



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

5^{2 es}

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

INFLUENCIA DEL TAMAÑO MOLECULAR Y
CONCENTRACION DE PEPTIDOS SOBRE LA
ABSORCION PERCUTANEA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N :
JULIA ANTONIO JARQUIN
DULCE MA. SOTELO REYES

DIRECTORES DE TESIS: O.F.B. ABELARDO CHAVEZ MONTES
O.F.B. ROCIO CASTRO RIOS
O.F.B. SERGIO ARTURO GALINDO RODRIGUEZ

258676

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

1998

TESIS CON
FALLA DE CRIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



UNIVERSIDAD NACIONAL
ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:
Influencia del tamaño molecular y concentración de
péptidos sobre la absorción percutánea.

que presenta la pasante: Julia Antonio Jarquín
con número de cuenta: 9156123-3 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 10 de Noviembre de 1997

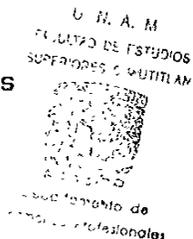
PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u>	
VOCAL	<u>D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Sergio A. Galindo Rodríguez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. José A. Garduño Rosas</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Guadalupe Koizumi Castro</u>	



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Influencia del tamaño molecular y concentración de péptidos sobre la absorción percutánea.

que presenta la pasante: Dulce Ma. Sotelo Reyes
con número de cuenta: 9156120-2 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 10 de Noviembre de 1997

PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u>	
VOCAL	<u>D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Sergio A. Galindo Rodríguez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. José A. Garduño Rosas</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Guadalupe Koizumi Castro</u>	

ENTRE MÁS ESFUERZOS
HAGAS Y MAYORES
CONTRARIEDADES ENFRENTES,
MÁS DELICIOSO
ENCONTRARÁS
EL SABOR
DEL TRIUNFO.

..... CADA COSA QUE VEMOS HOY REALIZADA POR
PASADAS GENERACIONES, FUE, ANTES DE ADQUIRIR SU
APERARIENCIA, ANTES DE APARECER, UN SOLO
PENSAMIENTO EN LA MENTE DE UN HOMBRE O UN SOLO
IMPULSO EN EL CORAZON DE UNA MUJER

... .. CADA BELLEZA Y CADA GRANDEZA DE ESTE
MUNDO ES CREADA POR UNA SOLA EMOCIÓN, O POR UN
SOLO PENSAMIENTO EN EL INTERIOR DEL HOMBRE... ..



DUJY

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y la FES-
CUAUTITLAN por darnos la
oportunidad de una formación
profesional.

A los profesores de la FES- C por
compartir con nosotras sus
conocimientos.

A los profesores integrantes del H.
Jurado, por sus acertadas
contribuciones al mejoramiento de
esta tesis.

A nuestros asesores

Q.F.B. Abelardo Chavéz y Q.F.B.
Rocío Castro :

Por enseñarnos que los
grandes logros no son fáciles.

GRACIAS, MIL.

Q.F.B. Sergio Galindo:

Por
su amistad, sinceridad y
apoyo incondicional.
Gracias por tu adopción.

A la UIICSE en el área
de Productos Naturales
de la ENEP-Iztacalla, por
todo el apoyo brindado
para la realización de
esta tesis.

Al M en C. Guillermo
Avila, por su apoyo y
facilidades prestadas.

Al Q.F.B. Israel
Hernández, por tu
amistad y consejos.

Al Dr. David Quintanar,
por creer en nosotras y
encaminarnos para
cumplir esta importante
meta.

DEDICATORIAS

A DIOS

Gracias, por ser esa gran energía que nos impulsa cada día a ser mejores y que hoy me permite culminar uno de mis anhelos.

A MIS PADRES

EANLY TINO

Por darme la maravillosa oportunidad de formar parte de esta vida, por su amor, comprensión, apoyo, consejos y regaños, ya que sin todo esto no hubiera logrado esta meta.

A MIS HERMANOS

DOMY

Por que siempre estuviste conmigo en los momentos difíciles, ofreciéndome tu apoyo y cariño incondicional.

JOSE LUIS

Por tu cariño y consejos. Que este pequeño logro sea un ejemplo para ti.

MARY FLOR

Gracias por ser como eres, por que eres la chispa de alegría de la casa.

A MI SOBRINO

MANOLITO

Por que eres una pequeña personita que con tus travesuras y sonrisas nos llenas de felicidad.

A mis abuelitos **CHOFITO Y MARGARITA.**
A mi tía **TOMASITA.**

J. LUIS

Gracias, por todo

A MIS GRANDES AMIGOS

Claudia, Lupita, Bety, Ibeth, Araceli, Enrique, Isabel, Lawrence, por su amistad y cariño.

SERA

Gracias a Ti, por ser tan sincero y ofrecermte tu amistad, realmente te estimo de una forma muy especial.

JULY

DEDICATORIAS

A MIS PADRE:

**POR SU AMOR INCONDICIONAL, PORQUE JUNTOS HAN LUCHADO CONMIGO PARA
ALCANZAR MIS METAS Y SOBRE TODO PORQUE "LOS AMO".**

A MIS HERMANOS:

**POR SUS CONSEJOS, POR TODO LO QUE HEMOS PASADO JUNTOS, POR CONFIAR EN MÍ.
"LOS QUIERO MUCHISIMO"**

A MIS SOBRINOS:

**PORQUE CON SU CURIOSIDAD, ME IMPULSARON A BUSCAR RESPUESTAS A SUS
PREGUNTAS.**

"LO QUIEROOOOO"

**A ESE "SER" MARAVILLOSO QUE ME DIO EL PRIVILEGIO DE EXISTIR Y DE CUMPLIR UNO DE
MIS GRANDES SUEÑOS.**

*******ETERNAS GRACIAS *******



D U L C E

A la 18ava Generación por compartir con nosotras una etapa importante de la vida. En especial a: Claudia, Guadalupe, Beatriz, Ibeth, Araceli, Griselda, Leticia, Mireya, Juan Carlos, Nancy, Carlitos, Víctor, Martín, Lawrence, Sergio, Lilia, Miguel, Francisco, Gaby, Julio, Armando.

A los nuestros queridos amigos de biblioteca:
Jorge, Ernesto, Ponciano, José Guadalupe, Ricardo, Ivan, Rafael, José Luis, Julio, Fernando, Alfredo, Enrique, Jorge F., Gabriel, Mario,

A los compañeros y amigos de CONASIDA, por su apoyo moral y amistad, en especial a: Tere, Angélica, Paula, Angeles, Marcia, Carlos, Nelly, Paty, Genobeva, Alejandra, José y Dr. Teran.

Dedicada en memoria de Guillermo
Díaz Sandoval
(Químico 19),

donde quiera que te encuentres
recuerda nuestra apuesta.

DUJY

ÍNDICE

Índice de tablas	I
Índice de figuras	II
Objetivos	III
Introducción	I
I.- GENERALIDADES	
1 1 Péptidos	2
1.1.1 Péptidos naturales	3
1.1.1.1 Péptidos como fármacos	4
1.2 Administración de péptidos	6
1.3 La piel	16
1.4 Absorción percutánea	18
1.5 Características generales de glicina, diglicina y triglicina	21
II.- PARTE EXPERIMENTAL	
2.1 Reactivos	22
2 2 Material biológico	22
2.4 Métodos	
2.4.1 Pretratamiento de la piel	23
2.4.2 Absorción percutánea	23
III.- RESULTADOS	
3 1 Absorción percutánea de glicina	25
3 2 Absorción percutánea de diglicina	26
3.3 Absorción percutánea de triglicina	27
3.4 Parámetros de permeación	28
IV.- ANÁLISIS DE RESULTADOS	31
V.- CONCLUSIONES	35
VI.- APENDICE 1	36
VII.- APENDICE 2	38
VIII.- BIBLIOGRAFIA	43

ÍNDICE DE TABLAS

I - Factores fisicoquímicos y fisiológicos que afectan la absorción de péptidos y proteínas	7
II.- Absorción gastrointestinal de péptidos y proteínas	8
III - Péptidos y proteínas que son utilizadas en oftalmología	12
V - Eficiencia de la absorción de péptidos y proteínas en presencia de grupos que mejoran la absorción	16
V - Características generales de la glicina, diglicina y triglicina	22
VI - Concentraciones y fracciones permeadas a diferentes tiempos para glicina	25
VII - Concentraciones y fracciones permeadas a diferentes tiempos para diglicina	26
VIII - Concentraciones y fracciones permeadas a diferentes tiempos para triglicina	27
IX - Coeficientes de correlación para determinar la cinética de absorción	28
X - Parámetros de permeación para las tres moléculas	29
XI - Porcentaje de moléculas no ionizadas al pH de estudio (4.3)	32
XII.- Análisis de varianza para coeficientes de permeación	34
XIII.- Condiciones óptimas de trabajo para la cuantificación de glicina, diglicina y triglicina	36
XIV.- Validación del método de cuantificación de glicina, diglicina y triglicina	37

ÍNDICE DE FIGURAS

1 - Estructura de la piel y sitios de absorción percutánea	20
2 - Diagrama del sistema de difusión	24
3.- Absorción percutánea de glicina, para concentraciones de 6, 10 y 20 mg/ml	25
4.- Absorción percutánea de diglicina, para concentraciones de 6, 10 y 20 mg/ml	26
5.- Absorción percutánea de triglicina, para concentraciones de 6, 10 y 20 mg/ml	27
6 - Comparación de las cantidades permeadas a las 48 h de glicina, diglicina y triglicina	31
7 - Comparación de velocidades de flujo de glicina, diglicina y triglicina	32
8 - Comparación de los coeficientes de permeación de glicina, diglicina y triglicina	33
9 - Comparación de las constantes de velocidad de permeación (Kp) de glicina, diglicina y triglicina	34
10 -Logaritmo de la velocidad en función de la concentración de glicina a 6 mg/ml	38
11.-Logaritmo de la velocidad en función de la concentración de glicina a 10 mg/ml	38
12 -Logaritmo de la velocidad en función de la concentración de glicina a 20 mg/ml	39
13.-Logaritmo de la velocidad en función de la concentración de diglicina a 6 mg/ml	39
14 -Logaritmo de la velocidad en función de la concentración de diglicina a 10 mg/ml	40
15.-Logaritmo de la velocidad en función de la concentración de diglicina a 20 mg/ml	40
16.-Logaritmo de la velocidad en función de la concentración de triglicina a 6 mg/ml	41
17.-Logaritmo de la velocidad en función de la concentración de triglicina a 10 mg/ml	41
18 -Logaritmo de la velocidad en función de la concentración de triglicina a 20 mg/ml	42

OBJETIVO GENERAL

DETERMINAR LA INFLUENCIA QUE TIENEN EL TAMAÑO MOLECULAR Y LA CONCENTRACIÓN DE GLICINA, DIGLICINA Y TRIGLICINA SOBRE SU ABSORCIÓN PERCUTÁNEA EN PIEL DE RATÓN.

OBJETIVOS PARTICULARES

DETERMINAR LA CINÉTICA DE ABSORCIÓN PERCUTÁNEA DE GLICINA, DIGLICINA Y TRIGLICINA.

DETERMINAR LOS PARÁMETROS DE PERMEACIÓN DE GLICINA, DIGLICINA Y TRIGLICINA.

EVALUAR EL EFECTO DEL PESO MOLECULAR SOBRE LOS PARÁMETROS DE PERMEACIÓN DE GLICINA, DIGLICINA Y TRIGLICINA.

ANALIZAR LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN SOBRE LA PERMEACIÓN PERCUTÁNEA DE GLICINA, DIGLICINA Y TRIGLICINA.

INTRODUCCIÓN

Los péptidos y proteínas han surgido como una importante clase de agentes terapéuticos, sin embargo, al ser administrados por vía oral son degradados en el tracto gastrointestinal, por vía intravenosa es difícil mantener niveles sanguíneos idóneos debido a la rapidez con que se metabolizan³⁸ y por vía hepática (vía intraperitoneal y portal) pueden sufrir una biotransformación sustancial antes de alcanzar la circulación sistémica.

Entre las nuevas alternativas para la administración de péptidos se ha investigado la vía transdérmica, ya que, presenta ventajas como su gran área de exposición, baja actividad de enzimas proteolíticas, evita el metabolismo del primer paso hepático, penetración directa a la circulación venosa periférica y la posibilidad de liberación controlada del fármaco. La velocidad a la que penetran los péptidos y proteínas a través de la piel esta determinada por sus propiedades fisicoquímicas, su coeficiente de partición lípido/ agua, así como por la composición química de la piel, los espacios intercelulares y el espesor de esta¹⁸.

Recientemente, se ha encontrado que la velocidad de permeación de péptidos y proteínas es suficientemente lenta y constante para proporcionar un efecto continuo durante varias semanas o meses¹⁹. No obstante, las dificultades que presenta la absorción percutánea para estas moléculas son debidas a su hidrofobicidad, carácter iónico y peso molecular alto. Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó un estudio de absorción percutánea de glicina, diglicina y triglicina a través de piel de ratón para determinar como influye el tamaño de la molécula y su concentración sobre los parámetros de permeación

I.- GENERALIDADES

1.1 PÉPTIDOS

La hidrólisis de las proteínas produce una mezcla de aproximadamente veinte aminoácidos, estas sustancias poseen en el mismo átomo de carbono un grupo amino y un carboxilo, de aquí que se denominen α -aminoácidos y que deriven de la fórmula general **$NH_2-CHR-COOH$** , salvo dos excepciones la prolina y la hidroxiprolina, que son α -iminoácidos cíclicos.⁵

En su mayor parte las proteínas están formadas por cadenas lineales de aminoácidos unidos covalentemente, cada posición de estas cadenas puede estar ocupada por cualquiera de los veinte aminoácidos.

Todos los aminoácidos aislados de las proteínas son ópticamente activos puesto que su α -carbono es asimétrico (a excepción de la glicina), poseen la misma configuración y pertenecen a la familia L-. Debe hacerse notar que las designaciones L- y D- no se refieren a la dirección de rotación o desviación del plano de luz polarizada, sino a sus configuraciones respecto de las del gliceraldehído. El signo y la magnitud de la rotación óptica de los aminoácidos son, por supuesto, función de la naturaleza de la cadena lateral. Los D- aminoácidos se han encontrado ampliamente distribuidos en los tejidos vivos, siendo especialmente abundantes en las paredes o membranas celulares bacterianas y formando parte de las estructuras de muchos antibióticos, tales como bacitracina, gramicidina y actinomicinas.

Las estructuras iónicas dipolares de los aminoácidos son suficientes para explicarnos muchas de sus propiedades, entre ellas :

- 1) Solubilidad relativamente grande en agua.
- 2) Escasa solubilidad en solventes orgánicos.
- 3) Momentos dipolares grandes.
- 4) Puntos de fusión elevados

Esta última propiedad se debe a una atracción electrostática significativa entre grupos de la red cristalina cargados distintamente.

Todos los aminoácidos presentan una serie de reacciones comunes, que se deben al grupo amino, carboxilo o ambas como son: formación de ésteres y amidas, alquilación y acilación.

Un rasgo estructural importante de cualquier polímero es la naturaleza de los enlaces que unen sus unidades monoméricas, las proteínas se unen mediante la formación de enlaces amida secundarios entre las funciones α -carboxilo y α -amino de los aminoácidos adyacentes. Estas uniones se conocen como enlaces peptídicos. Las estructuras resultantes de la formación de los enlaces peptídicos reciben el nombre de péptidos y los aminoácidos individuales se denominan, restos o residuos. Un péptido que contenga dos aminoácidos constituirá un dipéptido, el que contenga tres será un tripéptido, y así, sucesivamente. El término polipéptido designa a cualquier péptido compuesto de tres o más unidades de aminoácidos monoméricos. Los polipéptidos con más de 50 aminoácidos se conocen como proteínas.

Generalmente, los péptidos se escriben con el grupo amino terminal a la izquierda, el carboxilo terminal a la derecha y se denominan derivados acilo o acílicos del aminoácido C-terminal.⁷

1.1.1 PÉPTIDOS NATURALES

Casi todos los tejidos vivos contienen cantidades apreciables de péptidos de bajo peso molecular. Por ejemplo, el glutatión que se encuentra en la mayor parte de los tejidos animales y vegetales, mientras que, la carnucina (β -alanil-L-histidina) y la anserina (β -alanil-1-metil-L-histidina) están presentes en la musculatura de los vertebrados. Sin embargo, los péptidos de mayor interés son los que poseen alguna actividad fisiológica o antibacteriana conocida. Entre los péptidos cíclicos que actúan como agentes antibacterianos tenemos a la tirocidina, gramicidina y la bacitracina que son aislados a partir del bacillus brevis y del bacillus licheniformis¹⁷

Existen varias hormonas péptidicas, por ejemplo, la oxitocina, vasopresina, α -melanocito, β -melanocito y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH)

Uno de los grupos péptidicos biológicamente activos y de mayor importancia presentes en el plasma son la angiotensina (octapéptido), bradisinina (nonapéptido) y calidina (decapéptido).⁷

1.1.1.1 PÉPTIDOS COMO FÁRMACOS

La evolución de la tecnología del DNA recombinante y la aparición de proteínas y péptidos bioactivos han abierto una nueva era en la Medicina, así como, en las Ciencias Farmacéuticas. Por ejemplo, existen proteínas que estimulan el sistema inmune, siendo de utilidad en el tratamiento de cáncer, anemias y desórdenes hormonales.

Actualmente, los péptidos y proteínas pueden ser sintetizados formando parte de productos farmacéuticos básicos. Sin embargo, estos productos biotecnológicos difieren de los fármacos convencionales por tener algunas restricciones al ser administrados por vía oral, principalmente porque sufren degradación y biotransformación.

Recientemente, se ha incrementado el interés por la liberación de proteínas y péptidos bioactivos. El éxito en el diseño de sistemas de liberación para estos compuestos depende de la comprensión de sus características fisicoquímicas y biológicas, las cuales, incluyen su peso molecular, inmunogenicidad, estabilidad conformacional, vida media biológica, mecanismos de degradación y su farmacocinética Vs farmacodinamia.^{1,12,13}

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS DETERMINANTES PARA LA SELECCIÓN DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN.

PESO MOLECULAR

Los péptidos y proteínas tienen un peso molecular entre 600 y 100000 Daltons en su estado no agregado. Generalmente, entre más grande sea la molécula menor es la penetración a través de la membrana biológica (gastrointestinal, epitelio ocular y el estrato córneo). Estas membranas son consideradas barreras impermeables en la penetración de péptidos y proteínas. El peso molecular es un factor importante con respecto a la difusión a través de

membranas poliméricas que se usan en la fabricación de sistemas de liberación de proteínas y péptidos .

INMUNOGENICIDAD

Los péptidos y proteínas son más inmunogénicos que los xenobióticos convencionales, por lo tanto, pueden provocar una respuesta alérgica, especialmente cuando los fármacos son usados por largos períodos. Algunos de los factores que pueden contribuir a la inmunogenicidad por alteraciones de la estructura primaria o secundaria de péptidos y proteínas son : derivación del DNA recombinante incluyendo agregación, desnaturalización, presencia de una metionina N-terminal incorrecta, falta de glicosilación o sustitución de aminoácidos.

ESTABILIDAD CONFORMACIONAL

Los péptidos pequeños adoptan diferentes conformaciones en solución acuosa que involucran fuerzas intra e intermoleculares. Estos cambios en la conformación pueden afectar su actividad farmacológica

VIDA MEDIA

En general la vida media de péptidos y proteínas es relativamente corta, siendo del orden de segundos o minutos, ello se debe a su rápida degradación por peptidasas y proteasas en el hígado, sangre, riñón o en el sitio de administración. La degradación de péptidos y proteínas en el hígado puede darse por células parenquimales y no parenquimales, mientras que, otros son susceptibles a la degradación en el sitio de administración. Por ejemplo, una cantidad de insulina (20%) administrada subcutáneamente, es degradada en el sitio de inyección en 15 min, teniendo una vida media de 60 min, aproximadamente Sin embargo, cuando la insulina es administrada con un inhibidor sintético de peptidasas (BOC-GLY-PRO-LEU-GLY) resulta ser 15 min más estable, debido a que, se reduce la susceptibilidad a la hidrólisis.

MECANISMO DE ACCIÓN

Aún no se precisa el mecanismo de acción, ni las células blanco que son fundamentales en el desarrollo de sistemas de liberación, debido a que las proteínas y los péptidos actúan por diferentes mecanismos.

FARMACOCINÉTICA Vs FARMACODINAMIA

La relación entre la farmacocinética (concentración del fármaco y metabolitos en función del tiempo) y farmacodinamia (efectos farmacológicos del fármaco en función del tiempo) son muy importantes para designar los sistemas de liberación. Para moléculas pequeñas, la cuantificación en plasma de la concentración del fármaco y los efectos farmacológicos tienen muy buena correlación. Sin embargo, esto no es tan real para proteínas y péptidos, por la limitación que tienen los métodos analíticos para la detección y cuantificación de bajas concentraciones *in vivo* y por la dificultad en el ensayo de su actividad biológica.

Cuando los péptidos y proteínas se administran en dosis terapéuticas los niveles fisiológicos normales se incrementan en el sistema circulatorio y en otros órganos diferentes al sitio blanco, dando como resultado, una mala correlación entre las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas.^{14,15}

1.2 ADMINISTRACIÓN DE PÉPTIDOS

Muchos péptidos y proteínas son usados por su actividad farmacológica. Las vías de administración más usadas son:

a).-Vía oral

Si bien muchas vías de administración son viables para la liberación de agentes terapéuticos, la más popular es la vía oral. Comparada con vías alternas, es la preferida y la más usada para la liberación de fármacos convencionales por la aceptación del paciente y facilidad en la formulación de la dosis. Además, la mucosa intestinal es un buen medio de absorción, en contraste con vías no convencionales como la ocular y la nasal. Sin

embargo, la vía oral no es factible para la liberación de péptidos y proteínas por dos razones :

- 1) Por la inestabilidad de estas moléculas debido a su degradación y metabolismo en el tracto gastrointestinal.
- 2) La baja permeabilidad de la mucosa intestinal para moléculas de peso molecular alto.

Generalmente, las proteínas y péptidos son compuestos hidrofílicos, por lo tanto, tienen una pobre permeación a través de la membrana biológica.

Los factores fisicoquímicos y fisiológicos que afectan la absorción de péptidos y proteínas se presentan en la Tabla I. La biodisponibilidad por vía oral de péptidos y proteínas es menor del 10 %, a excepción del ciclosporin, hormona de liberación de tirotrópina y leupeptina. El porcentaje de absorción gastrointestinal de algunos péptidos son enlistados en la Tabla II

Tabla I. FACTORES FISICOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS QUE AFECTAN LA ABSORCIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS ^{12,16}

FACTORES FISICOQUÍMICOS	FACTORES FISIOLÓGICOS
<p>Forma y tamaño de molécula</p> <p>Coefficiente de partición</p> <p>Estabilidad en pH acuoso</p> <p>Cargas electrostáticas</p>	<p>pH</p> <p>Enzimas digestivas</p> <p>Naturaleza de la barrera mucosal</p> <p>Permeabilidad intestinal y enlace mediante transportadores</p> <p>Metabolismo hepático y en el lumen</p> <p>Factores dietéticos</p>

Tabla II. ABSORCIÓN GASTROINTESTINAL DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS.^{16,17}

PORCIENTO ABSORBIDO	PÉPTIDO / PROTEÍNA	PESO MOLECULAR
> 50 (alto)	Aminocefalosporina	350
	Enalapril	377
	Talampicilina	482
25 - 50 (moderado)	Alafosfalin	196
	Dietary di - y tripeptidos	200-300
	Ampicilina	349
	Lysinopril	405
	Ciclosporin	1203
< 2 (muy bajo)	Tetragastrin	483
	Pepstatinil glicina	740
	Ciclo(pro-(Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe)	806
	1-Deamino-8-D-Arg vasopresina	1007
	Leuprolide	1208
	Empedopeptina	1250
	Insulina	5700
	Horseradish peroxidasa	40000
	Suero albúmina bovina	> 50000

El descubrimiento de la actividad terapéutica de proteínas y péptidos provocó el desarrollo de sistemas de liberación controlada orales para estas moléculas, por ejemplo, el recubrimiento de la proteína con un polímero y un grupo azoaromático (que da protección contra la degradación de ácidos y enzimas), sistemas complejos de emulsión y la incorporación de inhibidores y / o promotores de la absorción.¹⁷

b) Vía parenteral

La administración parenteral (inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular) es preferible a la vía oral por dar mejores perfiles terapéuticos para la mayoría de los xenobióticos; casi todos los péptidos y proteínas bioactivos están disponibles como preparaciones parenterales, encontrándose en soluciones acuosas y suspensiones. Sin embargo, cuando las proteínas y péptidos son administrados parenteralmente se tiene una vida media biológica corta, por lo que, se requieren inyecciones repetidas, lo cual es indeseable en casos de administración continua. Estos componentes son altamente potentes y son usados en soluciones diluidas lo que ocasiona problemas en la cuantificación, valoración de la estabilidad y otros atributos de la formulación.

La esterilización de soluciones de proteínas representa otro problema, por no ser estables a temperatura de autoclave. El uso de irradiación gamma es inaceptable por razones de estabilidad, mientras que, el calor seco y óxido de etileno no son los adecuados para formulaciones líquidas. La filtración bacteriana es el mejor método de esterilización, pero puede provocar desnaturalización de las proteínas.

Los sistemas de liberación parenteral son de dos tipos:

1. Sistemas acarreadores solubles

- Modificaciones químicas del fármaco.
- Fármacos conjugados.
- Proteínas híbridas.

Los complejos de proteínas y péptidos con varios polímeros y lípidos han tenido un exitoso incremento en la estabilidad del fármaco y en la especificidad sobre el sitio de acción, por lo que, mantienen la actividad biológica.^{16,17}

2. Sistemas acarreadores de partícula

- Liposomas.
- Microesferas.
- Nanopartículas.

- Emulsiones.
- Eritrocitos.
- Virus.

Los péptidos y proteínas pueden ser introducidos a eritrocitos por un proceso de intercambio hipotónico. Los eritrocitos son puestos en una solución hipotónica que provoca que la membrana sea permeable, los péptidos y proteínas son adicionados y la membrana es reestabilizada. Los eritrocitos son tomados por el sistema retículo endotelial y finalmente llegan a los lisosomas hepáticos. Este sistema es útil para reemplazar enzimas en desordenes metabólicos genéticos. Una limitación a la aplicación de eritrocitos es que solo pueden ser usados para fármacos no susceptibles a la desnaturalización irreversible bajo condiciones hipotónicas.

La preparación de microcápsulas, nanopartículas, liposomas y microemulsiones, generalmente involucran condiciones severas que pueden desnaturalizar las proteínas y los péptidos. Esto se da por el contacto con solventes orgánicos, temperaturas de hasta 120 °C, adición de agentes químicos (glutaraldehídos y formaldehídos), condiciones adversas de pH, adición de surfactantes y la aplicación de γ -radiación.¹⁶

c) Vía nasal

Anatómicamente, el par de cavidades nasales están separadas por el séptico nasal, siendo el volumen total de las cavidades de 15 ml. El epitelio de las cavidades nasales está recubierto por abundantes microbellos, lo cual provee una gran superficie de absorción. La mucosa nasal es aproximadamente de 3 mm de espesor y ofrece una área superficial total de 150 a 200 cm², además de ser rica en redes vascular y linfática. La sangre venosa pasa directamente al sistema circulatorio, previniendo la pérdida del fármaco por el metabolismo de primer paso.¹⁶

La liberación intranasal que tienen los péptidos y proteínas en gran parte depende del tamaño de la molécula, los péptidos de tamaño molecular grande son más difíciles de absorber. Por ejemplo, el Metkephamid® (un pentapéptido) tiene una biodisponibilidad del 100%, mientras que, la insulina (51 residuos de a.a.) es del 1%.¹²

La absorción se mejora si se usan bioadhesivos en los sistemas de liberación nasal, lo cual, mantiene al fármaco en contacto con la superficie mucosal por tiempos prolongados. El ácido poliácrico (Carbopol®) y ácido poliácrico-polietilenglicol son algunos de los materiales usados para la bioadhesión.¹⁶

Algunas variaciones en la biodisponibilidad se observan con dos péptidos similares, la calcitonina y el glucagón. La calcitonina (32 a.a) es absorbida bien con promotores de permeación, mientras que, el glucagón (29 a.a) requiere una cantidad mayor de ellos para su absorción. Asimismo, la hormona estimulante de corticotropina (CRH) también muestra un 100% de biodisponibilidad en presencia de tioglicolato de sodio y sales biliares, sin embargo, para la hormona estimulante del crecimiento (GHRH) solo es del 7.1 % en las mismas condiciones. Generalmente, la vía intranasal es considerada apropiada para la liberación de péptidos y proteínas que son altamente potentes y tienen bajo peso molecular.¹⁶

d) Vía ocular

Aproximadamente, el 3 % de la aplicación tópica de fármacos es en los ojos, usando formas de dosificación en solución, suspensión y ungüento. Actualmente, se sabe que la córnea es permeable y esta irrigada por el sistema circulatorio. La pobre disponibilidad de fármacos por vía ocular se debe en parte a los mecanismos de protección fisiológicos, tales como el drenaje lagrimal, dilución de la lágrima, volumen de lágrimas y enlace a proteínas. Además, se requieren fármacos de solubilidad bifásica.

La vía ocular es efectiva para liberar péptidos y proteínas en el tratamiento local de patologías que afectan el tejido del segmento anterior de los ojos. Ejemplos de péptidos y proteínas que son usados en oftalmología se basan en la fisiología y patología ocular, estos se enlistan en la Tabla III.

Algunos de estos fármacos han surgido como nuevos agentes terapéuticos en el manejo y/o terapia de algunas enfermedades patológicas. La biodisponibilidad tópica de péptidos y proteínas es baja en comparación con fármacos de bajo peso molecular. Esto es porque además de las barreras de absorción para péptidos y proteínas se puede dar la degradación por peptidasas en el tejido del ojo.

Investigaciones recientes del mecanismo de absorción por vía ocular indican que la absorción de insulina a través del epitelio corneal es por vía intercelular (ruta paracelular) y no por vía transcelular.

Tabla III. PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS QUE SON UTILIZADOS EN OFTALMOLOGÍA

DINÁMICA DEL HUMOR ACUOSO	CURACIÓN DE HERIDAS	RESPUESTA INMUNE	ANTIINFLAMATORIA
Factor atrial naturético	Factor de crecimiento epidermal	Ciclosporin	Sustancia P
Neurotensina	Fibronectin		
Vasopresina	Factor de crecimiento mesodermal	Interferón	Enkefalins
LH-RH	Insulina		

La vía ocular es también potencialmente usada para la liberación sistémica de péptidos y proteínas, esto sugiere que, la mayoría de la dosis aplicada tópicamente llega al sistema circulatorio por los ductos naso-lagrimal donde alcanza su efecto. La Metenkefalinamida®, puede ser absorbida a través de los vasos sanguíneos de la mucosa conjuntival.

La vía ocular aun no es totalmente aceptada, pero se esta convirtiendo en una vía disponible de liberación de péptidos y proteínas terapéuticas.¹²

c) Vía pulmonar

El tracto respiratorio esta constituido de una región nasofaríngea, traqueobronquial y pulmonar. La entrega local de fármacos en el tracto respiratorio incluye agentes proteolíticos, mucolíticos, broncodilatadores y agentes simpaticomiméticos. La vía pulmonar a pesar de ofrecer una extensa área superficial no ha tenido una gran importancia en la liberación de péptidos y proteínas. Lo que existe reportado es una

dosificación de insulina en aerosol, que consiste en una suspensión de cristales de zinc-insulina acompañada con un propelente y un dispersante.¹²

f) Vía rectal y vaginal

La vagina y el recto son cavidades en las cuales los fármacos son fáciles de insertar y mantener, siendo posible la absorción. Sin embargo, la vía vaginal es usada con menor frecuencia .

El recto en humanos mide aproximadamente de 15 a 20 cm de largo y contiene de 2 a 3 ml de fluido mucosal inerte, es rico en vascularización y presenta las siguientes ventajas:

- Evita el metabolismo del primer paso hepático
- Es una vía alterna para fármacos que administrados por vía oral causan náuseas y vómito.
- Tiene la posibilidad de interrumpir la absorción del fármaco en caso de que este provoque intoxicación
- La posibilidad de tener un blanco de acción en el sistema linfático.

Sin embargo, la vía rectal requiere de la utilización de grupos que mejoren la penetración de péptidos y proteínas, dentro de estos se incluye los salicilatos, enaminas, cadenas medias de glicéridos, una mezcla de surfactantes (no iónicos/lípidos) y mezclas de lípidos/bilis. Algunas de las proteínas y péptidos que han sido estudiados para su posible administración por vía rectal son: insulina, interferón, gastrina, pentagastrina, calcitonina, albúmina humana, leomicina y ciclosporin A.^{16,17}

g) Vía transdermal

La piel fue usada como una vía de administración solo para tratamientos de enfermedades locales. Sin embargo, con el estudio de la anatomía y fisiología de la piel, así como de la absorción percutánea, se puede considerar como una vía para la liberación de fármacos .

La vía transdermal tiene ventajas sobre la vía nasal y ocular por su baja actividad de enzimas proteolíticas, por lo que, se considera que tiene mayor acción en la liberación de péptidos y proteínas con actividad biológica. Entre otras ventajas se tiene que evita el metabolismo del primer paso hepático, disminuyendo así, la frecuencia de la dosis.

La desventaja que se puede observar para esta vía es la baja velocidad de permeación para los fármacos.

El estrato córneo es el responsable de la baja permeabilidad de la piel, esta capa esta formada por células muertas queratinizadas conteniendo solo un 20% de agua. El transporte de fármacos a través del estrato córneo puede ser transcelular e intercelular, para muchos compuestos la ruta intercelular es la más accesible. La interferencia con el paquete intercelular de lípidos puede reducir la resistencia difusional del fármaco en el estrato córneo .

Los péptidos y proteínas tienen particular dificultad en la permeación a través de el estrato córneo, debido a su hidrofiliidad, carácter iónico y peso molecular alto. La penetración de fármacos puede mejorarse usando azonas, ácidos grasos y por técnicas como Iontoforesis y Fonoforesis.^{16,17}

• Iontoforesis

La iontoforesis esta definida como una migración de iones cuando una corriente eléctrica pasa a través de una solución que contiene la especie ionizada. Los fármacos en forma iónica pueden migrar al aplicar una pequeña carga, esto puede lograrse por el control del pH y la fuerza iónica de la solución. Un sistema iontoforético clásico es cuando el fármaco esta contenido en un parche con un electrodo de la misma carga, que esta aplicado en la piel; el otro electrodo (de carga opuesta) es colocado en un parche empapado con una solución salina a una distancia localizada del cuerpo. Una corriente abajo del umbral del dolor del paciente es suficiente para que fluya el fármaco por un periodo de tiempo determinado.

Se ha demostrado que la insulina puede ser administrada a través de la piel de rata por iontoforesis usando corriente directa. La velocidad de liberación de la hormona estimulante de tiotropina (TRH) también se ha desarrollado por este método.

Las desventajas asociadas a este método de liberación transdermal son:

1.- Desnaturalización de los péptidos y proteínas por un excesivo calentamiento de la piel.

2.- Pérdida de la estructura cuaternaria, terciaria o secundaria por cambio de pH.^{16,17}

- Fonoforesis

La fonoforesis es también usada para la penetración y liberación de fármacos a través de la piel. Las longitudes ultrasónicas causan efectos térmicos y una alteración temporal en la estructura física de la piel, llegando a incrementar la absorción del fármaco. Sin embargo, la generación de calor durante este proceso puede ser suficiente para desnaturalizar a los péptidos o proteínas.¹⁶

- Grupos que mejoran la permeación

Las azonas y los ácidos oleicos son usados para facilitar la absorción a través de la piel. Estas moléculas pasan a través de las laminillas de los lípidos intercelulares del estrato córneo. Sin embargo, la irritación de la piel es el factor limitante de esta alternativa. Algunos ejemplos de grupos que mejoran la absorción de péptidos y proteínas se muestran en la Tabla IV.^{16,17}

- Profármacos

El uso de profármacos mejora la absorción transdermal siendo una opción viable, especialmente, para péptidos pequeños. La piel contiene una multitud de enzimas que pueden ser utilizadas para regenerar la actividad del fármaco tales como la TRH y la hormona estimulante de la hormona luteinizante (LHRH).

La neurotensina y la frinopeptidasa poseen un residuo piroglutamato terminal. Estos residuos pueden convertirse de un profármaco con permeabilidad a un fármaco con actividad terapéutica^{16,17}.

Tabla IV. EFICIENCIA DE LA ABSORCIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS EN PRESENCIA DE GRUPOS QUE MEJORAN LA ABSORCIÓN.

GRUPO	PÉPTIDO	VÍA	PORCIENTO DE ABSORCIÓN
Quelatos	Nonapéptidos	Nasal	-
	Insulina	Rectal	14-28
	Gastrina	Rectal	18
	Pentagastrina	Rectal	33
	Leuprolina	Vaginal	13-39
	Insulina	Oral	10
Surfactantes	Insulina	Nasal	30
	Leuprolina	Nasal	2
	Insulina	Rectal	13-50
	Leuprolina	Vaginal	4
	Insulina	Oral	?
Ácido oleico/monoleico	Nanopéptidos	Nasal	--
	Heparina	Rectal	12-15
	Leuprolina	Vaginal	3
	Leuprolina	Oral	0.054
Sales Biliares	Insulina	Nasal	10-30
	Leuprolina	Nasal	3
	DADLE	Nasal	94
	Interferon	Rectal	2
	Leuprolina	Vaginal	7
	Leuprolina	Oral	0.054

1.3 LA PIEL

La piel en un adulto cubre más de 19300 cm² de área superficial y recibe más o menos una tercera parte de toda la sangre que circula, es elástica y en condiciones ordinarias se

regenera por si sola. Además tiene la característica de ser casi totalmente impermeable, proporciona una barrera térmica estrechamente regulada y eficaz y participa en las funciones de evaporación del agua contribuyendo a la regulación de la temperatura del cuerpo⁴.

CAPAS DE LA PIEL

EPIDERMIS: Es la capa más externa de la piel y esta compuesta por células epiteliales escamosas estratificadas. La epidermis es más gruesa a medida que circunda la palma de las manos y la planta de los pies, haciéndose más delgada en la cara ventral del dorso. La epidermis se compone de cinco capas :

- * **Estrato córneo:** Consta de células muertas llenas por completo de proteínas queratinizadas, son aplanadas parecidas a escamas y contienen 20 % de agua.
- * **Estrato lúcido:** Esta situado inmediatamente abajo del estrato córneo. Es una capa que tiene de 1 a 5 células de espesor. Estas células son aplanadas y transparentes, además han perdido su núcleo.
- * **Estrato granuloso:** Formado de dos a cinco capas de células aplanadas. Los gránulos que se acumulan en las células dan a la capa su nombre, sin embargo, no contribuyen a la pigmentación. Este estrato se considera que es activo en la queratinización, proceso en el cual las células pierden su núcleo haciéndose más compactas y frágiles.
- * **Estrato espinoso.** Consta de varias hileras de células espinosas de forma poligonal. Las células más externas tienen forma de espinas, de ahí su nombre. En algunas clasificaciones éste se incluye en el estrato germinativo como la capa de Malpighi.
- * **Estrato germinativo:** Es la capa más profunda y más importante de la piel, ya que, contiene las únicas células capaces de efectuar división mitótica. Cuando las nuevas células son formadas sufren cambios morfológicos y nucleares a medida que se mueven hacia la capa superficial. La epidermis se regenera solo mientras que el estrato

germinativo permanezca intacto. La capa basal de estas células descansa en la membrana basal que ofrece más protección contra el medio ambiente.

DERMIS: Esta constituida de tejido conectivo denso, vascularizado dividido entre el segmento papilar. El tejido conectivo contiene fibras elásticas, colágena blanca, vasos sanguíneos y glándulas sudoríparas, estas últimas, encajadas en la dermis. Esta estructura esta dividida en porción papilar adyacente a la epidermis y porción reticular, situadas entre la capa papilar y el tejido subcutáneo.⁴

Además, de las características morfofisiológicas de la piel, estudios recientes han indicado que la piel contiene grupos con carga positiva y negativa con una magnitud neta y una polaridad dependiente del grado de protonación, a un pH por encima del punto isoeléctrico (3.2) la piel tiene una carga neta negativa y es selectiva a moléculas con carga positiva. En base a estos descubrimientos se puede anticipar que tipo de carga y densidad de carga tiene un efecto significativo sobre el transporte a través de la piel .

Este tipo de transporte es una modalidad del paso a través de la membrana que presenta unas características comparables (saturabilidad, especificidad y eventualmente competición) a las de un transporte activo, aunque aquí este se realiza en sentido del gradiente de concentración y sin ningún gasto de energía.^{38,43}

1.4 ABSORCIÓN PERCUTÁNEA

La absorción percutánea consiste en la introducción de un fármaco desde la superficie de la piel hasta el estrato córneo y su posterior difusión por la epidermis, dermis y microcirculación.

La penetración a través de las diversas regiones de la piel esta limitada por las resistencias que se oponen a la difusión. La resistencia difusional total (R_{piel}) a la penetración ha sido descrita por Chien, como:

$$R_{piel} = R_c + R_d + R_{ms}$$

Donde, R es la resistencia difusional y los subíndices sc , e y pd corresponden al estrato córneo, epidermis y capa papilar de la dermis, respectivamente.¹⁵

La mayor resistencia a la penetración es la que opone el estrato córneo, por lo tanto, es el factor que limita la absorción percutánea.

Al estrato córneo se le puede considerar una membrana de difusión pasiva, pero no un sistema inerte, porque por lo general tiene afinidad por la sustancia aplicada.

La correlación entre las concentraciones externa y superficial se expresa en términos del coeficiente de distribución K_m de la membrana - disolvente.

La forma integrada de la ley de Fick esta dada como :

$$J_s = K_m D C_s / \delta$$

y

$$K_p = K_m D / \delta$$

Donde :

K_p es el coeficiente de permeabilidad,

J_s es el flujo constante de soluto,

C_s es la diferencia de concentración del soluto a través de la membrana,

δ es el espesor de la membrana,

K_m es el coeficiente de reparto, membrana biológica / medio acuoso de disolución y

D es el coeficiente medio de difusión de membrana para el soluto.

Se sabe que el estrato córneo hidratado tiene la propiedad de ser más a fin para los compuestos lipófilicos.¹⁵

Kligman sugiere que existen dos especies de estrato córneo:

El de las palmas y las plantas, adaptado para soportar peso y roce y el estrato córneo del cuerpo proporciona flexibilidad, impermeabilidad y discriminación sensorial.

Estudios recientes sugieren que el orden de la difusión de moléculas simples a través de la piel es la siguiente :

plantar > palmar > dorso de la mano > escrotal y postauricular > axilar > cuero cabelludo
> brazos > piernas > tronco.^{14,15}

La absorción percutánea a través de la piel se puede dar por las siguientes rutas:¹⁵

- A.- Transcelular
- B - Difusión a través de los canales entre las células.
- C.- Difusión a través de los ductos sebáceos.
- D.- Transfolicular.
- E.- Difusión a través de los ductos sudoríparos.

En la Figura 1, se observan las rutas de la absorción percutánea.

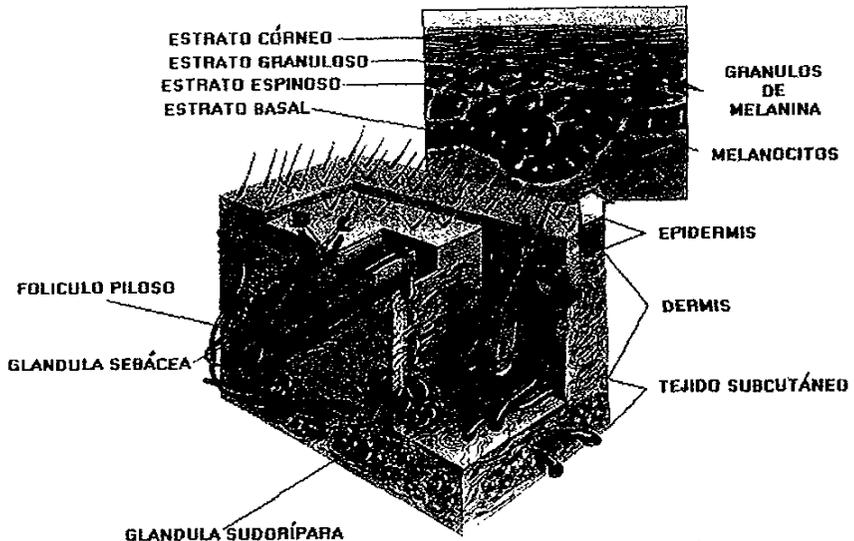


Figura 1. ESTRUCTURA DE LA PIEL Y SITIOS DE ABSORCIÓN PERCUTÁNEA: A, Transcelular; **B,** Difusión a través de los canales entre las células; **C,** Difusión a través de los ductos sebáceos; **D,** Transfolicular; **E,** Difusión a través de los ductos sudoríparos.

1.5 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE GLICINA, DIGLICINA Y TRIGLICINA^{8,9}.

GLICINA

- Descripción: Polvo cristalino, blanco, inodoro, con sabor dulce, la soluciones son ácidas frente al tornasol.
- Solubilidad: Un gramo en 4 ml de agua, un gramo en 1254 ml de alcohol y poco soluble en éter.
- Usos: En terapia de niastenia gravis (muchos investigadores dudan de su eficiencia en esta enfermedad). Como líquido para irrigación en la resección transuretral de la próstata. El ácido también ha sido empleado en varias preparaciones antiácidas, a veces como una sal compleja; sin embargo, su limitada capacidad reguladora del pH no justifica el costo de la mayoría de tales preparaciones.^{6,8,9}

DIGLICINA

- Descripción: cristales ortorrómbicos blancos, punto de fusión 247.5 °C .
- Solubilidad: soluble en agua a 25 °C 2.43 g en 100 ml. Prácticamente insoluble en acetona, metanol, éter, benceno y tetracloruro de carbono.
- Usos: Es sugerido como intermediario en la manufactura de agentes surfactantes, sales de complejos y agentes quelantes.^{6,8,9}

TRIGLICINA

- Descripción: Polvo blanco cristalino y fotosensible.
- Solubilidad: 1.8 g en 100 ml de agua.
Poco soluble en disolventes orgánicos.^{6,8,9}

En la Tabla V se muestra un resumen de las características generales de glicina, diglicina y triglicina.

Tabla V CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA GLICINA, DIGLICINA Y TRIGLICINA

PROPIEDAD	GLICINA	DIGLICINA	TRIGLICINA.
Estructura química	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$\text{HOOC}-\text{CH}_2\text{NHCH}_2-\text{COOH}$	$\text{HOOC}-\text{CH}_2 \text{HOOC}-\text{CH}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{COOH}$
Punto isoeléctrico	6.20	6.43	5.60
pKa	2.34, 9.60	2.98, 9.89	a 20°C 3.03, 3.07, 10.70
Peso molecular (g/mol)	75	133	191
Solubilidad en agua (g/100ml)	25 °C = 25.00 50 °C = 39.00 75 °C = 54.40 100°C = 67.2	25 °C = 2.43	22.5 °C = 1.28

II PARTE EXPERIMENTAL

2.1 REACTIVOS

Glicina (Merck, Grado reactivo 99%); Diglicina y Triglicina (Sigma Chemical, Grado reactivo 100%).

Los disolventes empleados para la CLAR fueron de grado HPLC. El resto de los reactivos fueron de grado reactivo.

2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Ratones machos cepa CD₁ de tres meses de edad, peso promedio de 30 g. Sin restricción alimenticia.

2.3 MÉTODOS

2.3.1. PRETRATAMIENTO DE LA PIEL.

La piel se obtuvo de ratones machos sacrificados por dislocación cervical. La sección fue obtenida de la región abdominal previamente rasurada y su estrato córneo fue removido por 20 repeticiones con cinta adhesiva [técnica de Kligman y Christopher, 1963]

2.3.2 ABSORCIÓN PERCUTÁNEA

1.- Se montó la muestra de piel entre dos celdas de difusión de manera que la parte donde se encontraba el estrato córneo quedara expuesta hacia la cámara donadora, el área de exposición fue de 2.84 cm². En la Figura 2 se muestra el diagrama del sistema de difusión.

2 - Se adicionó a la celda donadora 7.0 ml de una *solución de péptido* en amortiguador de fosfatos pH 4.3, 0.01M y solución salina fisiológica (2:1).

3.- Se adicionó a la celda receptora 10.0 ml de una mezcla de amortiguador de fosfatos de potasio pH 7.21, 0.01M y solución salina fisiológica (2:1).

4.- El sistema fue mantenido con agitación constante a una temperatura de $37 \pm 1^\circ \text{C}$ en baño de arena.

5.- Se tomaron muestras de 0.2 ml de la celda receptora, con reposición de volumen en intervalos de tiempo de 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 24 y 48 horas.

6.- La cuantificación fue realizada por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (Cromatógrafo de líquidos LDC Analytical con detector de luz ultravioleta visible de longitud de onda variable; Columna de Sílica, Supelco Lc-Si, 5 micrómetros, 250 X 4.6 mm).

Solución de péptido:

Se trabajó para glicina, diglicina y triglicina 3 niveles de concentración (6, 10 y 20 mg/ml) cada experiencia fue realizada por triplicado.

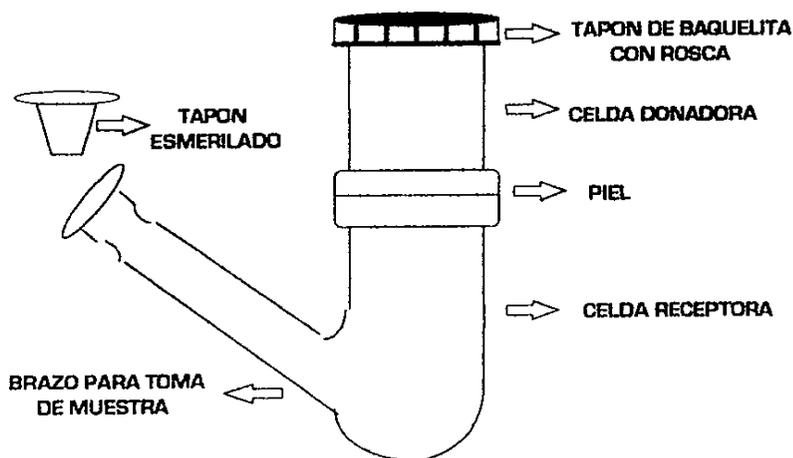


Figura 2 DIAGRAMA DEL SISTEMA DE DIFUSIÓN

III RESULTADOS

3.1 ABSORCIÓN PERCUTÁNEA DE GLICINA

La Tabla VI muestra los valores promedio de las concentraciones y fracciones permeadas de glicina de la celda receptora a diferentes tiempos para los tres niveles de concentración trabajados.

En la Figura 3 se observa el comportamiento de esta molécula hasta un tiempo de 48 h.

Tabla VI. CONCENTRACIONES Y FRACCIONES PERMEADAS A DIFERENTES TIEMPOS PARA GLICINA.

TIEMPO (h)	6 (mg/ml)		10 (mg/ml)		20 (mg/ml)	
	con.(mg/ml)	Fp	con.(mg/ml)	Fp	con.(mg/ml)	Fp
2	0.1755	0.0714	0.3860	0.0938	0.5404	0.0755
3	0.2160	0.0878	0.5832	0.1402	0.7389	0.1027
4	0.3080	0.1240	0.7585	0.1820	0.9055	0.1253
5	0.4294	0.1754	0.9899	0.2375	1.1340	0.1570
6	0.4765	0.1950	1.1934	0.2871	1.4824	0.2049
7	0.5903	0.2411	1.3958	0.3351	1.8279	0.2517
8	0.7131	0.2910	1.6070	0.3861	2.0902	0.2701
10	0.8436	0.3453	1.8499	0.4436	2.5094	0.3452
24	1.8421	0.7579	3.6529	0.8757	5.5255	0.7553
48	2.4012	-	4.1505	-	7.2805	-

Fp, Fracción permeada= cantidad a tx / cantidad a t₀. (n=3)

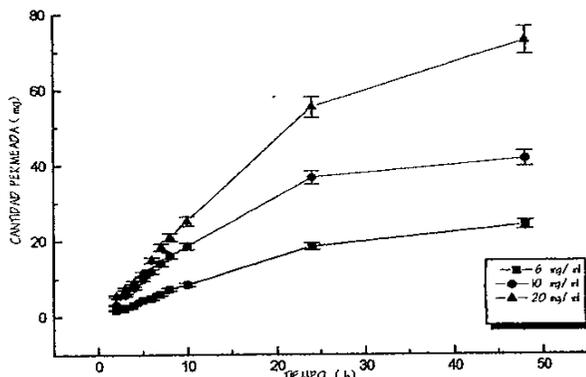


Figura 3. ABSORCIÓN PERCUTÁNEA DE GLICINA, PARA CONCENTRACIONES DE 6, 10 Y 20 mg/ml (n=3)

3.2 ABSORCIÓN PERCUTÁNEA DE DIGLICINA

La Tabla VII muestra los valores promedio de las concentraciones y fracciones permeadas de diglicina de la celda receptora a diferentes tiempos para los tres niveles de concentración trabajados.

En la Figura 4 se observa el comportamiento de esta molécula hasta un tiempo de 48 h.

Tabla VII. CONCENTRACIONES Y FRACCIONES PERMEDAS A DIFERENTES TIEMPOS PARA DIGLICINA

TIEMPO (h)	6 (mg/ml)		10 (mg/ml)		20 (mg/ml)	
	con (mg/ml)	Fp	con.(mg/ml)	Fp	con.(mg/ml)	Fp
2	0.2521	0.1064	0.1830	0.0830	0.3051	0.0966
3	0.4254	0.1795	0.2985	0.1352	0.4290	0.1358
4	0.5366	0.2265	0.3941	0.1785	0.5213	0.1650
5	0.4758	0.2008	0.4438	0.2009	0.6086	0.1927
6	0.7241	0.3056	0.5004	0.2226	0.6558	0.2076
7	0.9277	0.3915	0.5746	0.2602	0.7217	0.2285
8	0.9988	0.4215	0.6753	0.3058	0.7468	0.2384
10	1.2036	0.5079	0.7305	0.3308	0.8381	0.2653
24	2.1651	0.9137	1.3183	0.5971	2.0102	0.6364
48	2.2195	-	2.2080	-	3.1587	-

Fp, Fracción permeada = cantidad a tx / cantidad a t₄₈. (n=3)

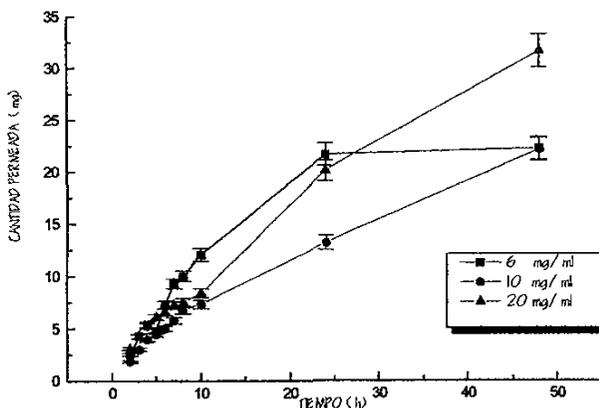


Figura 4. ABSORCIÓN PERCUTÁNEA DE DIGLICINA, PARA CONCENTRACIONES DE 6, 10 Y 20 mg/ml (n=3)

3.3 ABSORCIÓN PERCUTÁNEA DE TRIGLICINA

La Tabla VIII muestra los valores promedio de las concentraciones y fracciones permeadas de triglicina de la celda receptora a diferentes tiempos para los tres niveles de concentración trabajados. (Apendice 2). En la Figura 5 se observa el comportamiento de esta molécula hasta un tiempo de 48 h.

Tabla VIII. CONCENTRACIONES Y FRACCIONES PERMEADAS A DIFERENTES TIEMPOS PARA TRIGLICINA.

TIEMPO (h)	6 (mg/ml)		10 (mg/ml)		20 (mg/ml)	
	con (mg/ml)	Fp	con.(mg/ml)	Fp	con.(mg/ml)	Fp
2	0.4209	0.2151	0.3742	0.1836	0.2193	0.1182
3	0.5131	0.2622	0.4552	0.2197	0.2646	0.1423
4	0.6163	0.3381	0.5730	0.2781	0.3806	0.2043
5	0.8594	0.4391	0.6662	0.3254	0.4554	0.2463
6	0.9532	0.4871	0.8466	0.4129	0.4667	0.2545
7	1.0759	0.5498	0.9134	0.4462	0.5500	0.3037
8	1.2346	0.6309	1.0132	0.4686	0.6238	0.3403
10	1.3542	0.6920	1.1867	0.5804	0.7955	0.4188
24	1.7164	0.8771	1.8014	0.8931	1.5659	0.8000
48	1.9570	-	2.0250	-	1.8060	-

Fp, FRACCION PERMEADA= cantidad a tx / cantidad a t₀. (n=3)

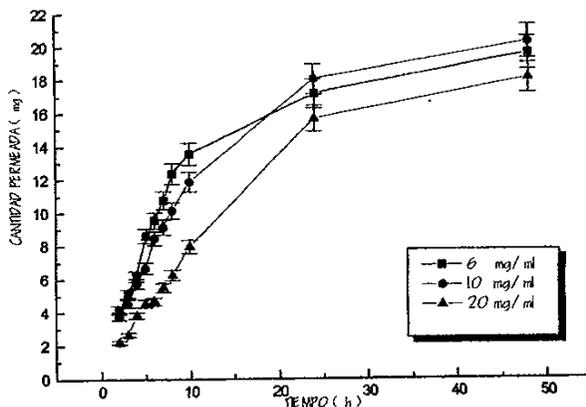


Figura 5 ABSORCIÓN PERCUTÁNEA DE TRIGLICINA PARA CONCENTRACIONES DE 6, 10 Y 20 mg/ml (n=3)

3.4 PARÁMETROS DE PERMEACIÓN.

La cinética de absorción se determinó por el método gráfico, para cero, primer y segundo orden, los resultados se muestran en la Tabla IX.

Tabla IX. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN PARA DETERMINAR LA CINÉTICA DE ABSORCIÓN.

CONCENTRACIÓN (mg/ml)	GLICINA	DIGLICINA	TRIGLICINA
6	r ₁ =0.9368 r ₂ =0.7351 r ₃ =0.4322	r ₁ =0.8017 r ₂ =0.6408 r ₃ =0.3750	r ₁ =0.7420 r ₂ =0.5614 r ₃ =0.3884
10	r ₁ =0.8703 r ₂ =0.6585 r ₃ =0.3703	r ₁ =0.9692 r ₂ =0.7700 r ₃ =0.2885	r ₁ =0.7815 r ₂ =0.6586 r ₃ =0.4536
20	r ₁ =0.9415 r ₂ =0.7386 r ₃ =0.4394	r ₁ =0.9882 r ₂ =0.8773 r ₃ =0.5703	r ₁ =0.8939 r ₂ =0.7549 r ₃ =0.4790

r₁ = orden cero; r₂ = primer orden; r₃ = segundo orden

El orden de la cinética fue corroborado por una variante gráfica del método de Van Hoff (Apéndice 2).

Los parámetros de permeación determinados fueron :a) velocidad de flujo, la cual es el valor de la pendiente de graficar cantidad permeada Vs tiempo; b) constante de velocidad de permeación (K_p), la cual es el valor de la pendiente del gráfico de fracción permeada (cantidad permeada a t_x / cantidad permeada a t₄₈) Vs tiempo; y, c) coeficiente de permeación (P) calculado a partir de la siguiente ecuación que deriva de la Ley de Fick:

$$P = (V_R / AC_D) (dC_R / dt)$$

donde:

P = Coeficiente de permeación (cm / s)

V_R = Volumen del compartimiento receptor (cm³)

A = Área difusional (cm²)

C_D = Concentración en el compartimiento donador (mg / cm³)

C_R = Concentración en el compartimiento receptor (mg / cm³)

dt = Intervalo de tiempo (s)

Los resultados obtenidos para estos parámetros se observan en la Tabla X

Tabla X. PARÁMETROS DE PERMEACIÓN PARA LAS TRES MOLÉCULAS .

MOLÉCULA	CONCENTRACIÓN (mg/ml)	VELOCIDAD DE		
		FLUJO (mg/s) x10 ⁻⁴	Kp (s ⁻¹) X 10 ⁻⁵	P (cm/s) X 10 ⁻³
GLICINA	6	2.4519	1.0056	1.1527
	10	2.2861	1.2667	1.7789
	20	7.2033	0.9638	1.0214
DIGLICINA	6	3.333	1.4066	2.4624
	10	1.9008	0.8583	0.7889
	20	1.7928	0.5694	0.5669
TRIGLICINA	6	3.4989	1.7670	2.0088
	10	2.9364	1.4028	1.2953
	20	1.9444	1.0389	0.5472

Kp, constante de velocidad de permeación; P, coeficiente de permeación

Los valores promedio de pH medidos al final de cada experiencia fueron para la celda donadora de 4.3 +/- 0.3 y para la celda receptora de 7.21 +/- 0.2

IV ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las Figuras 3, 4 y 5 muestran que la glicina, diglicina y triglicina parecen seguir una cinética de absorción de primer orden, sin embargo, por el método gráfico, se encontró que los coeficiente de correlación más próximos a 0.99, corresponden al orden cero (Tabla IX). Para verificar dicho orden, se recurrió a una variante gráfica de Método de Van't Hoff,⁶⁷ con la cual, se encontraron valores de la pendiente en un rango de -0.020 a 0.1492 (Apéndice 2), lo que indica que los resultados efectivamente se ajustan a una cinética de absorción de orden cero.

En la Figura 6 se observa la cantidad permeada a las 48 h para las tres moléculas. Para los tres niveles de concentración la relación entre el tamaño de la molécula y la cantidad permeada es inversamente proporcional; este comportamiento es lógico, ya que, se ha determinado que, entre mayor sea el tamaño de la molécula será más difícil su penetración a través de la piel.^{61,62}

Por otro lado, cuando comparamos el efecto de la concentración sobre la permeación se observa una relación directamente proporcional para glicina y diglicina (Figura 6). Este comportamiento es debido a que estas moléculas penetran a través de la piel por un fenómeno pasivo, donde, la fuerza direccional es el gradiente de concentración que se genera⁶³. Sin embargo, para triglicina al llegar a la concentración de 20 mg/ml se observa una disminución en la cantidad permeada, dicho comportamiento puede ser debido a que en la celda donadora se tiene una solución saturada, dado que la solubilidad del péptido es de 12.8 mg/ml⁹. Este resultado coincide con lo reportado por Hoo-Kyun y Gordon, los cuales concluyeron que al trabajar soluciones próximas a la saturación disminuye la penetración del péptido.⁶⁶

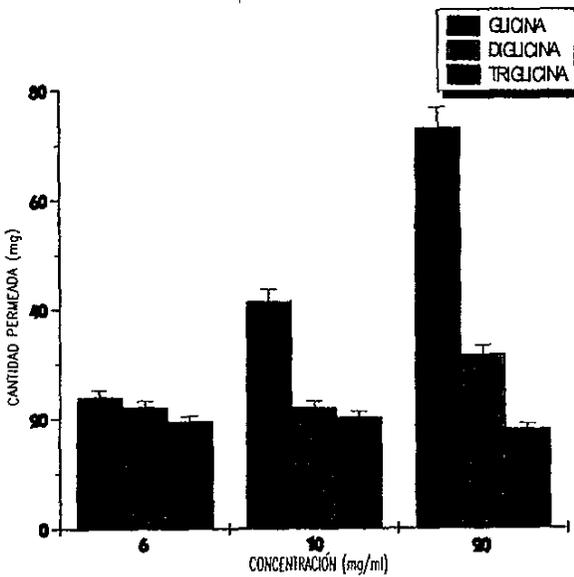


Figura 6. COMPARACIÓN DE LAS CANTIDADES PERMEADAS A LAS 48 h PARA GLICINA, DIGLICINA Y TRIGLICINA. (n=3)

En lo referente a la velocidad de flujo (Figura 7) en glicina se observa que, a mayor concentración mayor velocidad de flujo. En tanto que, diglicina y triglicina presentan un comportamiento contrario.

El comportamiento de glicina se debe a que es una molécula de menor tamaño y mayor solubilidad (25g/100 ml), factores que le permiten atravesar la membrana con mayor facilidad, mientras que, diglicina y triglicina, con pesos moleculares mayores y solubilidades menores (2.43 y 1.28 g/100 ml, respectivamente) no se puede esperar un incremento en la velocidad de flujo debido a una incompleta disolución de las moléculas.⁶³

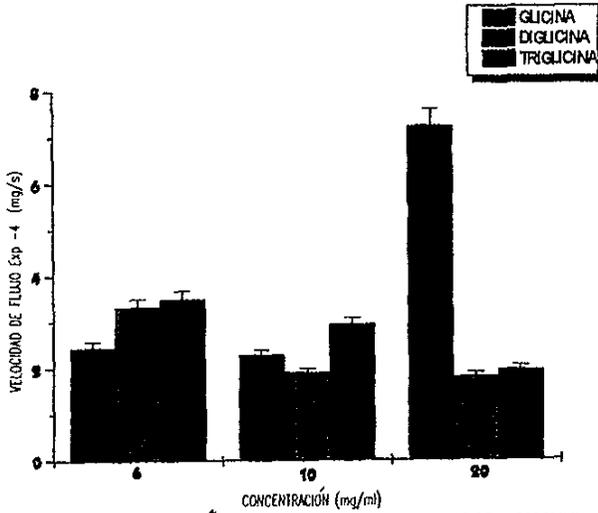


Figura 7. COMPARACIÓN DE VELOCIDADES DE FLUJO PARA GLICINA, DIGLICINA Y TRIGLICINA. (n=3)

Para explicar la influencia del grado de ionización en el transporte pasivo de péptidos a través de la piel se han propuesto tres teorías :

- 1.- Teoría de pH-partición, en donde, se favorece la absorción de especies no ionizadas.⁵⁸
- 2.- La hipótesis de Siddiqui y col, sugiere que, tanto las especies ionizadas como las no ionizadas pueden penetrar la piel.⁶⁴
- 3.- La posibilidad de permeación a través de la piel por la formación de un par-ión.⁶⁵

Nuestro estudio se apega a la primera teoría, ya que, considerando el porcentaje de molécula no ionizada para glicina, diglicina y triglicina (Tabla XI), podemos establecer que a mayor porcentaje de especie sin ionizar fue mayor la permeación.

Tabla XI. PORCENTAJE DE MOLECULA NO IONIZADA AL pH DE ESTUDIO (4.3).

MOLECULA	pKa	PORCENTAJE NO IONIZADO
GLICINA	2.34	99
DIGLICINA	2.98	95
TRIGLICINA	3.03	94

Se encontraron coeficientes de permeación para glicina, diglicina y triglicina en un rango de 0.5 a 3.0×10^{-5} cm^2/s (Figura 8), los cuales resultaron ser mayores a los reportados por Ackermann y Flynn para péptidos y proteínas⁶⁰ y a los reportados por Ruland y Kreuter para aminoácidos.²⁸ Ellos concluyen que con los coeficientes de permeación encontrados no era factible la administración transdermal, ello puede deberse a que al pH en el trabajaron era el punto isoeléctrico, donde, se presenta precipitación y por ende disminución de la permeación. Sin embargo, en nuestro caso se tiene a la molécula no ionizada y soluble (pH 4.3), condiciones que permiten la administración transdermal. Además, este pH es adecuado y compatible con el pH de la piel (3.8 - 5.6).²⁰

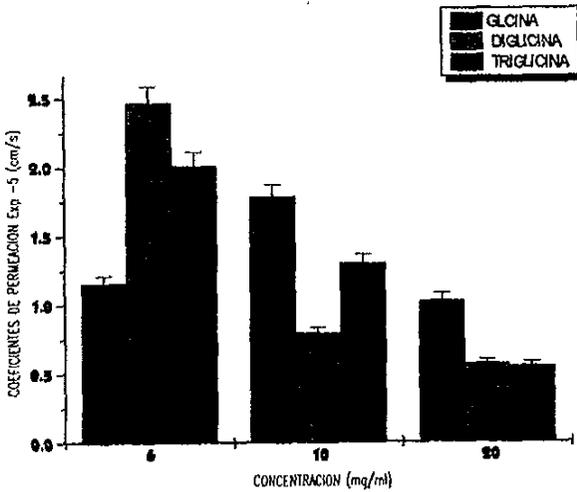


Figura 8. COMPARACION DE LOS COEFICIENTES DE PERMEACION PARA GLICINA, DIGLICINA TRIGLICINA. (n=3)

Por otra parte, los valores de los coeficientes de permeación y constante de velocidad de permeación más altos (Figura 8 y 9) coinciden en una concentración ideal, lo que nos indica que para cada molécula existe una concentración, en donde, la permeación es más eficiente.

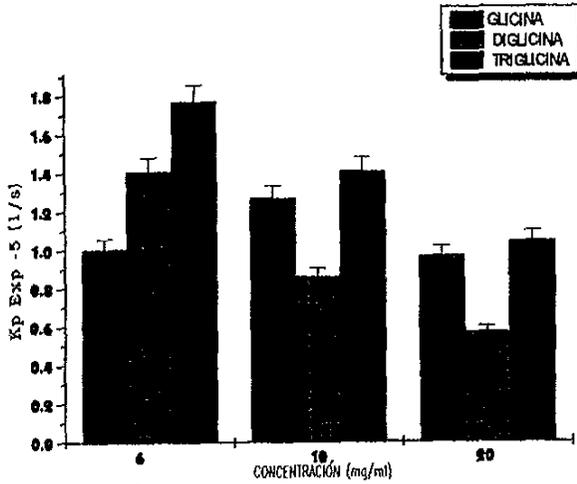


Figura 9. COMPARACIÓN DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD DE PERMEACION (Kp) PARA GLICINA, DIGLICINA Y TRIGLICINA. (n=3)

Por último, para demostrar la influencia del tamaño molecular y la concentración, se realizó un análisis de varianza para los coeficientes de permeación (Tabla XII), con un $\alpha=0.05$, encontrándose que ambos factores influyen significativamente sobre la permeación de las moléculas.

Tabla XII. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA COEFICIENTES DE PERMEACIÓN.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F
Peso molecular	0.2638	2	0.1319	0.4371
Concentración	6.0413	2	3.00715	9.9667
Interacción	3.5981	4	0.89953	2.9813
Error	5.4310	18	0.301722	
Total	15.3072	26		

F tablas : $F_{0.05,2,18} = 3.55$, $F_{0.05,4,18} = 2.93$

V CONCLUSIONES

La glicina, diglicina y triglicina siguen una cinética absorción de orden cero (para concentraciones de 6, 10 y 20 mg/ml, a una temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$).

Se establece que existe una interacción significativa del tamaño molecular y la concentración sobre la permeación, además, el transporte pasivo se favorece para las moléculas en su forma no ionizada. Se determinó que para cada molécula existe una concentración ideal, donde los valores de K_p y P son los más altos.

En general, el tamaño molecular y la concentración son factores determinantes que se ven reflejados en la absorción percutánea y deben considerarse en el diseño de sistemas de liberación de péptidos y proteínas a través de piel.

VI APÉNDICE 1.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN PARA GLICINA, DIGLICINA Y TRIGLICINA .

Las condiciones determinadas para la cuantificación de glicina, diglicina y triglicina; se muestran en la Tabla XIII.^{10,11}

Tabla XIII. CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLICINA , DIGLICINA Y TRIGLICINA

CONDICIONES DE TRABAJO	GLICINA	DIGLICINA	TRIGLICINA
Columna	Sílica ,Supelco Lc-Si, 5mm , 250 X 4.6 mm	Sílica ,Supelco Lc-Si, 5mm , 250 X 4.6 mm	Sílica ,Supelco Lc-Si, 5mm , 250 X 4.6 mm
Sensibilidad	0.01	0.01	0.05
Atenuación	2	2	3
Velocidad de flujo (ml/min)	2	2	2
Fase móvil (65:21:14)	ACN-MEOH-AGUA	ACN-MEOH-AGUA	ACN-MEOH-AGUA

Para la validación del método de cuantificación, se evaluaron los siguientes parámetros :

- Linealidad del sistema.
- Precisión del sistema.
- Linealidad del método
- Especificidad del método.
- Exactitud y repetitividad al 100% del método.
- Precisión del método
- Estabilidad del método.

La validación para los métodos de cuantificación de glicina, diglicina y triglicina, son lineales, precisos y exactos. En la Tabla XIV tenemos los resultados obtenidos.

Tabla XIV. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE GLICINA, DIGLICINA Y TRIGLICINA

PARAMETROS DE VALIDACIÓN	CRITERIO	RESULTADOS GLICINA	RESULTADOS DIGLICINA	RESULTADOS TRIGLICINA
LINEALIDAD SISTEMA	$C.V \leq 1.5\%$ $r \geq 0.99$ $r^2 \geq 0.98$	1.3145 % 0.9999 0.9999		
PRECISIÓN SISTEMA	$C.V \leq 1.5\%$	0.7814		
LINEALIDAD MÉTODO	% Recobro 98-102 % $C.V \leq 2\%$ $m = 1$ $b = 0$	99.9 % 1.4675 tcal = 1.8526 tcal = 2.1604	99.2143 % 1.7663 tal = 0.2439 tcal = -1.6549x10 ⁻³	99.495 % 1.7039 % tcal = 0.0465 tcal = 1.1523x10 ⁻⁷
PRECISIÓN MÉTODO (REPRODUCIBILIDAD)	$C.V \leq 2\%$ Debe satisfacer los requisitos de análisis de varianza	0.9947 % Fa = 0.2938 Fgla/gld=38.5 Fd = 0.5488 Fgld/gle = 6.06	1.95 % Fa = 1.5276 Fgla/gld = 38.51 Fd = 0.0067 Fgld/gle = 6.06	0.7843 % Fa = 15.8513 Fgla/gld = 38.51 Fd = 0.7622 Fgld/gle = 6.06
PRECISIÓN MÉTODO (REPETIBILIDAD)	$C.V \leq 2\%$	1.8 %	2.00 %	1.7534 %
EXACTITUD MÉTODO	% Recobro 98-102 %	100.4316 %	99.5768%	100.3942 %
ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO	Señal debida a la sustancia de interés	Ninguno de los componentes del disolventes produce una respuesta que interfiera con la glicina	Ninguno de los componentes del disolventes produce una respuesta que interfiera con la diglicina .	Ninguno de los componentes del disolventes produce una respuesta que interfiera con la triglicina .
ESTABILIDAD DEL MÉTODO	El intervalo de confianza para las diferencias de las medias debe incluir cero y/o Iprom. se encuentra entre 98- 102 %	Iprom t a/1sem = 56.7731 % Iprom ref/1sem = 102 %	Iprom t.a /1sem = 65.9067 % Iprom ref/1sem = 99.4480 %	Iprom ref ambar = 98.9645 % Iprom a temp ambiente y en frasco transparente = 76 %

VII APÉNDICE 2.

La variante gráfica del Método de Van't Hoff forma parte de los métodos diferenciales para obtener el orden de las reacciones. Para cada concentración de glicina, diglicina y triglicina se determinó la velocidad de absorción en distintos momentos de tiempo a partir del inicio de la cinética. Después se obtuvo un gráfico del logaritmo de la velocidad contra concentración en la celda receptora, en donde, la pendiente de la recta nos da directamente el orden de la cinética de absorción como lo muestran las figuras 10-18.⁶⁷

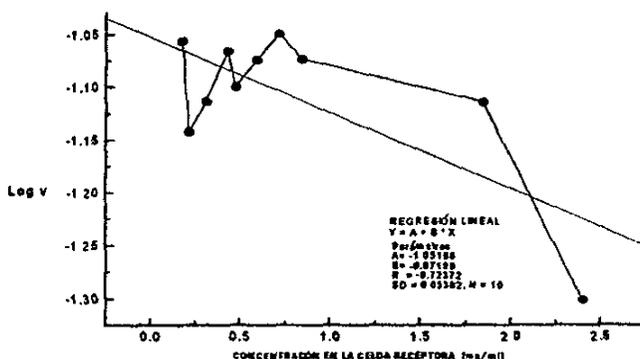


Figura 10. LOGARITMO DE LA VELOCIDAD EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PARA GLICINA A 4 mg/ml

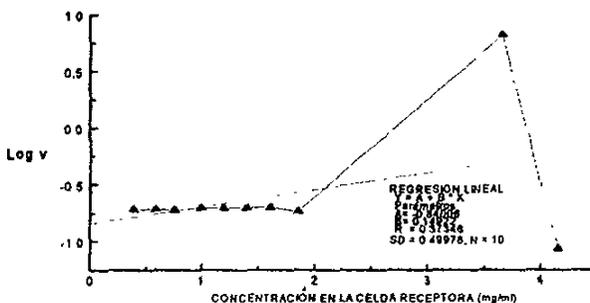


Figura 11. LOGARITMO DE LA VELOCIDAD EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PARA GLICINA A 10 mg/ml

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

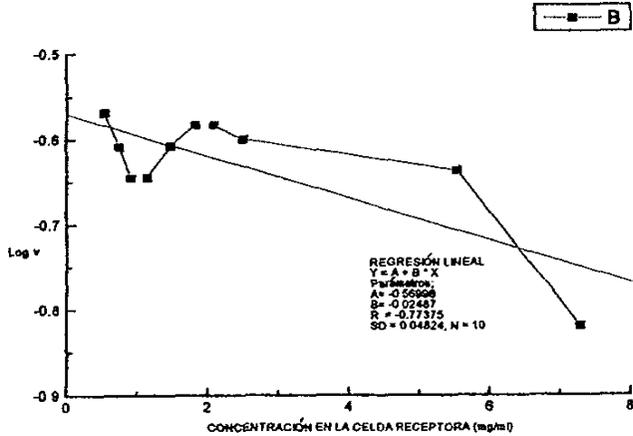


Figura 12. LOGARITMO DE LA VELOCIDAD EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLICINA A 80 mg/ml

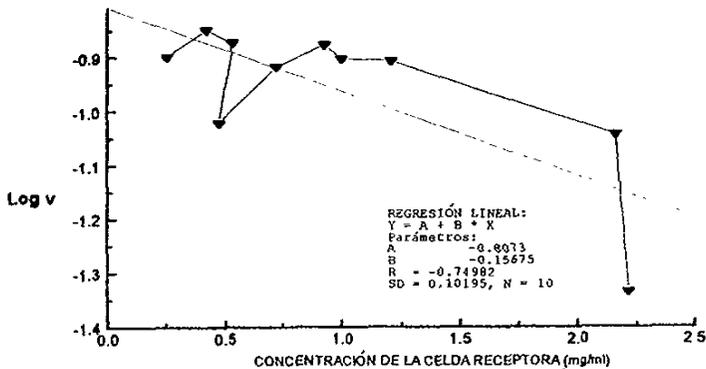


Figura 13. LOGARITMO DE LA VELOCIDAD EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DOLICINA A 6 mg/ml

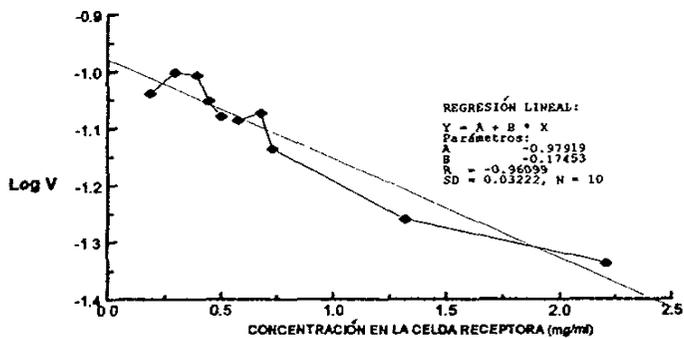


Figura 14. LOGARITMO DE LA VELOCIDAD EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PARA DILICINA A 10 mg/ml

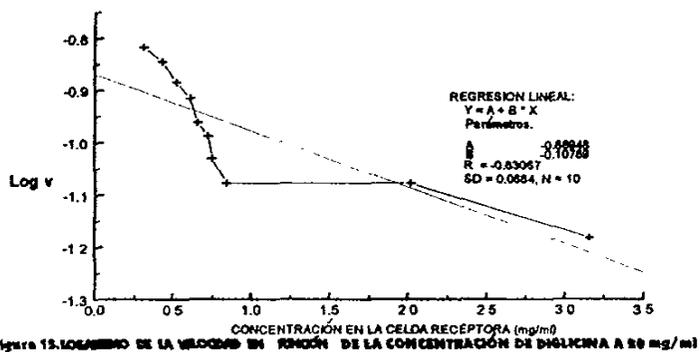


Figura 15. LOGARITMO DE LA VELOCIDAD EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DILICINA A 20 mg/ml

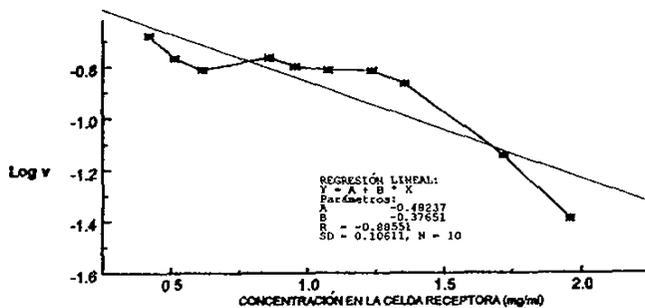


Figura 16. LOGARITMO DE LA VELOCIDAD EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TMSLON A 6 mg/ml

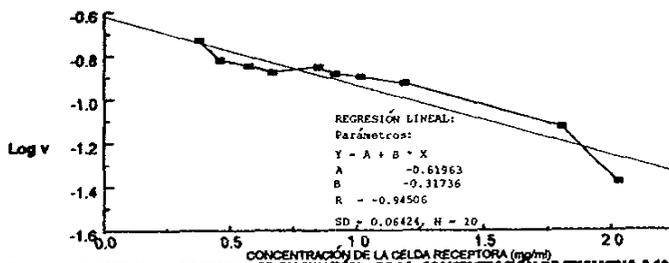


Figura 17. LOGARITMO DE LA VELOCIDAD EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE TMSLON A 10 mg/ml

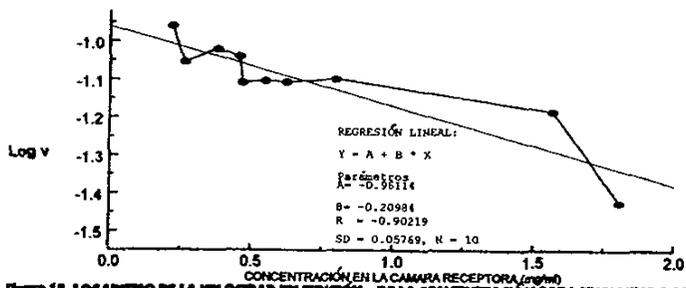


Figura 18. LOGARITMO DE LA VELOCIDAD EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PARA THIEETHILCINA A 50 mg/ml

VIII BIBLIOGRAFIA

- 1.- U.Z.Littaver, Y.Dudai, I.Silma, V.I.Teichberg and Z.Vogel; NEUROTRANSMITTERS AND THEIR RECEPTORS; JOHNWLEY AND SONS; NEW YORK , 333-343 (1980).
- 2.- Hoffman Joseph F; MEMBRANE TRANSPORT PROCESSES; VOL.I RAVEN PRESS; NEW YORK, 227-230 (1978).
- 3.- Stevens M.D. Charles F; MEMBRANE TRANSPORT PROCESSES; RAVEN PRESS; VOL.III; NEW YORK, 322-325 (1979).
- 4.- Cormack David H; HISTOLOGIA DE HAM; HARLA; MEXICO; 557580 (1988).
- 5 - García Valdecasas Francisco; FARMACOLOGIA; 7ª.edición; ESPAXS; BARCELONA, ESPAÑA, 25-26 (1978)
- 6.-Bowman W. C. and Rand M. J; TEXTBOOK OF PHARMACOLOGY; 2ª.edición. NEW YORK. 485-503 (1980).
- 7.- R Henry , Mahler and Cordes Eugene H; QUIMICA BIOLOGICA; OMEGA BARCELONA, ESPAÑA, 8-31(1971).
- 8.- THE MERCK INDEX AND ENCYCLOPEDY OF CHEMICAL AND DRUGS., 8ª.edición. MERCK. U.S A, 500 (1968).
- 9.- Hawley Gessner G; DICCIONARIO DE QUIMICA Y PRODUCTOS QUIMICOS; Omega; Barcelona, España, 434 (1975).
- 10.- Fony G.W and Stanley Lam; HPLC IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY; MARCEL DEKKER INC; NEW YORK (1991).
- 11.- Huncocock William S; CRC HANDBOOK OF HPLC FOR THE SEPARATION OF AMINOACIDS, PEPTIDES AND PROTEIN; Volumen 17ª.edición; CRC PRESS; FLORIDA,U.S.A., 111-226 (1990).
- 12.- Grunewald Gary L; MODERN DRUG RESEARCH; PATHS TO BETTER AND SAFER DRUGS; MARCEL DEKKEN ; INC. NEW YORK , 218-241(1989).
- 13.- Martin Alfred and Swarbrick James; PHYSICAL PHARMACY; 3ª. Edición; LEA AND FABIGER; PHILADELPHIA, U.S.A, 427-432 (1983).
- 14.- Kleyerman Melvin E. and Groves Michael J; PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY. FUNDAMENTALS AND ESSENTIALS; INTERPHARM PRESS; INC. BUFAFALO GROVE, U.S.A., 119-143 (1992).
- 15.- Remington; FARMACIA; 7ª edición; Tomo I; MEDICA PANAMERICA S.A; BUENOS AIRES, ARGENTINA, 1568-1569 (1990).
- 16.- Pezzuto Jonh M., Johnson Michael E. and Manasse Henri R; BIOTETECHNOLOGY AND PHARMACY. CHAPMAN & HALL. NEW YORK, U.S A , 116-151 (1993).
- 17.- Zite S.William; PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY A PROGRAMMED TEXT; TECHONMIA PUBLISHING COMPANY; NEW YORK, U.S.A. 99-122 (1992).
- 18.- Gibaldi Milo; FARMACOCINETICA; Editonal Reverte. 149-158 (19982)

- 19.- Goodman Louis and Gilman Alfred; LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA., 8va., edición Panamericana., México., 2-17 (1991).
- 20.- Poucher W.A., PERFUMES COSMETICS AND SOAPS., Vol. III., Modern Cosmetics, 8va De. Chapman and Hall. U.S.A., 313 (1984).
- 21.- Cooper Eugene R., Increased skin permeability for lipophilic molecules., J. OF PHARMA. SC., Vol. 73 No. 8, 1153 - 1156 (1984).
- 22.- Rougier Andre, Lotte Claire and Malbach Howard I., The hairless rat: A relevant animal model to predict in vivo percutaneous absorption in humans., THE J. OF INV. DERMA., Vol. 88 No. 5, 577 - 581 (1987).
- 23.- Russell Bond John and Barry Brian William., Hairless mouse skin is limited as model for assessing the effects of penetration enhancers in human skin., THE J. OF INV. DERMA., Vol. 90 No. 6, 810 - 813 (1988).
- 24.- Roy S.D, Hou S.Y.E, Withamm S.L. and Flynn G.L., Transdermal delivery of narcotic analgesics: Comparative metabolism and permeability of human cadaver skin hairless mouse skin., J. OF PHARMA. SC., Vol. 83 No. 12, 1723 - 1728 (1994).
- 25.- Russell Bond John and Barry Brian William., Limitation of hairless mouse skin as a model for in vitro permeation studies through human skin: Hydration damage., THE J. OF INV. DERMA., Vol. 90 No. 4, 486 - 489 (1988).
- 26.- Schuster Rainer., Determination of free aminoacids by high performance liquid chromatography., ANALYTICAL CHEMISTRY, Vol. 52 No. 4, 617 - 621 (1980).
- 27.- Shah Vinod. P, Flynn Gordon L, Gyy Richard H., et al. In vivo percutaneous penetration / absorption., INT. J. OF PHARMA., Vol. 74, 1 - 8 (1991).
- 28.- Rulan A. and Kreuter J., Transdermal permeability and skin accumulation of aminoacids., INT. J. OF PHARMA., Vol. 72, 149 - 155 (1991).
- 29.- Hurst W. Jefferey., A Robert and Martin Jr., Of O- phthaldehyde derivatives and high pressure liquid chromatography in determining the free aminoacids in cocoa beans., J. AGRIC. FOOD CHEM., Vol. 28, 1039 (1980).
- 30.- Lofsson Thorsteinn and Bodor Nicholas., Improved delivery through biological membranes X : Percutaneous absorption and metabolism of methylsulfanylmethyl 2-acetoxybenzoate and related aspirin prodrugs., J. OF PHARMA. SC., Vol. 70 No. 7, 756 - 758 (1981).
- 31.- Swarbrick James, Lee Geoffrey, Brom Jeffrey and Nigel P. Gensmuntel. Drug permeation through human skin II: Permeability of ionizable compounds . J. OF PHARMA. SC., Vol. 73 N. 10, 1352 - 1355 (1984).
- 32.- Crommen Jacques., Ion-pair chromatography in the low concentration range by use of highly absorbing counter ions., J. OF CHROMATOGRAPHY Vol 142. 283 - 297 (1977)
- 33.- Caisimpoolas N., Jenney., Rapid analytical gel chromatography of proteins and peptides on sephadex microbore columns., J. OF CHROMATOGRAPHY Vol 6. 77 - 83 (1972).

34. Foucault and M. Caude., Ligand exchange chromatography of enantiomeric aminoacids on copper-loaded chiral bonded silica gel and of aminoacids on copper (II) modified silica gel., *J. OF CHROMATOGRAPHY*. Vol 185, 345 - 360 (1979).
35. Scheuplein Robert J., Mechanism of percutaneous absorption .I: Routes of penetration and the influence of solubility., *THE J. OF INV. DERMA.*, Vol. 45, 334-346 (1965).
36. Blank Irvin H., Scheuplein Robert J. and Macfarlane Dorothy J., Mechanism of percutaneous absorption.II:The effect of temperature on the transport of non-electrolytes across the skin., *THE J. OF INV. DERMA.*, Vol. 49 No. 6, 582 - 589 (1967).
37. Abrettam Michael H., Chadha Harpreet S. and Mitchell Robert C., The factors that influence skin peiration of solutes., *THE J. PHARMA. PHARMACOL.* Vol. 47, 8 - 16 (1995).
38. Liaw Jiahong, Rojasasakul Yongnut and Robinson Joseph R., The effect of drug charge tyoe and charge density on corneal transport. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*. Vol. 88, 111- 124 (1992).
39. Pitman Ian H. and Rostas Susan J., A compartion of frozen an reconstituted cattle and human skin as barriers to drug penetration., *J. OF PHARMA. SC.*, Vol. 71 No. 4, 427 - 430 (1982).
40. Harrison S.M., B.W., Barry Effects of freezing on human skin permeability., *THE J. PHARMA. PHARMACOL.* Vol. 36, 261 - 262 (1984).
41. Sasaki H.Toshi, Kojima Masaki, Mori Yoshiyuki, Nakamura Junzo and Shibasaki Juichiro., Enhancig effect of pyrroline derivatives on Imsdermal penetration of 5-fluorouracil, triamcinolone acetonide, indomethacin, and flurbiprofen., *J. OF PHARMA. SC.*, Vol.80 No. 6, 533 - 538 (1991).
42. Sloan Kenneth B., Beall Howard D., Wimar William R. and Villanueva Rene., The effect of receptor phase comosition on the permeability of hairless mouse skin in diffusion cell experiments., *INT. J. OF PHARMA.*, Vol 73, 97 - 104 (1991).
43. Schoenwald Ronald D. and Huang Hong-Shian., Corneal Penetration behavior of β -blocking agents I: Physicochemical factors., *J. PHARMA. SC.*, Vol. 72, 1266 - 1271 (1983).
44. Rojasasakul Yogyut, Robinson Joseoh R., Transport mecanisms of the cornea: Characterization of barrier permselectivity., *INT. J. OF PHARMA.*, Vol.55, 327 - 246 (1989).
45. Rainer Bischoff and Kolbe Hanno V. J., Deamidation of asparagine and glutamine residues in protins and peptides: Structural determinants and analytical methodology., *J. OF CHROMATOGRAPY B.*, Vol. 662, 261 - 278 (1994).
46. Sloan Kenneth B., Mikoch Suzanne A., Kevin G. and Silver B.S., Use of solubility parameters of drug an vehicle to predict flux through skin., *THE J. OF INV. DERMA.*, Vol. 87, 244 - 252 (1986).

- 47.- Yamashita Fumiyoshi, Koyama Yasuo and Sasaki Hitoshi., Estimation of a concentration of acyclovir in the skin after topical administration., *INT. J. OF PHARMA.*, Vol. 89, 199 - 206 (1993).
- 48.- Joyce Joseph G., Cock James C. and Przysecki Craig T., Chromatographic separation of low-molecular mass recombinant proteins and peptides on Superdex 30 prep grade., *J. OF CHROMATOGRAPHY B.*, Vol. 662, 325 - 334 (1994).
- 49.- Huang Hong-Shian, Schoewald Ronald D. and Lach John L., Corneal penetration behavior of β -blocking agents II. In vitro- in vivo correlations., *J. PHARMA. SC.*, Vol. 72 No. 11, 1279 - 1281 (1983).
- 50.- Rojanasakul Yongyut, Paddock Steven W. and Robinson Joseph R., Confocal laser scanning microscopic examination of transport pathways and barriers of some peptides across the cornea., *INT. J. OF PHARMA.*, Vol. 61, 163 - 172 (1990).
- 51.- Huang Hong-Shian, Schoewald Ronald D. and Lach John L., Corneal penetration behavior of β -blocking agents II. Assessment of barrier contributions., *INT. J. OF PHARMA.*, Vol. 72, 1272 - 1278 (1983).
- 52.- Bellinger John f. and Buist Neil R.M., The separation of peptides from aminoacids by ligand-exchange chromatography., *J. OF CHROMA.* Vol. 87, 513 - 522 (1973).
- 53.- Scott R.P.W. and P. Kucera., Examination of five commercially available liquid chromatographic reversed phases (including the nature of the solute-solvent-stationary phase interactions associated with them), *J. OF CHROMA.*, Vol. 142, 213 - 232 (1977).
- 54.- Hawarth C., On study of the chromatographic properties of dipeptides by automatic ion-exchange chromatography., *J. OF CHROMA.*, Vol. 67, 315 - 323 (1972).
- 55.- Gerding M.H., Gerdina J.J.T., Kempen H.J.M. and Kempen B.J.M., A new highly sensitive detection system for peptides and proteins in column effluents., *J. OF CHROMATOGRAPHY.* Vol. 66, 115 - 152 (1972).
- 56.- Young Patricia M. and Wheat Thomas E., Optimization of high performance liquid chromatography peptide separations with alternative mobile and stationary phases., *J. OF CHROMATOGRAPHY.*, Vol. 512, 272 - 281 (1990).
- 57.- P.Galtier, M.Aluinerie, J.L.Sterner, P.T.Rancheteau, Y.Plasquellec and G.Hovin., Simultaneous pharmacokinetic modeling of a drug and two metabolites: Application to albendazole in sheep., *J. OF PHARMA. SC.*, Vol. 80 No. 1 (1981)
- 58.- Swarbrick James, Lee Geoffrey, Brom Jeffrey and Nigel P. Gensmantel. Drug permeation through human skin II. Permeability of ionizable compounds., *J. OF PHARMA. SC.*, Vol. 73 No. 10, 1352 - 1355 (1984).
- 59.- Ghanem Abdel-Halim, Mahmoud Hanaa, Higuchi William I., Uwe D. Rohs, et al. The effects of ethanol on the transport of β -estradiol and other permeants in hairless mouse skin II A new quantitative approach., *J OF CONT. REL.*, Vol. 6, 75-83 (1987).

- 60.- Ackermann, C and Flynn, G. Ether water partitionig and permeability through nude miceskin in vitro.I Urea, Thiourea, Glycerol and Glucose., INT. J. OF PHARMA., Vol.36, 61- 66 (1987).
- 61.- Behl, Cr., Kumar, S., Malick, AW., Del Terzo, S., Higuchi, W.and Nash,R.A., Iontophoretic drug delivery: Effects of physicochemical factors on the skin uptake of nonpeptide drugs., J. PHARM. SC., 78, 355-360 (1989).
- 62.- Jiahomg Liam and Joseph R. Robinson., The effect of polyethylene glycol molecular weight on corneal transporte and the related influence of penetration enhancers., INT. J. PHARM., 88 125- 140 (1992).
- 63.- Koizomi,t, Kakemi, M., Katuyama, K., Innada, H., Sudejk and Kawasaki., Transfer of diclofenac sodium across excised equivalent circuit model., M. CHEM. PHARM. BULL., 38,1019 - 1021 (1990).
- 64.- Siddiqui,O.; Roberts,M. and Polack, A.,Topical absortion of methotrexate: Role of dermal transport., INT. J. PHARM., 27, 193-203 (1985).
- 65.- Barker,N. and Hadgraft, J., Facilitated percutaneous absortion : A model system., INT. J. PHARMA., 8, 193- 202 (1981).
- 66.- Hoo Kyun Choi., Gordon L. , Flynn and Gordon L. Amidon. Percutaneous absorption and dermal delivery of Cyclosporin A. , J. Pharm. Sc., Vol. 84. , No. 5., 581-583 (1995).
- 67.- Vargas Yolanda M. y Obaya Adolfo., VELOCIDAD DE LAS REACCIONES QUÍMICAS., UNAM., FES- CUAUTITLÁN., México., 9-48, (1993).