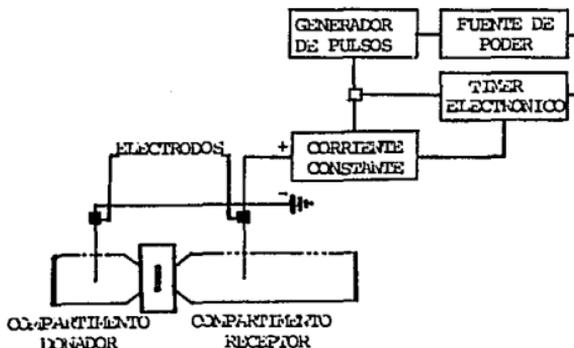


Fig.3. Diagrama del Sistema Iontoterapéutico.

IV RESULTADOS

Cada experimento del arreglo ortogonal se realizó por triplicado, de los datos obtenidos para cada experimento se calculó la constante de permeación (K_p) ya que en base a este parámetro se realizó el análisis estadístico (ANOVA) y así elegir los niveles de cada variable para la optimización del Sistema Iontoterapéutico de Permeación Controlada.

La K_p se obtuvo a partir de la pendiente del gráfico de fracción permeada contra tiempo.

IV.1. Resultados de los Experimentos del Arreglo ortogonal.

Los resultados de K_p para cada experimento del arreglo ortogonal se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Valores de Constante de Permeación (K_p) para cada experimento del Arreglo Ortogonal.

Experimento	$K_p (10^{-4}) (h^{-1})$
1	0.99
2	1.95
3	4.96
4	5.15
5	5.02
6	3.30
7	6.20
8	5.02

IV.2. Análisis Estadístico.

En la tabla 5. se muestran los valores del efecto promedio de los niveles sobre la Kp.

Tabla 5. Efecto promedio de los niveles de las variables sobre la Kp.

VARIABLE	NIVEL	
	1 (10^{-4})	2 (10^{-4})
I.C.	3.263	4.890
T	2.815	5.338
E.C.	3.545	4.608
S.R.	4.297	3.855
pH	3.567	4.585
T.F.	4.045	4.108
C.	3.915	4.237

Los valores de esta tabla se encuentran graficados en la Fig.4.

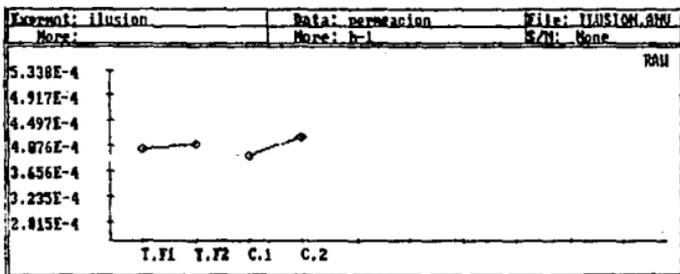
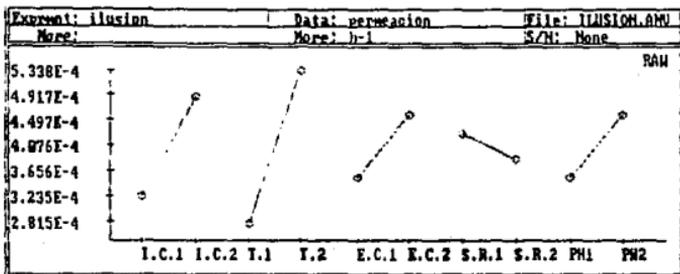


Fig. 4. Gráfico de los efectos promedio de los niveles de las variables sobre la Kp.

Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA) de las Kp dadas por el arreglo ortogonal.

FACTOR	GL	SC	V	F	S	rho
I.C.	1	5.298E-8	5.298E-8	678.101	5.290E-8	23.04
T	1	1.273E-7	1.273E-7	1629.336	1.272E-7	55.40
E.C.	1	2.258E-8	2.258E-8	289.006	2.250E-8	9.80
S.R.	1	3.916E-9	3.916E-9	50.122	3.838E-9	1.67
pH	1	2.071E-8	2.071E-8	265.072	2.060E-8	8.99
T.F.	1	7.813E-11	7.813E-11	-----	-----	----
C	1	2.080E-9	2.080E-9	26.623	2.002E-9	0.87
e1	0	0.000				
e2	0	0.000				
(e)	1	7.813E-11	7.813E-11		5.469E-10	0.24
Tl	7	2.296E-7	3.280E-8			

donde:

GL = grados de libertad.

SC = suma de cuadrados.

V = cuadrados medios.

F = varianza relativa.

S = suma de cuadrados corregida.

rho = contribución en porciento.

e1 = error primario.

e2 = error secundario.

(e) = error medio.

IV.3. Condiciones para la Optimización.

A partir del análisis estadístico anterior, se seleccionaron los niveles altos para las condiciones óptimas y los niveles bajos para las condiciones no óptimas.

En la tabla 7 se muestran las condiciones experimentales para la optimización del Sistema Iontoterapéutico de Permeación Controlada.

Tabla 7. Condiciones óptimas y no óptimas.

VARIABLE	NIVEL	
	OPTIMO	NO OPTIMO
Intensidad de Corriente	1.0 mA	0.0 mA
Temperatura	37°C	25°C
Estrato Corneo	sin	con
Solución Receptora	KCl	K ₂ SO ₄
pH	9	8
Tipo de Fármaco	FSH/NS	FSH/NS
Concentración	30mg/ml	10mg/ml

IV.4. Resultados para los Experimentos en Condiciones Optimas y no Optimas para cada Fármaco.

En las siguientes tablas y gráficas se presentan los parámetros obtenidos a las diferentes condiciones.

Tabla 8. Valores de Cantidad Permeada vs Tiempo.
(Naproxén Sódico).

TIEMPO (h)	CANTIDAD PERMEADA (mmol/cm ²)	
	Cond. Optimas (10 ⁻³)	Cond. no Optimas (10 ⁻³)
0.0000	0.0000	0.0000
0.0833	0.0000	0.0000
0.1666	0.0030	0.0000
0.2500	0.0270	0.0000
0.3333	0.0384	0.0000
0.4166	0.0533	0.0000
0.5000	0.0650	0.0000
0.6666	0.0900	0.0000
0.8333	0.1650	0.0000
1.0	0.3630	0.0087
2.0	1.2410	0.0277
3.0	2.1860	0.0689
4.0	3.0820	0.1410
5.0	4.0900	0.1940
6.0	4.9080	0.2580
7.0	5.5820	0.3470
8.0	6.5060	0.4050
20.0	17.7050	1.3720
21.0	18.4410	1.4330
22.0	19.3090	1.4920
23.0	20.5690	1.5830
24.0	21.3120	1.6570

Cantidad Permeada
(mmol/cm²)(E-03)

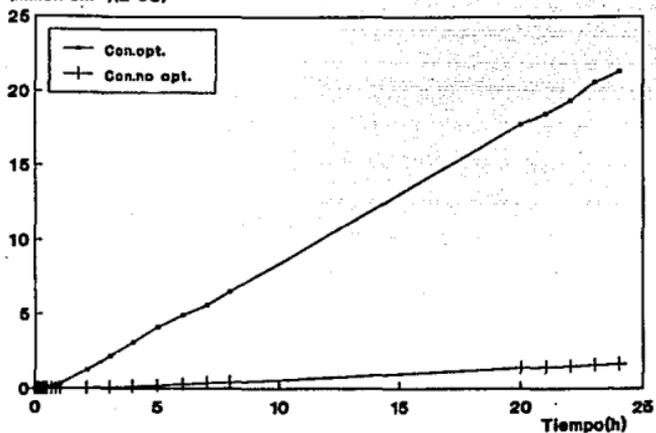


Fig. 5. Gráfico de Cantidad Permeada contra Tiempo
(Naproxén Sódico).

Datos de regresión:	Cond. opt.	Cond. no opt.
	$r^2 = 0.9995$	$r^2 = 0.9922$
	$m = 9.19 \times 10^{-4}$	$m = 7.091 \times 10^{-5}$
	$b = -4.11 \times 10^{-4}$	$b = -7.6 \times 10^{-5}$

Tabla 9. Valores de Fracción Permeada vs Tiempo
(Naproxén Sódico)

Tiempo (h)	FRACCION PERMEADA	
	Cond. Optimas (10^{-4})	Cond. No optimas (10^{-4})
0.000	0.000	0.000
0.0833	0.000	0.000
0.1666	0.014	0.000
0.2500	0.126	0.000
0.3333	0.179	0.000
0.4166	0.249	0.000
0.5000	0.303	0.000
0.6666	0.420	0.000
0.8333	0.770	0.000
1.0	1.690	0.124
2.0	5.790	0.392
3.0	10.210	0.974
4.0	14.390	1.990
5.0	18.720	2.750
6.0	22.920	3.640
7.0	27.230	4.910
8.0	30.630	5.730
20.0	82.660	19.410
21.0	86.100	20.270
22.0	90.160	21.110
23.0	96.040	22.390
24.0	99.510	23.430

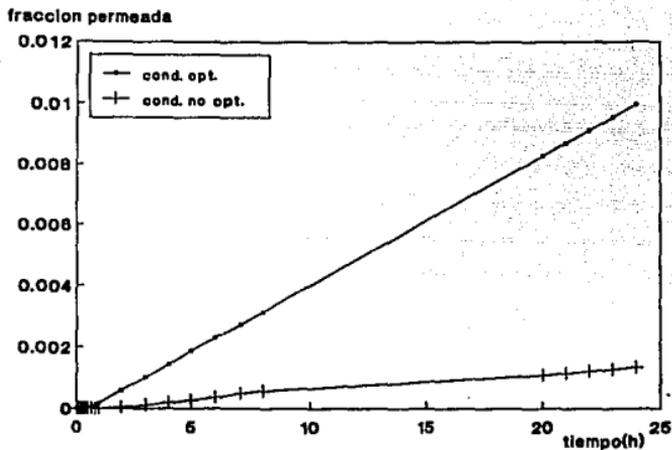


Fig. 6. Gráfico de fracción permeada contra tiempo.
(Naproxén Sódico).

Datos de regresión: Cond. opt.

$$r^2 = 0.9995$$

$$m = 4.21 \times 10^{-4}$$

$$b = -1.9 \times 10^{-4}$$

Cond. no opt.

$$r^2 = 0.9922$$

$$m = 1.003 \times 10^{-4}$$

$$b = -1.07 \times 10^{-4}$$

Tabla 10. Valores de Flujo vs Tiempo
(Naproxén Sódico)

Tiempo (h)	FLUJO (nmol/cm ² h)	
	Cond. Optimas (10 ⁻⁴)	Cond.No Optimas (10 ⁻⁴)
0.0000	0.00	0.000
0.0833	0.00	0.000
0.1666	0.18	0.000
0.2500	1.08	0.000
0.3333	1.15	0.000
0.4166	1.28	0.000
0.5000	1.30	0.000
0.6666	1.35	0.000
0.8300	1.98	0.000
1.0	3.67	0.087
2.0	6.20	0.139
3.0	7.29	0.230
4.0	7.70	0.351
5.0	8.02	0.389
6.0	8.18	0.429
7.0	8.33	0.496
8.0	8.20	0.506
20.0	8.85	0.686
21.0	8.78	0.682
22.0	8.78	0.678
23.0	8.94	0.688
24.0	8.88	0.690

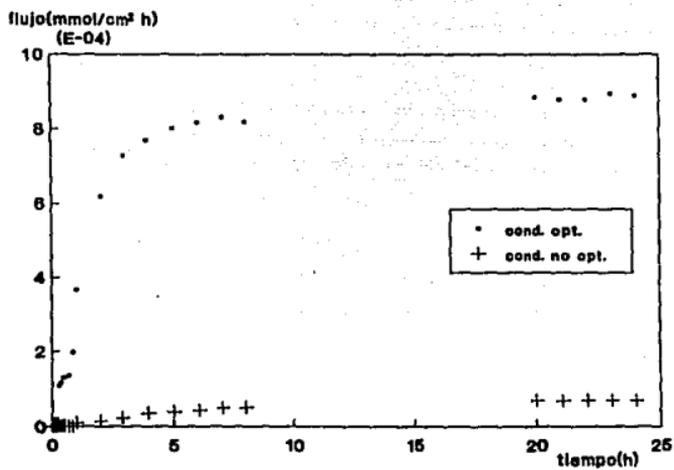


Fig. 7. Gráfico de flujo contra tiempo.
(Naproxén Sódico).

Tabla 11. Valores Cantidad Permeada vs Tiempo.
(Fosfato sódico de Hidrocortisona).

TIEMPO (h)	CANTIDAD PERMEADA (mmol/cm^2)	
	Cond. Optimas (10^{-3})	Cond. no Optimas (10^{-3})
0.0000	0.0000	0.0000
0.0833	0.0000	0.0000
0.1666	0.0619	0.0000
0.2500	0.0981	0.0000
0.3333	0.1320	0.0000
0.4166	0.1570	0.0000
0.5000	0.1860	0.0000
0.6666	0.2450	0.0000
0.8333	0.3360	0.0000
1.0	0.4450	0.0000
2.0	0.9350	0.0073
3.0	1.4360	0.0649
4.0	1.9780	0.2030
5.0	2.7600	0.2680
6.0	3.4360	0.3470
7.0	4.0730	0.4330
8.0	4.6040	0.5210
20.0	11.4760	1.3710
21.0	12.0830	1.4760
22.0	12.6910	1.5700
23.0	13.2360	1.6480
24.0	13.8650	1.7270

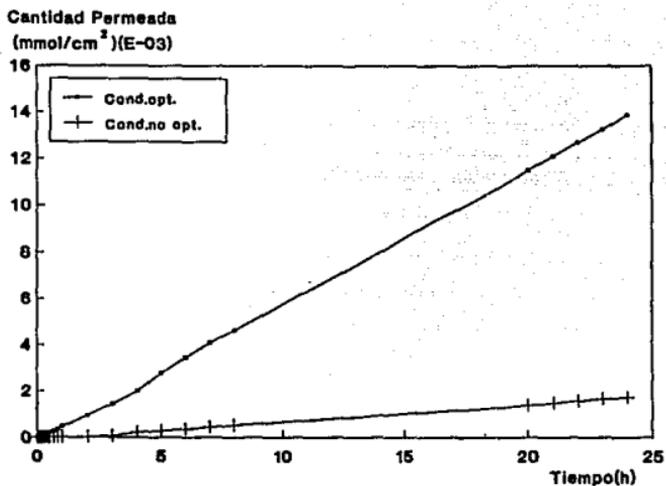


Fig. 8. Gráfico de Cantidad Permeada contra Tiempo
(Fosfato Sódico de Hidrocortisona).

Datos de regresión:	Cond. opt.	Cond. no opt.
	$r^2 = 0.9997$	$r^2 = 0.9962$
	$m = 5.81 \times 10^{-4}$	$m = 7.331 \times 10^{-5}$
	$b = -1.22 \times 10^{-4}$	$b = -6.21 \times 10^{-5}$

Tabla 12. Valores de Fracción Permeada vs Tiempo
(Fosfato Sódico de Hidrocortisona).

TIEMPO (h)	FRACCION PERMEADA	
	Cond. Optimas (10^{-4})	Cond.No Optimas (10^{-4})
0.0000	0.0000	0.0000
0.0833	0.0000	0.0000
0.1666	0.0534	0.0000
0.2500	0.8460	0.0000
0.3333	1.1400	0.0000
0.4166	1.3600	0.0000
0.5000	1.6000	0.0000
0.6666	2.1100	0.0000
0.8333	2.9000	0.0000
1.0	3.8400	0.0000
2.0	8.0700	0.1900
3.0	12.3900	1.6900
4.0	17.0700	5.2700
5.0	23.8200	6.9800
6.0	29.6600	9.0100
7.0	35.1500	11.2500
8.0	39.7300	13.5500
20.0	99.0300	35.6300
21.0	104.2800	38.3500
22.0	109.5300	40.8100
23.0	114.2300	42.8400
24.0	119.6600	44.8700

fracción permeada

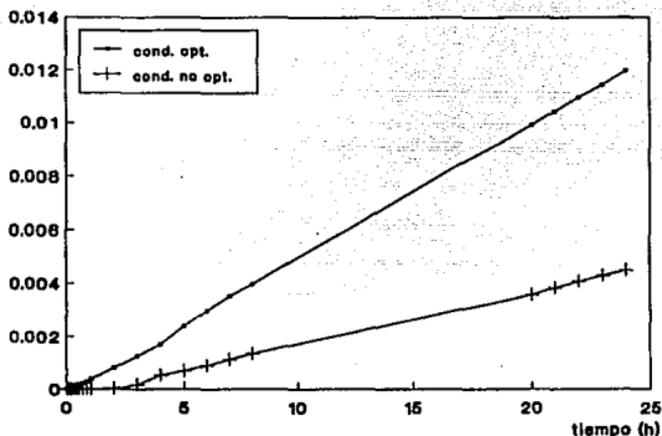


Fig. 9. Gráfico de fracción permeada contra tiempo.
(Fosfato Sódico de Hidrocortisona).

Datos de regresión:	Cond. opt.	Cond. no opt.
	$r^2 = 0.9997$	$r^2 = 0.9986$
	$m = 5.02 \times 10^{-4}$	$m = 1.979 \times 10^{-4}$
	$b = -1.053 \times 10^{-4}$	$b = -2.96 \times 10^{-4}$

Tabla 13. Valores de Flujo vs Tiempo.
(Fosfato Sódico de Hidrocortisona).

Tiempo (h)	FLUJO (mmol/cm ² h)	
	Cond. Optimas (10 ⁻⁴)	Cond. No Optimas (10 ⁻⁴)
0.0000	0.00	0.000
0.0830	0.00	0.000
0.1666	3.71	0.000
0.2500	3.92	0.000
0.3333	3.97	0.000
0.4166	3.77	0.000
0.5000	3.71	0.000
0.6666	3.67	0.000
0.8333	4.04	0.000
1.0	4.45	0.000
2.0	4.67	0.365
3.0	4.79	0.216
4.0	4.95	0.507
5.0	5.52	0.537
6.0	5.73	0.578
7.0	5.82	0.619
8.0	5.76	0.652
20.0	5.74	0.685
21.0	5.75	0.703
22.0	5.77	0.714
23.0	5.75	0.717
24.0	5.78	0.719

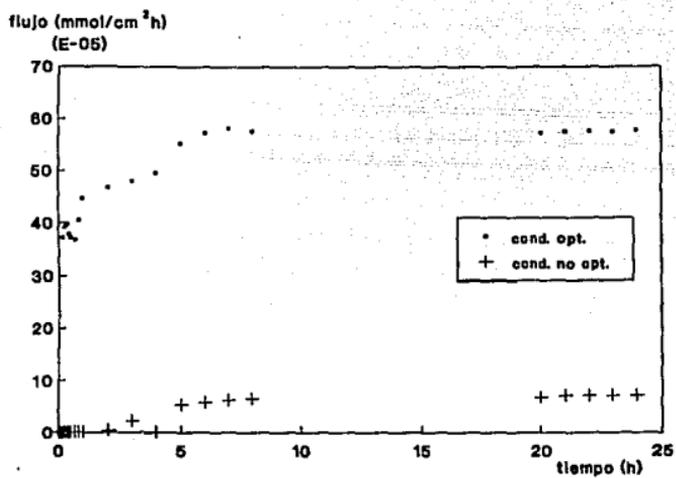


Fig. 10. Gráfico de flujo contra tiempo.
(Fosfato Sódico de Hidrocortisona).

En la siguiente tabla se presentan los valores de Kp obtenidos apartir de los experimentos realizados bajo condiciones óptimas y no óptimas.

Tabla 14. Valores de Kp para los experimentos realizados bajo condiciones óptimas y no óptimas.

FARMACO	Kp	
	Cond. ópt.	Cond. no ópt.
Naproxên Sódico	4.210×10^{-4}	1.003×10^{-4}
Fosfato Sódico de Hidrocortisona	5.021×10^{-4}	1.905×10^{-4}

V. DISCUSION

V.1. Sistema Iontoterapéutico.

El sistema iontoterapéutico empleado es una modificación del sistema usado en las investigaciones de García, Cuenca y Garduño (47,50) el cual a su vez es una modificación del sistema iontofo- rético desarrollado por Chien y colaboradores. (1).

V.1.1. Celdas de Difusión.

A las celdas utilizadas por García, Cuenca y Garduño(47,50) se les hizo las siguiente modificación, disminución del volumen de la celda donadora de 28 a 13 ml., con el fin de representar de mejor manera lo que serán las condiciones *in vivo*, esto por un lado y por otro representar la idea futurista de un DAD (Dial a Drug), ya que la aceptación de este sistema dependerá en gran medida del éxito en la miniaturización de los componentes del mismo. (2).

V.1.2. Sistema Electrónico.

En la introducción se ha mencionado como los factores electrónicos afectan la permeación iontoforética. El sistema electrónico fué diseñado de tal manera que permite variar la intensidad de corriente, proporcionando una corriente directa pulsada con frecuencia de 2 KHz. en forma de onda cuadrada, razón encendido apagado 1:1 (18).

V.1.3. Sistema de Electroodos.

Se empleo un sistema de dos electrodos de platino. Inicialmente el electrodo estaba compuesto por alambres de platino, parte del alambre estaba recubierto con vidrio (con el fin de mantener constante el área de exposición), embonado a un tapón de corcho para fijarlo a la celda, dicho tapón presentró el inconveniente de adsorber el fármaco a las condiciones trabajadas (47), por lo cual; se cambió este sistema por uno de puntas esmeriladas, permitiendo mantener fijo el electrodo y así un área de exposición constante.

En estudios preliminares se mostró que los electrodos de platino no precipitan proteínas como los electrodos de Ag/AgCl., aunque se reporta que provocan cambios en el pH, así como la formación de burbujas (11), debido a las reacciones de electrólisis que a menudo acompañan el uso de electrodos metálicos. Esto fué observado con mayor intensidad cuando se manejo una temperatura de 37 grados y/o una intensidad de corriente de 1.0 mA., recordando que la temperatura cataliza las reacciones de electrólisis.

La formación de burbujas en la superficie del electrodo ocasiona una disminución en el área total expuesta del mismo a la solución, y por lo tanto una disminución en la eficiencia del sistema. Para eliminar las burbujas presentes en el sistema se quitaba y ponían los electrodos según fuese necesario. Esta operación era muy rápida por lo que se piensa que no influye en los resultados.

Por otro lado, una alternativa para próximas investigaciones sería disminuir el área de exposición del electrodo lo más posible sin afectar la eficiencia del sistema iontoterapéutico, ya que en experimentos *in vivo* se observó que el umbral del dolor

es una función del área del electrodo. El máximo tolerable de corriente, está directamente involucrado con el área del electrodo en una forma no lineal, un área grande ocasiona una menor tolerancia a la intensidad de corriente. (19). Esta disminución en el área del electrodo es conveniente para la miniaturización del sistema.

V.1.4. Membrana de Permeación (Piel).

Como ya se mencionó en la introducción, para estudios iontoforéticos la piel de ratón sin pelo es un buen modelo de la piel humana (8). Se trabajó con piel de la región media abdominal que es la más delgada y con menor contenido de queratina. (16).

Dado que el área de piel extraída de la región abdominal de un ratón no es muy extensa, fué necesario sacrificar tres ratones (uno para cada sistema), presentándose variaciones individuales que no se pueden controlar. Se recomienda para futuras investigaciones, tratar de eliminar esta variable; ya sea disminuyendo el área de permeación expuesta o utilizando otro modelo animal más grande.

En estudios anteriores (47,50), el Sistema Iontoterapéutico de Permeación Controlada, había sido evaluado por ocho horas, observándose que este sistema ofrece grandes perspectivas para usarse como un nuevo sistema de liberación controlada, dadas las necesidades terapéuticas es importante probar la robustez del sistema a un tiempo mayor, por lo que el tiempo de experimentación para este estudio se aumento de 8 a 24 horas.

No se controló la viabilidad del tejido en este estudio, este puede ser un factor importante en las características de trans-

porte de moléculas permeadas iontoforéticamente.

No se sabe que tanto se deteriora la piel en este lapso de tiempo, aunque analizando las figs. 7 y 10, las variaciones en el flujo no presentan tendencias importantes después de las 8 horas, por lo que desde el punto de vista mecánico la piel sigue actuando como barrera mecánica, aunque biológicamente no se sabe que tanto se afectan los componentes de esta.

Burnette y Ongpipattanakul (24), reportan que el transporte de iones no es directamente dependiente de la viabilidad de la piel, a menos que una fracción importante de iones sean transportados a través de caminos viables como las glándulas sudoríparas.

Se recomienda para investigaciones posteriores realizar estudios de microscopía electrónica o algún estudio de viabilidad para evaluar el deterioro del tejido.

V.2. Comportamiento del Sistema Iontoterapéutico.

Todos los experimentos realizados, tanto los del arreglo ortogonal como los de la optimización fig. 6 y 9, siguen una tendencia lineal con respecto al tiempo. Presentando una r^2 mayor a 0.98 y 0.99 respectivamente. Este comportamiento ya ha sido reportado anteriormente. (3,11,47,50).

En la permeación iontoforética de fármacos a través de la piel, no solo se ve involucrada la influencia directa del voltaje aplicado sobre el flujo de solutos cargados a través del gradiente de potencial electroquímico, ya que este flujo también puede ser afectado por efectos secundarios como el flujo

electrosmótico y un aumento en la permeabilidad de la piel. (9,10), los cuales se ven influenciados por diversos factores: intensidad de corriente, concentración, pH, etc. (1,2,11,12,13,14 44,50).

Ahora bien, la difusión pasiva también contribuye al transporte iontoforético de moléculas aunque no de manera significativa. Esto se observa al comparar las figs. 7 y 10, correspondientes a intensidad de corriente de 1.0 y 0.0 mA. Lo anterior ya ha sido mencionado en varias investigaciones. (7,24).

Con respecto al flujo, el estado estacionario se puede alcanzar durante las 3 primeras horas fig.7 y 10, al aplicar una intensidad de corriente de 1.0 mA.; mientras que cuando la intensidad de corriente es de 0.0 mA, este se alcanza entre las 5 y 6 horas. El flujo se mantiene casi constante hasta el término de la experimentación para los dos casos. Esto concuerda con lo reportado por Glikfeld. (46).

Diversos autores han reportado que el tiempo de latencia ($t_{1/2}$) se ve disminuido por la aplicación de corriente eléctrica (12,39, 42, 45, 51), esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo, observándose que el $t_{1/2}$ se ve disminuido para los dos fármacos de 3 horas a 1 hora aproximadamente.

La disminución del $t_{1/2}$ se debe probablemente a que se alcanza en menor tiempo el nivel energético necesario para que se lleve a cabo el proceso.

V.3. Optimización.

En la tabla 4, se observa la diferencia de los valores de la constante de permeación (K_p) para los ocho experimentos del arreglo ortogonal, donde se aprecia la influencia de las condiciones experimentales elegidas para cada variable involucrada en la experimentación. Esto hace pensar que controlando los niveles de las variables involucradas se puede manejar la magnitud de la K_p y por consiguiente la velocidad de permeación, de acuerdo a los fines terapéuticos buscados.

Bellantone y col. (55) afirman que las velocidades de transporte pueden ser optimizadas ajustando la composición iónica y la densidad de corriente en un modelo adecuado.

Al optimizar un sistema no siempre se eligen las condiciones que dan una respuesta mayor, la elección de dichas condiciones dependerá del objetivo que se persigue.

En el caso particular, la optimización del Sistema Iontoterapéutico de Permeación Controlada se basó en el valor de la K_p , seleccionando como mejores condiciones las que contribuyen a una K_p mayor.

El ANOVA correspondiente al Arreglo Ortogonal, permitió seleccionar los mejores niveles de las variables involucradas. tablas 5 y 6, el juego de estas condiciones se conoce como -Campeón de Papel-, bajo el cual se debe dar el mejor valor del parámetro de respuesta (K_p), según el objetivo inicial.

Para evaluar si los niveles dictados por el ANOVA corresponden a las expectativas esperadas se realizaron dos corridas

experimentales, una bajo condiciones óptimas y otra bajo condiciones no óptimas. tabla 7.

Según el ANOVA tabla 5, la diferencia entre los niveles para la variable tipo de fármaco (NS y FSH) es mínima por lo que se decidió realizar la optimización para cada fármaco.

Los resultados de Kp obtenidos de los dos experimentos para cada fármaco se observan en la tabla 14. La Kp en condiciones óptimas con respecto a la Kp en condiciones no óptimas (Kp óptima entre Kp no óptima) para Naproxén Sódico es 4.2 veces mayor; mientras que para el Fosfato Sódico de Hidrocortisona es 2.6 veces mayor. Esto no concuerda con lo esperado para la relación $Kp_{op}/Kp_{no\ op}$ ya que se esperaba que el valor de esta relación fuera similar para los dos fármacos, lo que indica que si bien la variable tipo de fármaco es la que menos contribuye según el ANOVA (tabla 6) no por esto es despreciable, e influye en los resultados.

En la optimización, la variable tipo de fármaco se podría considerar como un factor ruido, ya que el incremento de la Kp para cada fármaco (Kp óptima menos Kp no óptima) es muy similar (aproximadamente 3.2), por lo cual se puede decir que el sistema es robusto durante las 24 horas de experimentación.

Sin embargo los datos obtenidos del A.O (tabla 4) se observa que las Kp 's obtenidas para los experimentos 4 y 7 son mayores que las Kp's obtenidas para las condiciones óptimas. Esto puede deberse a: 1) Errores no controlables durante la experimentación y 2) posibles interacciones que debido al A.O no se pudieron evaluar.

Se determinó la Kp teórica óptima (Anexo 1). De la relación Kp teórica/Kp experimental se observó que la Kp teórica es 1.6671 y 1.3978 veces mayor para el Naproxén Sódico y el Fosfato Sódico de Hidrocortisona respectivamente.

Esta diferencia podría deberse a: a) Los dos errores anteriormente mencionados y b) La Kp teórica no considera la capacidad reservoria de la piel.

V.4. Efecto de las variables sobre la Kp.

El ANOVA permite analizar cada variable por separado:

V.4.1. Intensidad de Corriente.

Como ya se mencionó en la introducción, que en ciertas sustancias ionizables al aplicar un campo eléctrico se aumenta su permeabilidad (2,5).

La cantidad de fármaco liberada por iontoforesis depende más de factores eléctricos que del gradiente de concentración, la velocidad de movimiento de iones transferidos es directamente proporcional al voltaje aplicado. La cantidad de iones transferidos es afectada por el flujo de corriente y por su duración (2,18). Esto se puede apreciar en las figs.5 y 8.

En la tabla 6. se puede ver que la intensidad de corriente es la segunda variable que más contribuye al valor de Kp con un 23.04%.

V.4.2. Temperatura.

En la tabla 6. se observa que la temperatura es la variable que más contribuye al valor de K_p con un 55.4%, esto puede explicarse por el cambio en la configuración de los lípidos en la piel.

En sistemas *in vivo* un cambio brusco de temperatura no afecta la configuración de los lípidos fácilmente. Pero cuando el tejido es separado del organismo se han observado cambios de configuración de los lípidos debido a la temperatura (54).

En la tabla 14. se observa que la mayor K_p es a 37°C (Condiciones óptimas), la configuración de los lípidos de la membrana a esta temperatura es una mezcla: bicapa, hexagonal y micelas (54), lo que ocasiona la formación de caminos para el paso del fármaco. Mientras que la K_p menor corresponde a la temperatura de 25°C (Condiciones no óptimas), donde la configuración es en forma de bicapa, presentando mayor oposición de la membrana a la permeación del fármaco.

V.4.3. Estrato Corneo.

Como ya se dijo, el estrato corneo representa la mayor barrera de permeación transdérmica, además de que las propiedades eléctricas de la piel están dominadas por este.

En la tabla 6. se ve que el estrato corneo juega un papel importante en la permeación iontoforética. En el experimento con K_p mayor (Condiciones óptimas) el estrato corneo es eliminado, aunque cabe mencionar que el método empleado para retirarlo tiene baja reproducibilidad ya que no se controla la cantidad de

estrato corneo eliminado al adherir y quitar la cinta adhesiva.

Por lo que se recomienda para futuras investigaciones emplear un método más confiable y reproducible para eliminar el estrato corneo.

Se sabe que al aplicar corriente directa pulsada, con una adecuada frecuencia, forma de onda, razón *on/off*, se reducen las limitaciones impuestas por la piel (polarización e impedancia). (1,18).

El estrato corneo contribuye en gran medida a la capacidad reservoria de la piel (20,21), por lo tanto, el hecho de eliminar el estrato corneo influirá en la disminución del $t_{1/2}$.

V.4.4. Solución Receptora.

El efecto de la solución receptora se explica en función de la fuerza iónica, la cual está dada por la concentración y número de cargas de las especies presentes en solución. El aumento de la fuerza iónica al aumentar la concentración de iones extraños puede resultar en una mayor competición por la corriente eléctrica (2). Esto sería para fármacos muy disociables.

García (47) estudió la importancia de la concentración de la solución receptora, reportando que para el caso de fármacos poco disociados al aumentar la fuerza iónica, los iones adicionados ayudan al paso de las moléculas del fármaco aumentando la constante de permeación, así mismo; se observa una interacción intensidad de corriente/solución receptora, dando como resultado una desviación positiva debida principalmente a la contribución de la solución receptora.

En el presente estudio, la concentración de la solución receptora (KCl ó K₂SO₄) fué equivalente a la concentración de sales a nivel fisiológico (isotónica), a esta concentración, no hay alteración de las condiciones normales de la piel, comportándose como una membrana biológica normal (poco permeable a iones). La variable solución receptora solo contribuye con un 1.67% al valor de la Kp.

V.4.5. pH.

Inicialmente se había pensado trabajar a dos niveles de pH, uno cercano al punto isoeléctrico de la piel (3-4), y otro al pH fisiológico, pero debido a problemas de solubilidad de los fármacos, en especial el Naproxén Sódico, se trabajo a pH de 8,9.

El pH contribuye al valor de la Kp con un 8.99% (tabla 6), siendo la Kp mayor, en condiciones óptimas a pH = 9 tabla 14.

El pH puede afectar ocasionando cambios en las propiedades de la piel, a un pH fisiológico, la piel tiene carga negativa lo que favorecería la permeación de iones positivos y no de negativos. En este caso se trabajó con dos fármacos que al ionizarse adquieren carga negativa, por lo que el efecto anterior no se ve favorecido. Si se trabajara a un pH menor al punto isoeléctrico de la piel, ésta se cargaría positivamente y favorecería el transporte de iones negativos, pero esto no representaría condiciones *in vivo*.

Sería importante para futuras investigaciones trabajar con dos fármacos que tengan carga diferente, uno positiva y otro negativa para evaluar el efecto mencionado anteriormente.

V.4.6. Concentración.

Varios autores (2,9,14,42,52) mostraron que la variación de la concentración de fármaco era proporcional al flujo permeado al aplicar corriente eléctrica. Warley (12), observó que el flujo aumenta linealmente al aumentar la concentración de verapamil en un rango de 1-50 mg/ml.

El efecto de la concentración sobre el valor de la K_p no se aprecia mayormente debido a que su contribución (0.87%), es mucho menor al de las demás variables. Esto también fué observado en la investigación realizada por Cuenca y Garduño (50).

VI. CONCLUSIONES.

- 1.-Se redujo de tamaño la fuente de poder y la celda donadora del Sistema Iontoterapéutico de Permeación Controlada, permitiendo un mejor manejo del mismo.
- 2.-Por medio del Diseño Paramétrico de Taguchi se evaluó por separado la contribución de cada variable sobre la respuesta (constante de permeación), siendo los porcentajes de contribución los siguientes: Temperatura (55.4%), Intensidad de Corriente (23.04%), Estrato Corneo (9.8%), pH (8.99%), Solución receptora (1.67%), Concentración (0.87%).
- 3.-Controlando los niveles de las variables involucradas se puede manipular la magnitud de la Constante de Permeación (K_p) y por consiguiente la velocidad de permeación, de acuerdo a los fines terapéuticos requeridos.
- 4.-Durante las 24 horas de experimentación el sistema se comportó de forma consistente, por lo que podría ser usado como un Sistema de Permeación Controlada confiable.

ANEXO 1

Las condiciones de optimización son determinadas a partir de la figura 4.

Asumiendo que $I.C_2$, T_2 , $E.C_2$, $S.R_1$, pH_2 y C_2 son seleccionados como los niveles correctos, dado que lo que se quiere es maximizar. en las condiciones óptimas es estimada usando la siguiente

ecuación:

$$\mu = \hat{\mu} + \sqrt{F(1,1) \times V_e \times n_e^{-1}}$$

Donde:

es la estimación promedio del proceso cuando $I.C_2$, T_2 , $E.C_2$, $S.R_1$, pH_2 y C_2 son seleccionadas como condiciones óptimas.

$$\hat{\mu} = \overline{I.C_2} + \overline{T_2} + \overline{E.C_2} + \overline{S.R_1} + \overline{pH_2} + \overline{C_2} - \overline{T_{total}}$$

$$n_e = \frac{\text{Total de experimentos}}{\text{Total de g.l de los efectos factoriales (incluyendo la media general)}}$$

V_e = Varianza del error poolado.

$$\mu = 5.9696E-04 + \sqrt{161 \times 7.813E-11 \times 1.1428^{-1}}$$

$$\mu = 7.0187E-04$$

REFERENCIAS

- 1.-Chien, Siddiqui, Lelawongs. DIRECT CURRENT IONTOPHORETIC TRANSDERMAL DELIVERY OF POLIPEPTIDE AND PROTEIN DRUGS. *Journal of Pharmaceutical Science*. vol. 78, No. 5 Mayo 1989. págs. 376-383.
- 2.-Banga and Chien. IONTOPHORETIC DELIVERY OF DRUGS: FUNDAMENTALS, AND BIOMEDICAL APPLICATIONS. *Journal of Controlled Release*. vol. 7, 1988. págs. 1-24.
- 3.-Hsing and Allen. IN VITRO IONTOPHORETIC STUDIES USING A SYNTHETIC MEMBRANE. *Journal of Pharmaceutical Science*. vol. 78 No.3 march 1989. págs. 211-213.
- 4.-Green et al. IONTOPHORETIC DELIVERY OF A SERIES OF TRIPEPTI-TRIPEPTIDES ACROSS THE SKIN IN VITRO. *Pharmaceutical Research*. vol. 8 No.9 1991. págs. 1121-1127.
- 5.-Siddiqui, Roberts and Polack. IONTOPHORETIC TRANSPORT OF WEAK ELECTROLYTES THROUGH THE EXCISED HUMAN STRATUM CORNEUM. *Journal Pharm. Pharmacol.* vol. 41. 1989. págs. 430-432.
- 6.-Chien and Banga. IONTOPHORETIC (TRANSDERMAL) DELIVERY OF DRUGS: OVERVIEW OF HISTORICAL DEVELOPMENT. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol.78. No.5 may 1989. págs.353-354.
- 7.-Bannon, Corish and Corrigan. IONTOPHORETIC TRANSPORT MODEL COMPOUNDS FROM A GEL MATRIX ACROSS A CELOPHANE MEMBRANE. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 13(14) 1987. pág. 2617
- 8.-Behl et al. IONTOPHORETIC DRUG DELIVERY: EFFECTS OF PHYSICO-CHEMICAL FACTORS ON THE SKIN UPTAKE OF NONPEPTIDE DRUGS. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 78. No. 5 1989. págs. 355-360.
- 9.-Srinivasan, Higuchi and Su. BASELINE STUDIES WITH THE FOUR-ELECTRODE SYSTEM: THE EFFECT OF SKIN PERMEABILITY INCREASE AND WATER TRANSPORT ON THE FLUX OF A MODEL UNCHARGED SOLUTE DURING IONTOPHORESIS. *Journal of Controlled Release*. 10 (1989). págs. 157-165.

- 10.-Endoh, Katayam, Karemi and Koizumi. FACTORS AFFECTING SULFISOXAZOLE TRANSPORT THROUGH EXCISED RAT SKIN DURING IONTOPHORESIS. *Chem. Pharm. Bull.* 37(7). 1989. págs. 1870,73.
- 11.-Lelawongs, Chen Liu, Siddiqui and Chien TRANSDERMAL IONTOPHORETIC DELIVERY OF ARGININE-VASOPRESSIM (I) PHYSICO CHEMICAL CONSIDERATIONS. *International Journal of Pharmaceutics*. 56. 1989. págs. 13-22.
- 12.-Wearley, Chen Liu and Chien. IONTOPHORESIS-FACILITATED TRANS DERMAL DELIVERY OF VERAPAMIL. I IN VITRO EVALUATION AND MECHANISTIC STUDIES. *Journal of Controlled Release*. 8, 1989, págs. 237-250.
- 13.-Srinivasan, Higuchi, Sims, Ghanem and Behl. TRANSDERMAL IONTOPHORETIC DRUG DELIVERY: MECHANISTIC ANALYSIS AND APPLICATION TO POLYPEPTIDE DELIVERY. *Journal of Pharmaceutical Sciences* vol.78. No.5, may 1989. págs. 370-375.
- 14.-Del Terzo, Behl and Nash. IONTOPHORETIC TRANSPORT OF A HOMOLOGOUS SERIES OF IONIZED AND NONIONIZED MODEL COMPOUNDS: INFLUENCE OF HYDROPHOBICITY AND MECHANISTIC INTERPRETATION. *Pharmaceutical Research*. vol.6. No.1, 1989. págs. 85-90.
- 15.-Miller and Smith. IONTOPHORETIC TRANSPORT OF ACETATE AND CARBOXYLATE IONS THROUGH HAIRLESS MOUSE SKIN. A CATION EXCHANGEMEMBRANE MODEL. *International Journal of Pharmaceutics*. 49. 1989. págs. 15-22.
- 16.-Chien. *Novel Drug Delivery Systems*. vol.14. Ed. Marcel Dekker Inc. págs. 149-153.
- 17.-Elias. STRUCTURE AND FUNCTION OF THE STRATUM CORNEUM PERMEABILITY BARRIER. *Drug Development Research*. 13. 1988. págs. 97-103.
- 18.-Liu, Sun, Siddqui and Chien. BLOOD GLUCOSE CONTROL IN DIABETIC RATS BY TRANSDERMAL IONTOPHORETIC DELIVERY OF INSULINE. *International Journal of Pharmaceutics*. 44. 1988. págs. 197-204.

- 19.-Sanderson, De Riel and Dixon. IONTOPHORETIC DELIVERY OF NONPEPTID DRUGS: FORMULATION OPTIMIZATION FOR MAXIMUM SKIN PERMEABILITY. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol.78. No. 5, may 1989. págs. 361-364.
- 20.-Foreman STRATUM CORNEUM HYDRATION CONSEQUENCIAS FOR SKIN PERMEATION EXPERIMENTS. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. vol. 12. No. 3. 1986. págs. 461-463.
- 21.-Tojo, Chiang and Chien. STRATUM CORNEUM RESERVOIR CAPACITY AFFECTING DYNAMICS OF TRANSDERMAL DRUG DELIVERY. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 19. 1988. págs. 561-571.
- 22.-Rosendal. COMPARISON BETWEEN THE IONTOPHORETIC AND PASSIVE TRANSPORT OF TYROTROPIN RELEASING HORMONE ACROSS NUDE MOUSE SKIN. *Journal of Pharmaceutical Science*. 75. 1986. págs.
- 23.-Stutten, Spier and Schwarz. *Handbuch Der Haut-und Geschlechtskrankheiten*. vol. I 1981. págs.
- 24.-Burnette and Ongpipattanakul. CHARACTERIZATION OF THE PERMELECTIVE PROPERTIES OF EXCISED HUMAN SKIN DURING IONTOPHORESIS *Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 76. No. 10, 1987. págs. 765-772.
- 25.-Helfferich. *Ion Exchange*. McGraw-Hill. 1962.
- 26.-Praissman, Miller and Berkowitz. ION-MEDIATED WATER FLOW I ELECTROOSMOSIS. *J Membrane Biol*. 11:139, 1973. págs.
- 27.-Wearley and Chien. ENHANCEMENT OF THE IN VITRO SKIN PERMEABILITY OF AZIDOTHYIMIDINE (AZT) VIA IONTOPHORESIS AND CHEMICAL ENHANCER. *Pharmaceutical Research*. vol.7 No. 1, 1990. págs.
- 28.-Pikal. TRANSPORT MECHNISMS IN IONTOPHORESIS. I. A THEORETICAL MODEL FOR THE EFFECT OF ELECTROSMOTIC FLOW ON FLUX ENHANCEMENT IN TRANSDERMAL IONTOPHORESIS. *Pharmaceutic Research*. vol. 7 No. 2, 1990. págs. 118-126.
- 29.-Pikal and Shah. TRANSPORT MECHANISMS IN IONTOPHORESIS. II. ELECTROSMOTIC FLOW AND TRANSFERENCE NUMBER. MEASUREMENTS FOR HAIRLESS MOUSE SKIN. *Pharmaceutical Research*. vol.7 No.3 1990 págs. 213-221.

- 30.-Pikal and Shah. 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. *Pharmaceutical Research*. vol.7 No.3 1990. págs. 222-229.
- 31.-Green et al. IONTOPHORETIC DELIVERY OF AMINO ACIDS AND AMINO ACID DERIVATIVES ACROSS THE SKIN *IN VITRO*. *Pharmaceutical Research*. vol.8. No.9, 1991. págs. 1113-1120.
- 32.-Srinivasan and Higuchi. A MODEL FOR IONTOPHORESIS INCORPORATING THE EFFECT OF CONVECTIVE SOLVENT FLOW. *International Journal of Pharmaceutics*. 60. 1990. págs. 133-138.
- 33.-Sims, Higuchi and Srinivasan. SKIN ALTERATION AND CONVECTIVE SOLVENT FLOW EFFECTS DURING IONTOPHORESIS: I. NEUTRAL SOLUTE TRANSPORT ACROSS HUMAN SKIN. *International Journal of Pharmaceutics*. 69. 1991. págs. 109-121.
- 34.-Diamond and Wright. BIOLOGICAL MEMBRANES: THE PHYSICAL BASIS OF ION AND NONELECTROLYTE SELECTIVITY. *Ann. Rev. Physiol.* 31:581, 1969. págs.
- 35.-Phipps and Lattin. IONTOPHORETIC DELIVERY OF MODEL INORGANIC AND DRUG IONS. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 78 No.5 may 1989. págs. 365-369.
- 36.-Hadgraft J. and Guy R. TRANSDERMAL DRUG DELIVERY. *Marcel Dekker, Inc.* USA 1989 págs. 247-289.
- 37.-Meel et al. FOLLICLES PLAY AN IMPORTANT ROLE IN PERCUTANEOUS ABSORPTION. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol.80. No.5 may 1991. págs. 424-427.
- 38.-Burnette and Marrero. COMPARISON BETWEEN THE IONTOPHORETIC AND PASSIVE TRANSPORT OF THYROTROPIN RELEASING HORMONE ACROSS NUDE MOUSE SKIN. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 75 1986. págs.
- 39.-Burnette and Ongpipattanakul. CHARACTERIZATION OF THE PORE TRANSPORT PROPERTIES AND TISSUE ALTERATION OF EXCISED HUMAN SKIN DURING IONTOPHORESIS. *Journal of Pharmaceutical Sciences* vol.77. No.2, 1988. págs. 132-137.

- 40.-Walhberg. TRANSEPIDERMAL OR TRANSFOLLICULAR ABSORPTION. *Acta Derm. Venereol. (Stockh)*. 48, 1968. págs.
- 41.-Lambert et al. EFFECTS OF LONG-TERM HYDRATION LEADING TO THE DEVELOPMENT OF POLAR CHANNELS IN HAIRLESS MOUSE STRATUM CORNEUM. págs. 925-928.
- 42.-Kasting, Merritt and Keister. AN IN VITRO METHOD FOR STUDYING THE IONTOPHORETIC ENHANCEMENT OF DRUG TRANSPORT THROUGH SKIN. *Journal of Membrane Science*. 35, 1988. págs. 137-159.
- 43.-Miller, Smith, Chang and Zhou. ELECTROCHEMICALLY CONTROLLED RELEASE. *Journal of Controlled Release*. 6, 1987. págs. 293.
- 44.-Bannon et al. IONTOPHORETICALLY INDUCED TRANSDERMAL DELIVERY OF SALBUTAMOL. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 14 (15-17), 1988. págs. 2151-2165.
- 45.-Slough, Spinelli and Kasting. TRANSDERMAL DELIVERY OF ETIDRONATE (EHDP) IN THE PIG VIA IONTOPHORESIS. *Journal of Membrane Science*. 35, 1988. págs. 161-165.
- 46.-Gukfeld, Hinz and Guy. NONINVASIVE SAMPLING OF BIOLOGICAL FLUIDS BY IONTOPHORESIS. *Pharmaceutical Research*. vol.6 No.11 1989. págs. 988-990.
- 47.-García. Efecto de Algunos Factores Físicoquímicos sobre la Permeación de Clorhidrato de Amilorida, contenido en un Sistema Iontoforético de Liberación. (Tesis de Licenciatura). FES-Cuautitlán (UNAM) 1992.
- 48.-Taguchi. *Quality Engineering. Products and Process Design Optimization*. American Supplier Institute. 1987.
- 49.-The Pharmaceutical Society of Great Britain. *Clarke's Isolation of Drugs*. 2 ed. The Pharmaceutical Press. 1986. págs: 665-667, 799-800.
- 50.-Cuenca y Garduño. *Influencia de Algunas Variables sobre la Velocidad de Permeación de Fosfato Sódico de Hidrocortisona y Naproxén Sódico Contenidos en un Sistema Iontoforético. Uso del Diseño Paramétrico de Taguchi*. (Tesis de Licenciatura). FES-Cuautitlán (UNAM) 1991.

- 51.-Miller et al. TRANSDERMAL IONTOPHORESIS OF GONADOTROPIN RELEASING HORMONE (LHRH) AND TWO ANALOGUES. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol.79. No.6, junio 1990. págs. 490-492.
- 52.-Koizumi et al. TRANSFER OF DICLOFENAC SODIUM ACROSS EXCISED GUINEA PIG SKIN ON HIGH-FREQUENCY PULSE IONTOPHORESIS I EQUIVALENT CIRCUIT. *Chem. Pharm. Bull.* 38(4), 1990. pág. 1019.
- 53.-Koizumi et al. TRANSFER OF DICLOFENAC SODIUM ACROSS EXCISED GUINEA PIG SKIN ON HIGH-FREQUENCY PULSE IONTOPHORESIS II FACTORS AFFECTING STEADY-STATE TRANSPORT RATE. *Chem. Pharm. Bull.* 38(4), 1990. págs. 1022-1023.
- 54.-Cullis, Hope and Hicok. LIPID POLYMORPHISM AND THE ROLES OF LIPIDS IN MEMBRANE. *Chemistry and Physics of Lipids*. 40 (1986).
- 55.-Bellantone et al. ENHANCED PERCUTANEOUS ABSORPTION VIA IONTOPHORESIS. I EVALUATION OF AN *IN VITRO* SYSTEM AND TRANSPORT OF MODEL COMPOUNDS. 30, 63-72 (1986).