

10524
//



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**



Departamento de
Exámenes Profesionales

**"ESTUDIO DEL EFECTO DEL PH SOBRE LA
ABSORCIÓN PERCUTÁNEA DE LIDOCAÍNA
UTILIZANDO LAUREATO Y OLEATO DE
SACAROSA COMO PROMOTORES DE
ABSORCIÓN"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
JENNYFER / CÁZARES DELGADILLO**

ASESOR: DRA. ADRIANA GANEM RONDERO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2003

A



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 esta 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**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E**

**ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

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

"Estudio del efecto del PH sobre la absorción percusiones de
Lidocaina utilizando leucato y oleato de sacarosa como pro-
motores de absorción"

que presenta la pasante: Jennyfer Cázares Delgadillo
con número de cuenta: 9753890-1 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido 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, Méx. a 14 de Marzo de 2003

PRESIDENTE L. Q. Rafael Sampedro Morales

VOCAL Dr. David Quintanar Guerrero

SECRETARIO Dra. Adriana Ganem Mondero

PRIMER SUPLENTE Q.F.I. Guadalupe Koizumi Castro

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy

B

DEDICATORIAS

Papá, te agradezco el haberme brindado tu apoyo incondicional, tu confianza y tu cariño; cada día de mi vida le doy gracias a Dios por haberme permitido ser tu hija.

Mamá, tu enorme comprensión y tu amor me han ayudado a salir adelante. Gracias a ti estoy aquí, gracias por haberme dado la vida

A mis hermanos y amigos les agradezco su compañía, su cariño, su lealtad y su amistad

Gracias a todos por ser parte de mi vida!

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de una manera muy especial a mi asesora Dra. Adriana Ganem Rondero, por su valiosa colaboración y al Dr. David Quintanar por permitirme realizar éste trabajo.

A mis sinodales Rafael Sampere, David Quintanar, Adriana Ganem, Guadalupe Koizumi y Beatriz de Jesús M. por sus aportaciones para la culminación de ésta tesis.

Al Ing. Draucín Jiménez del Taller de soplado de vidrio de la FES-C por su ayuda en la elaboración de las celdas de permeación.

A la sección de Microscopía Electrónica de la FES-C, en especial al Técnico Rodolfo Robles por su asistencia en las pruebas realizadas.

Finalmente quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, en especial a Miriam, Lupita, Zaida, David y Luis por el apoyo que me brindaron en la realización de este proyecto.

D

ÍNDICE

	Página
Índice de abreviaturas	I
Índice de figuras	III
Índice de tablas	V
Resumen	VI
I. Objetivo	I
II. Marco teórico	2
1. La piel, repaso anatómico – fisiológico	2
a) Epidermis	4
b) La dermis y la hipodermis	6
c) Los anexos cutáneos	7
2. Absorción percutánea	8
a) Barrera de permeabilidad y vías de penetración	8
b) Teoría de la difusión	9
b.1 Ley de Fick aplicada a una membrana	9
b.2 Celda de difusión tipo Franz	13
c) Factores fisiológicos que modifican la absorción percutánea	14
3. Caracteres fisicoquímicos de los fármacos	15
a) Constante de difusión	15
b) Concentración del principio activo	16
c) Coeficiente de reparto	16
d) Ionización del principio activo	17
e) Estado termodinámico y solubilidad	19

	Página
4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Capa Fina (HPTLC) como método de cuantificación	21
5. Promotores de absorción percutánea	24
5.1 Definición, características y clasificación	24
5.2 Mecanismo de acción de los promotores de absorción percutánea.	25
a) Alteración de los lípidos del estrato córneo	29
b) Alteración de las proteínas del estrato córneo	29
c) Incremento en la partición del fármaco	31
5.3 Co-solventes	32
5.4 Sucroésteres	33
a) Composición química	33
b) Características generales	34
c) Usos de los sucroésteres	35
d) Laureato de sacarosa: estructura, propiedades fisicoquímicas y mecanismo de acción	37
e) Oleato de sacarosa: estructura, propiedades fisicoquímicas y mecanismo de acción	38
6.0 Propiedades fisicoquímicas del Clorhidrato de Lidocaína	40
7.0 Propiedades fisicoquímicas del Transcutol®	41
III. Materiales y reactivos	42
IV. Metodología	43
A) Obtención de la piel	43
B) Determinación de la pureza de Clorhidrato de Lidocaína	44
C) Determinación de la solubilidad de Clorhidrato de Lidocaína en buffer de fosfatos	44
D) Determinación del coeficiente de partición de Clorhidrato de Lidocaína en buffer a pH 5.0, 7.0, y 9.0	45

	Página
E) Curva de calibración para Clorhidrato de Lidocaina	45
F) Método de permeación	46
G) Determinación de las condiciones para la extracción del principio activo retenido en la piel	47
H) Cuantificación de Clorhidrato de Lidocaina por HPTLC	48
I) Estudio de piel de cerdo por Microscopia Electrónica de Barrido	48
V. Resultados y análisis.....	49
VI. Conclusiones	69
VII. Perspectivas	69
VIII. Anexos	70
1. Resultados de pureza de Clorhidrato de Lidocaina y solubilidad del principio activo en buffer de fosfatos	70
2. Resultados de las curvas de calibración de Clorhidrato de Lidocaina..	72
3. Resultados de las permeaciones de Clorhidrato de Lidocaina sin promotor, con laureato de sacarosa y con oleato de sacarosa	79
IX. Referencias	109

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Abs	Absorbancia
o/w	Aceite/agua
AO	Ácido oleico
ABC	Área bajo la curva
HLB	Balance hidrofílico-lipofílico
C₁₂	Cadena hidrocarbonada de 12 carbonos
C₁₈	Cadena hidrocarbonada de 18 carbonos
C₁₈A9:10	Cadena hidrocarbonada de 18 carbonos con una insaturación entre los carbonos 9 y 10
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
CL	Clorhidrato de Lidocaina
r²	Coefficiente de correlación
e.v.	Coefficiente de variación
Kp	Coefficiente de permeabilidad
CMC	Concentración micelar crítica
Ka	Constante de acidez
HPTLC	Cromatografía de Alta Resolución en Capa Fina
TLC	Cromatografía en Capa Fina
DCMS	Decilmetilsulfóxido
desvest	Desviación estándar
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
AG	Energía de activación
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
SC	Estrato córneo
b	Intercepto
LS	Laureato de sacarosa
LCI	Límite de confianza inferior

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

LCS	Limite de confianza superior
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido
TEM	Microscopia Electrónica de Transmisión
α	Nivel de significancia
OS	Oleato de sacarosa
m	Pendiente
PCD	Piel cortada con dermatoma
PE	Piel entera
p.a.	Principio activo
PA	Promotores de absorción
soln.	solución
SE	Sucroésteres
T_m	Temperatura de transición
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

No. figura	Título	Página
1	Estructura de la piel	2
2	Capas de la piel	3
3	Esquema de la epidermis	6
4	Anexos de la piel	7
5	Perfil de absorción de una molécula que difunde a través de la piel humana intacta	10
6	Celda de difusión tipo Franz	14
7	Cambios de energía para un soluto en solución acuosa a través de la bicapa lipídica de una membrana biológica	21
8	Micro rutas de penetración de fármacos en el estrato córneo	27
9	Efecto de la composición sobre la fluidización de la bicapa lipídica del estrato córneo	30
10	Efecto del agua sobre el estrato córneo	31
11	Estructura química de los sucroésteres	33
12	Estructura química del laureato de sacarosa	37
13	Estructura química del oleato de sacarosa	38
14	Estructura química del Clorhidrato de Lidocaina	40
15	Estructura química del Transcutol ®	41
16	Curvas de calibración de Clorhidrato de Lidocaina ($\lambda_{\text{máx.}} = 265 \text{ nm}$), con membrana y sin membrana	52
17	Gráfico de los intervalos de confianza de las respuestas analíticas (ABC) en función de la cantidad de Clorhidrato de Lidocaina	56
18	Cinética de permeación de CL sin promotor a través de PE	58
19	Cinética de permeación de CL sin promotor a través de PCD ...	59
20	Relación entre el flujo de CL a través de PCD y el pH de la fase donadora	60

21	Cinética de permeación de CL con laureato de sacarosa a través de PCD	61
22	Cinética de permeación de CL con oleato de sacarosa a través de PCD	63
23a	Cantidad de p.a. retenido en el compartimiento receptor a las 8 hrs.	65
23b	Cantidad de p.a. retenido en la membrana a las 8 hrs.	65
24	Micrografías del estrato córneo de piel de oreja de cerdo sin tratamiento	66
25	Micrografía del estrato córneo de piel de oreja de cerdo tratada con Transcutol	67
26a	Micrografía del estrato córneo de piel de oreja de cerdo tratada con una soln. de LS al 2% en Transcutol	68
26b	Micrografía del estrato córneo de piel de oreja de cerdo tratada con una soln. de OS al 2% en Transcutol	68

ÍNDICE DE TABLAS

No. de tabla	Título	Página
1	Características de una HPTLC y una TLC	23
2	Lípidos del estrato córneo	26
3	Características fisicoquímicas del laureato de sacarosa	37
4	Características fisicoquímicas del oleato de sacarosa	38
5	Resultados de solubilidad del Clorhidrato de Lidocaina en buffer de fosfatos	49
6	Porcentaje teórico de la fracción no ionizada de Clorhidrato de Lidocaina	50
7	Coefficientes de partición de Clorhidrato de Lidocaina	51
8	Resultados de la regresión lineal de las curvas de calibración de Clorhidrato de Lidocaina sin membrana y con membrana	53
9	Límites de confianza de las muestras de Clorhidrato de Lidocaina.....	55
10	Límites de confianza para respuestas analíticas pronosticadas por la ecuación de regresión	56
11	Resultados de las pruebas de extracción del p.a. retenido en piel de cerdo	57
12	Influencia del pH sobre el flujo de CL a través de PCD	62
13	Influencia del pH y de los ésteres de sacarosa sobre la permeabilidad en piel del Clorhidrato de Lidocaina	64

RESUMEN

En la actualidad es de gran importancia promover la absorción de algunos compuestos a través de la piel, ya que ésta vía ofrece numerosas ventajas como sitio de liberación farmacológico.

En estudios recientes se ha visto que el éxito de los sistemas tópicos y transdérmicos depende de la habilidad del fármaco para permear la piel en suficientes cantidades, con el fin de lograr un efecto terapéutico efectivo. Sin embargo, muchos de los principios activos bajo investigación, no poseen las características fisicoquímicas necesarias (grado de ionización, solubilidad, estabilidad, coeficiente de partición) para penetrar en el tejido, por lo cual es de gran interés estudiar también aquellos compuestos que proporcionen un aumento en la absorción de éstos.

Los promotores de absorción, son compuestos químicos, farmacológicamente inactivos, pero con propiedades fisicoquímicas que permiten modificar la partición del fármaco e interactúan con los constituyentes del estrato córneo cuando se incorporan dentro de una formulación transdérmica, reduciendo de esta forma la resistencia de la piel a la difusión^{1,2}.

El principal problema con las formulaciones que contienen dichos promotores es que la irritación de la membrana limita severamente la aplicación clínica. Una posibilidad interesante es el empleo de ésteres de ácidos grasos y sacarosa, los cuales son considerados surfactantes no iónicos. La principal ventaja al utilizar *ésteres de sacarosa* como promotores de absorción es que se reduce la irritación de la membrana, con relación a otros surfactantes (sales biliares y alquilsulfatos), además de que proporcionan un grado de pureza específico y son completamente inofensivos. Estos compuestos se obtienen de la reacción entre la sacarosa y los ácidos grasos del C₁₂ al C₁₈: son cristales blancos o ligeramente amarillos, insípidos, no tóxicos y biodegradables, por lo que no causan contaminación ambiental; por el gran número de grupos hidroxilo que contiene la sacarosa y la afinidad de los ésteres por los lípidos, éstos compuestos actúan como un excelente puente entre el agua y las grasas.

El propósito de éste trabajo es comparar el efecto del pH sobre el flujo de Clorhidrato de Lidocaina a través de piel de oreja de cerdo y evaluar el efecto promotor del laureato y oleato de sacarosa sobre los componentes de la membrana. Se eligió el Clorhidrato de Lidocaina como modelo farmacológico por sus propiedades hidrofílicas (base débil) y porque ha demostrado tener una baja penetración a través del estrato corneo cuando se administra tópicamente.

El estudio de los sucroésteres y del pH sobre el flujo de éste principio activo ayudaría a crear mejores sistemas de aplicación transdérmica, de mayor efectividad y menor toxicidad, considerando a éstos compuestos como promotores de absorción potencialmente efectivos para ser incluidos en formulaciones transdérmicas.

I. OBJETIVO

- Estudiar el efecto del pH sobre el flujo del Clorhidrato de Lidocaina a través de piel de oreja de cerdo utilizando como promotores de absorción oleato y laureato de sacarosa, con la finalidad de contribuir al esclarecimiento del mecanismo de acción de éstos compuestos.

II. MARCO TEÓRICO

1. La piel, repaso anatómico - fisiológico

La piel es una barrera fisiológica importante y el revestimiento de protección por excelencia; es un tejido de protección flexible y elástico que recubre toda la superficie del cuerpo y representa aproximadamente el 5% del peso corporal. Es más o menos permeable a las sustancias químicas y puede, en determinadas ocasiones, franquear el paso a compuestos medicamentosos o nocivos que provocan la aparición de efectos terapéuticos o tóxicos, locales o sistémicos.³

La matriz de ésta membrana, está constituida por una doble capa lipídica discontinua en la que encajan, según una disposición ordenada las proteínas globulares; su grupo polar está situado en la superficie de la membrana en contacto con el medio acuoso sea intra o extracelular; el grupo no polar está vuelto hacia el interior⁴ (Figura 1).

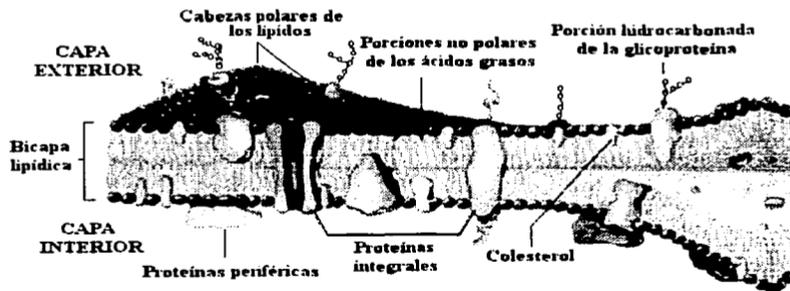


Figura 1: Estructura de la piel⁵

La piel está constituida por la superposición de tres capas distintas que del exterior al interior se denominan epidermis, dermis y tejido subcutáneo graso o hipodermis (Figura 2). La piel también contiene glándulas sudoríparas y estructuras pilosebáceas que nacen de

TESIS CON
FALLA DE OP.

la hipodermis o en la dermis y cuyos orificios, en la superficie, crean zonas de discontinuidad en la epidermis.

Al microscopio electrónico, la membrana simple aparece como una imagen tripartita asimétrica, de espesor variable entre los 70 y 100 Å formadas por dos capas oscuras de espesor desigual que encuadran una zona clara.

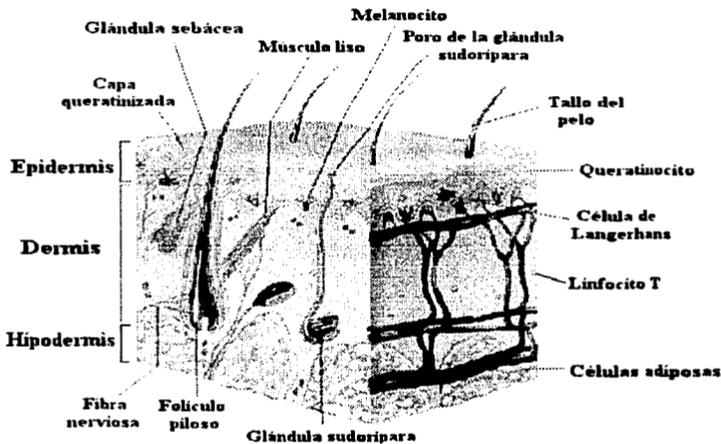


Figura 2: Capas de la piel ^{6,7}

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Las funciones que proporciona la piel son principalmente: ^{6,7}

- a) Protección: La piel es una barrera que se interpone entre el organismo y el medio ambiente. Controla la pérdida de fluidos, evita la penetración de sustancias extrañas, nocivas y radiaciones. Posee una capa ácida que protege su superficie de sustancias bacterianas o irritantes.

- b) **Sensación:** Ya que los estímulos que recibe los transmite al sistema nervioso central, los receptores sensitivos se encuentran en la dermis.
- c) **Secreción:** La piel secreta sebo y sudor; estas a su vez proporcionan propiedades antimicrobianas y antimicóticas que le permiten a la piel conservar su textura.
- d) **Termorregulación:** El flujo y contenido de la sangre en los vasos cutáneos regula la cantidad de calor disipado o conservado; dicho calor se pierde por procesos de conducción, convección, evaporación y radiación, siendo éstos regulados por la activación nerviosa y química de las glándulas sudoríparas y por la dilatación y constricción de los vasos sanguíneos.

a) La epidermis

La epidermis es un epitelio pavimentoso estratificado de un espesor medio de 200 μm cuyas células se diferencian desde el interior hacia la superficie por el proceso de queratinización. Se distinguen varias capas: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo (Figura 3).

- ***Estrato basal:***

La capa basal o estrato germinativo está formado por una única fila de células cúbicas de 6 μm de lado, apretadas unas contra otras y situadas sobre la membrana basal que separa la epidermis de la dermis. Esta capa celular posee una intensa actividad metabólica que conduce a la multiplicación de sus células. Se ha descrito por mucho tiempo como monomolecular, pero tanto en la epidermis de espesor normal como en la patológica, parece que la mitosis no está limitada únicamente a las células en contacto con la membrana basal.

Las células del estrato basal tienen núcleos grandes, al microscopio electrónico sus citoplasmas revelan muchos ribosomas, mitocondrias, y, a veces, membranas lisas. Especialmente, contienen numerosos tonofilamentos que se presentan principalmente en haces sueltos, las tonofibrillas.

- ***Estrato espinoso:***

Se le llama así porque sus células presentan una apariencia espinosa por lo numerosos desmosomas o placas de unión de sus superficies. Estudios ultraestructurales han revelado que se trata de estructuras laminadas. En la zona superior del estrato espinoso aparecen los gránulos recubridores de membrana o cuerpos lamelares de Odland, cuyo contenido es lipídico.

- ***Estrato granuloso:***

Contiene gránulos basófilos de una sustancia llamada queratohialina y es la continuación del estrato espinoso.

- ***Estrato lúcido:***

Se puede reconocer únicamente en la piel de las palmas de las manos y plantas de los pies.

- ***Estrato córneo (SC):***

Las células que lo forman son completamente aplanadas y llenas de queratina, en forma de haces de filamentos fijados en una sustancia opaca interfilamentosa. Las células córneas se desprenden continuamente de la superficie de la piel. En la transición entre el estrato lúcido y el estrato córneo, se reconocen las células de transición o las células T⁵.

Las células córneas se forman a partir de una fase de transición en donde las enzimas de los lisosomas se liberan y se destruyen los orgánulos celulares, excepto las tonofibrillas y la queratohialina. Una parte de los lípidos de los productos de hidrólisis y de los metabolitos solubles en agua permanecen incluidos en las células. Las proteínas globulares de los gránulos de queratohialina se liberan, se organizan alrededor de los filamentos de queratina alfa que provienen de la asociación de las tonofibrillas, formando algunos enlaces disulfuro y se asocian entre ellas para formar numerosos enlaces de la misma naturaleza. El conjunto constituye entonces una red de proteínas insolubles extremadamente densa y compacta. Simultáneamente, la membrana celular se espesa por depósito, en su cara interna, de un complejo glucoproteico.

Los estudios químicos han mostrado que la membrana, que representa 5% de la célula córnea, es el elemento de protección más eficaz, pues resiste a los agentes reductores queratolíticos, a la mayoría de las proteasas, a los compuestos alcalinos y a los ácidos.

Esta resistencia no sólo está asegurada por puentes disulfuro, sino también por otros elementos covalentes entre las moléculas. Los lípidos que se encuentran en el SC representan de 7 - 9 % de la masa total de tejido y están constituidos, sobretodo por ácidos grasos libres o estratificados y por colesterol que se encuentran emulsionados con el agua.

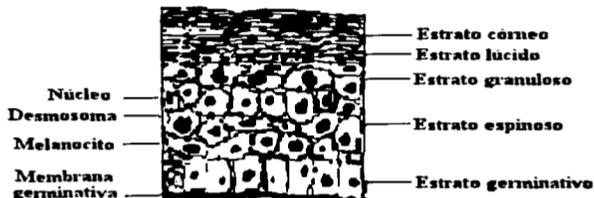


Figura 3: Esquema de la epidermis ⁹

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

b) La Dermis y la Hipodermis

La dermis es un tejido conjuntivo fibroso de un espesor medio de 3-5 mm, cuya función principal es la nutrición de la epidermis y apéndices cutáneos, además de servir como almohadilla del cuerpo frente a lesiones mecánicas.

Está formada por fibras de proteína con una sustancia amorfa fundamental que contiene mucopolisacáridos. Existen pocas células en la matriz; la mayor parte de ellas son fibroblastos que secretan los componentes dérmicos, otras son los mastocitos, histocitos o macrófagos, linfocitos y otros leucocitos y melanocitos. También alberga sistemas nervioso, linfático y sanguíneo, y rodea los apéndices epidérmicos invaginados, esto es, los folículos pilosos con sus glándulas asociadas y las glándulas sudoríparas eccrinas.

La hipodermis, que es un tejido conjuntivo flojo, contiene numerosos paniculos adiposos así como los glomérulos de las glándulas sudoríparas.^{4,6}

c) Anexos cutáneos

Los anexos de la piel son las estructuras pilosebáceas y las glándulas sudoríparas. Cada pelo proviene de una invaginación de la epidermis que se hunde en la dermis constituyendo la vaina epitelial externa del pelo. En su extremidad profunda se inserta, mediante su bulbo, sobre una papila muy vascularizada del tejido conjuntivo dérmico. La vaina epitelial interna rodea el pelo desde su raíz hasta el nivel de desembocadura de la glándula sebácea (Figura 4).

Las glándulas sebáceas están asociadas generalmente a un folículo piloso, excepto en algunas regiones desprovistas de pelo y están situadas a unos 500 μm de la superficie cutánea. Son glándulas exócrinas, de naturaleza holócrina que segregan el sebo. La parte secretora está formada por una membrana basal que está tapizada por una capa de células germinativas que evolucionan hacia el centro de la glándula cargándose de lípidos y perdiendo su núcleo. Los restos y el contenido de las células muertas se eliminan después de éste proceso a través de un canal excretor muy corto.⁴

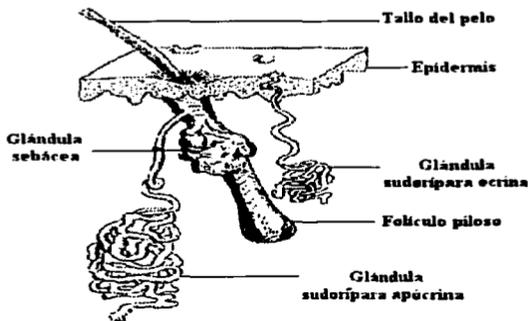
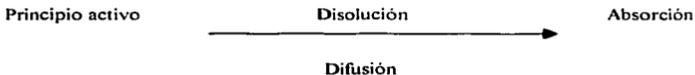


Figura 4: Anexos de la piel⁴

2. Absorción percutánea

Todo principio activo, para ser absorbido debe disolverse previamente, excepto en algunos casos, debido a que su velocidad de absorción está en función de su velocidad de disolución en los líquidos del organismo y de la velocidad de difusión de sus moléculas disueltas en éstos medios líquidos, hacia las paredes celulares, según el siguiente esquema:



Podemos definir la *absorción percutánea* de una sustancia como la suma de dos fenómenos que son, por una parte, su penetración desde el medio exterior hasta el seno de la piel entera y, por otra, su transporte a partir de las estructuras cutáneas, por la circulación sanguínea o linfática. El término *percutánea* indica que el paso se realiza a través de toda la epidermis y que la absorción puede tener lugar en los distintos niveles de la dermis.

La absorción de un principio activo depende básicamente de:

- Su velocidad de disolución en el medio biológico que baña las membranas
- Sus caracteres fisicoquímicos propios, capaces de influir en los modos de absorción (pKa, coeficiente de reparto, estabilidad, etc.). Esta aptitud del fármaco a ser más o menos absorbido se le llama "absorbilidad" y solo depende de sus propios caracteres fisicoquímicos.⁴

a) Barrera de permeabilidad y vías de penetración

Como sabemos, la epidermis está constituida por una doble capa: una barrera específica, identificada con el SC o con uno de sus elementos, siendo la causa de la gran impermeabilidad de la piel y una barrera subyacente, menos eficaz, formada por la dermis cuya permeabilidad es parecida a la de las otras membranas biológicas.



La piel es atravesada, al menos en pequeñas cantidades por numerosas sustancias químicas. La penetración de las moléculas del entorno hacia el interior del tegumento puede efectuarse por difusión a través del SC o bien por difusión en los conductos de las glándulas sudoríparas o de las estructuras pilosebáceas. La penetración de sustancias químicas a través de dichas estructuras está relacionada con la magnitud de su superficie respecto a la de la epidermis. Las sustancias difusibles, de bajo peso molecular y lipófilas, pueden penetrar rápidamente en el SC y en los lípidos contenidos en las glándulas sebáceas. Las sustancias poco difusibles penetran más rápidamente a través del sebo que a través del SC. Al principio, la vía transfolicular es mayoritaria, pero cuando se establece un gradiente de difusión en el SC, predomina la vía transdérmica.⁴

En la actualidad se han implementado diversas técnicas de visualización para determinar el mecanismo de la liberación transdérmica de fármacos. Las investigaciones de Microscopía Electrónica tanto de Barrido como de Transmisión (SEM, TEM), Microscopía de fluorescencia, Espectroscopía de infrarrojo (IR) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), han contribuido de manera importante con información ultraestructural acerca del transporte pasivo, particularmente, dentro del SC. El uso de compuestos fluorescentes ha permitido obtener información acerca de la distribución general de las sustancias aplicadas tópicamente a través de las estructuras de la dermis y epidermis.¹⁰

b) Teoría de la difusión.

b.1 Ley de Fick aplicada a una membrana

Como se ha demostrado desde las primeras investigaciones, sabemos que la mayoría de las moléculas se absorben a través de la piel por difusión pasiva. La velocidad de absorción a través del tegumento no es constante desde el inicio puesto que siempre se observa un periodo de latencia (Figura 5).

El periodo de latencia representa el tiempo necesario para la penetración de la sustancia al interior de las estructuras córneas y para el establecimiento de un gradiente de difusión.

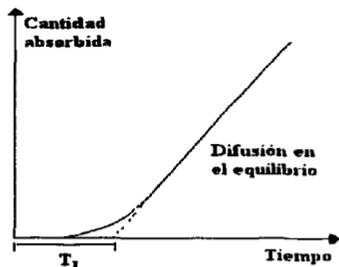


Figura 5: Perfil de absorción de una molécula que difunde a través de la piel humana intacta ⁴

Este tiempo es variable de un compuesto a otro; el periodo de latencia se determina por la extrapolación de la parte lineal de la curva sobre el eje de las abscisas (tiempos) y se expresa por la siguiente ecuación:

$$Tl = \frac{e^2}{6D} \quad (\text{ecuación 1})$$

donde Tl = periodo de latencia

e = espesor de la membrana

D = constante de difusión de la membrana en las estructuras cutáneas

Cuando se alcanza el equilibrio la cantidad de sustancia que abandona la membrana por su parte dérmica es igual a la que penetra en los estratos epidérmicos y la difusión está regulada por la ley de Fick:

$$\text{Velocidad de paso del principio activo} = \frac{dQ}{dt} = \frac{Km \cdot D}{c} S (C_1 - C_2) \quad (\text{ecuación 2})$$

a través de la membrana

dQ/dt = cantidad de sustancia absorbida por unidad de tiempo (flujo)

K_m = coeficiente de reparto membrana biológica / medio de disolución

D = coeficiente de difusión de la molécula del principio activo en la membrana

S = superficie de la membrana ofrecida a la disolución

e = espesor de la membrana

$C_1 - C_2$ = diferencia entre concentraciones a cada lado de la membrana

Al analizar esta ecuación se ponen en evidencia los factores que influyen sobre la absorción pasiva de los fármacos. Así, la velocidad de absorción es:

- Inversamente proporcional a "e", espesor de la membrana, factor sobre el que no se puede actuar.
- Proporcional a la superficie de la membrana "S" en contacto con aquella donde se encuentra el principio activo en solución; por lo tanto, cuando se quiere aumentar la absorción de un principio activo, se deberá incluirlo en una formulación que le permita estar en contacto con la mayor superficie posible de la mucosa absorbente.
- Proporcional a $(C_1 - C_2)$, es decir a la diferencia de concentración a ambos lados de la membrana; la difusión pasiva conduciría a un equilibrio y se anularía si el flujo sanguíneo no arrastrará el principio activo a medida que se absorbe, facilitando así el paso a través de la membrana. Si la zona donde se encuentra el fármaco que debe absorberse está más vascularizada, la absorción será más intensa. Asimismo, la velocidad de absorción aumenta con la concentración del p.a., siendo máxima en formulaciones saturadas.
- Proporcional a K_m , coeficiente de reparto de la sustancia entre la membrana biológica y el medio en el que se encuentra disuelta, en contacto con la membrana absorbente.
- La velocidad de paso a través de la membrana es proporcional a "D", coeficiente de difusión de la sustancia a través de dicha membrana. Esta velocidad depende de la liposolubilidad y del tamaño molecular del fármaco, aunque éste segundo factor es menos importante ⁴.

Debe señalarse que la aplicación de la ley de Fick a los estudios de permeabilidad cutánea solo pueden realizarse respetando ciertas condiciones: ⁴

- Flujo (dQ/dt) constante
- Integridad del tegumento respectivo
- Concentración C_1 (concentración en el donador) de la sustancia aplicada, pequeña y constante, a lo largo de todo el estudio
- Medio receptor en el compartimento dérmico renovado, no saturado

Según Higuchi, la ley de Fick puede escribirse:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{km * D * S * (C_1 - C_2)}{e} \quad (\text{ecuación 3})$$

donde km = coeficiente de reparto de la sustancia entre piel y el vehiculo.

La constante de permeabilidad se expresa como:

$$Kp = \frac{km * D}{e} \quad (\text{ecuación 4})$$

La constante de permeabilidad Kp caracteriza el poder de penetración de una sustancia a través de una membrana dada; será tanto más elevada cuanto mayor sea dicho poder. La constante de permeabilidad de una sustancia que difunde a través de todos los estratos de la piel es la resultante de varias constantes Kc , Ke , Kd , que son las constantes de permeabilidad del SC, la epidermis y la dermis, respectivamente.

Estas constantes se obtienen experimentalmente mediante estudios de permeabilidad. En general la constante de permeabilidad de la piel entera Kp es similar a la del estrato córneo Kc :

$$Kp = Kc = \frac{km_c * D_c}{e_c} \quad (\text{ecuación 5})$$

donde el subíndice c caracteriza la resistencia a la difusión del estrato córneo (SC).

b.2 Celda de difusión tipo Franz ^{11,12}

El objetivo de una experimentación *in vitro* en la liberación transdérmica es entender y/o predecir la liberación y penetración de una molécula a través de la superficie de la piel hacia el interior del cuerpo de un animal viviente. Generalmente, esto se lleva a cabo usando una variedad de celdas de difusión, las cuales son utilizadas dependiendo de la naturaleza del estudio, y siguiendo diversos protocolos experimentales.

Una celda de difusión consta de dos compartimientos, el compartimiento donador donde se coloca el p.a. en solución y el compartimiento receptor donde se coloca el solvente solo, ambos están separados por una barrera central a través de la cual el penetrante o soluto difundirá al solvente del compartimiento receptor.

Se recomienda que las celdas de difusión diseñadas cumplan con los siguientes requerimientos:

- a) Todos los materiales deben ser evaluados por su habilidad de absorber o adsorber el penetrante ensayado
- b) El compartimiento donador debe proporcionar:
 - Una fácil entrada para liberar el penetrante en la piel
 - Agitación constante (excepto en celdas verticales)
 - Temperatura controlada
 - Control de la evaporación para vehículos volátiles y penetrantes
- c) El compartimiento receptor deberá tener:
 - Temperatura controlada
 - Un flujo constante o bien, sistema totalmente estático
 - Suficiente volumen para mantener infinitamente las condiciones sink
- d) Fluido del receptor
 - No deberá comprometer la función de la barrera
 - Deberá tener características favorables de partición para recibir al penetrante
 - Deberá ser capaz de mantener la viabilidad de la epidermis

Actualmente, los estudios de liberación transdérmica *in vitro* son conducidos en celdas de difusión vertical tipo Franz (Figura 6), ya que son fáciles de ensamblar y limpiar, mejoran la visibilidad de los líquidos y la rotación del agitador, además de estar condicionadas para controlar la temperatura. Estas celdas permiten simular lo que ocurriría en condiciones reales de aplicación, pues en el donador pueden colocarse no sólo soluciones, sino cualquier formulación o sistema de liberación tópico o transdérmico, lo cual no es posible con las celdas horizontales.

Dichas celdas están hechas de vidrio Pyrex y consisten en dos partes, una cámara donadora y una receptora. Ambos compartimientos son ensamblados por unas pinzas metálicas. El líquido en el receptor es agitado por una barra magnética cubierta de teflón. Este dispositivo se sumerge en un baño de agua de temperatura constante y las muestras son removidas periódicamente y ensayadas por métodos apropiados.

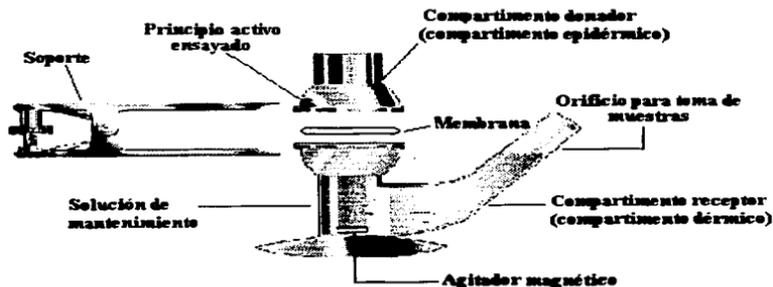


Figura 6: Celda de difusión tipo Franz

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

c) Factores fisiológicos que modifican la absorción percutánea ⁴

- *Estado y edad de la piel*

La piel intacta es una barrera de difusión cuya eficacia disminuye por la alteración o destrucción de las células cornoas. El tratamiento de la superficie cutánea con disolventes orgánicos provoca grandes modificaciones de la resistencia del tegumento a la difusión de los tensoactivos. La superficie cutánea tratada de ésta forma pierde sus lípidos y la delipidación del estrato córneo conduce a la disminución de su resistencia a la difusión. La difusión cutánea varía así mismo con la edad de los individuos; la piel de los niños prematuros es más permeable que la de los adultos.

- *Flujo sanguíneo*

Para la mayoría de los casos, el SC es el factor limitante de la absorción y el flujo sanguíneo siempre es suficiente para arrastrar el principio activo a medida que penetra. Sin embargo cuando la piel está dañada las cantidades son mucho mayores y el papel del flujo sanguíneo es fundamental.

- *Lugar de aplicación*

Las variaciones del espesor de la membrana, de acuerdo con la ley de Fick conducen, por una parte, a un aumento del período de la latencia necesario para el establecimiento del equilibrio del gradiente de concentración en la capa córnea y por otra, a una disminución del flujo de absorción si el espesor aumenta.

- *Hidratación*

El efecto de la hidratación es incrementar el volumen del SC disminuyendo su intensidad y su resistencia a la difusión. El agua favorece la aparición de una doble red estable de regiones polares (ricas en agua) y zonas no polares (ricas en lípidos).

3. Caracteres fisicoquímicos de los fármacos ⁴

a) Constante de difusión

La constante de difusión de una molécula a través de una membrana corresponde a la resistencia que opone el entorno a sus desplazamientos. Es una magnitud física característica de la sustancia y de la membrana. Relacionada con los movimientos

brownianos, es función de la masa molecular del compuesto y de sus interacciones químicas con los constituyentes de la membrana, así mismo depende de la viscosidad del medio y de la temperatura.

La ley de Stokes-Einstein es la que da el verdadero valor a la constante de difusión, las moléculas de masa molecular baja difunden más rápidamente que las de masa molecular elevada a menos que no se unan con los constituyentes de la membrana. En éstas condiciones, los niveles de absorción deberán ser inversamente proporcionales a las masas moleculares.

b) Concentración en principio activo

Las cantidades de principio activo absorbidas por unidad de superficie y tiempo, son proporcionales a la concentración de fármaco en el vehículo.

Cuando se aplican concentraciones elevadas de principio activo a la superficie de la piel, la ley de Fick no puede ser respetada como consecuencia de una modificación de la estructura de la membrana, que provoca la elevada concentración de principio activo o bien, debido a la existencia de una variación del coeficiente de reparto de éste último entre el vehículo y la barrera cutánea.

Por otro lado, una elevada concentración de principio activo en la formulación incrementará el flujo, alcanzando el máximo flujo cuando se tiene una formulación saturada, debido a que se presenta la máxima actividad termodinámica.

c) Coeficiente de reparto

Los coeficientes de reparto o de distribución se determinan, en general, experimentalmente entre los componentes de mezclas bifásicas constituidas por agua y por disolventes orgánicos no miscibles con ella: aceite vegetal, cloroformo, octanol, benceno, éter y miristato de isopropilo que representan la membrana biológica lipófila.

En el equilibrio de reparto entre las dos fases, el coeficiente de reparto se expresa mediante la ecuación siguiente:

$$C_p = \frac{C_l}{C_A} \quad (\text{ecuación 6})$$

Donde C_L y C_A son las concentraciones de la molécula en la fase lipídica y en la fase acuosa respectivamente.

La única medida objetiva de la distribución de la sustancia absorbida entre el tejido y el excipiente es la determinación del coeficiente de reparto entre fragmentos del estrato córneo y el vehículo.

El coeficiente de reparto SC/vehículo se determina cuando se alcanza el equilibrio de reparto de la molécula, aunque a éste estado solo se llega después de un periodo de contacto prolongado entre el tejido córneo y el excipiente.

Un coeficiente de reparto elevado demuestra la poca afinidad del fármaco estudiado por su vehículo, un coeficiente de reparto cercano a la unidad indica que la molécula se reparte de manera muy parecida entre el estrato córneo y el excipiente y, por último, un coeficiente de reparto pequeño demuestra que el principio activo presenta una gran afinidad por su vehículo y no puede difundir en el estrato córneo.

La solubilidad de los productos en su excipiente influyen mucho sobre el coeficiente de reparto.

El valor del coeficiente de reparto no solo corresponde a la solubilidad relativa del fármaco en las estructuras córneas sino que refleja así mismo su fijación, más o menos reversible, a los componentes de la membrana. Las posibilidades de difusión a través de la membrana no están favorecidas necesariamente por un coeficiente de reparto muy elevado; de hecho, cuando la lipofilia es muy grande, la sustancia se acumula en la capa córnea que es incapaz de abandonar para difundir hacia la epidermis y la dermis.

d) Ionización del principio activo

La mayoría de los principios activos son bases o ácidos orgánicos, que en solución están en parte bajo su forma ionizada y parte bajo su forma no ionizada. Ahora bien, si el tamaño de la molécula no le permite pasar por los canales de la membrana, la fuerte polaridad de la forma iónica se opone a la difusión a través de la membrana, de forma que solo la fracción no ionizada liposoluble puede franquear la membrana por difusión pasiva.

La importancia de los factores que intervienen en la difusión a través de la membrana de tales moléculas (grado de ionización de la molécula, pH de los

compartimentos) se pone de manifiesto en la Teoría de la difusión no iónica o “hipótesis de reparto por pH”.

Numerosos principios activos son electrolitos orgánicos débiles cuya ionización depende del pH del medio de liberación y de disolución, así como de las constantes de disociación de éstos fármacos.

Para cuantificar lo dicho hasta el momento recordemos que:

Para un ácido débil:

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]} \rightarrow pK_a = -\log K_a \quad (\text{ecuación 7})$$

Para una base débil:

$$K_b = \frac{[B^+][OH^-]}{[BOH]} \rightarrow pK_b = -\log K_b \quad (\text{ecuación 8})$$

Actualmente se habla asimismo del pKa para las bases, considerando el pKa del ácido conjugado (teoría de Brønsted):

$$pK_a \text{ de una base} = 14 - pK_b \quad (\text{ecuación 9})$$

Las fracciones no ionizadas en función del pH y por tanto absorbibles, vienen dadas por las ecuaciones siguientes:

Para un ácido débil:

$$\frac{1}{1 + 10^{pH-pK_a}} \quad (\text{ecuación 10})$$

Para una base débil:

$$\frac{1}{1 + 10^{pK_a-pH}} \quad (\text{ecuación 11})$$

Asimismo es necesario señalar que la hidrosolubilidad también está en función de la ionización de las sustancias. Para los medicamentos en los que los principios activos son sales de ácidos o de bases fuertes, la ionización elevada es un obstáculo a su difusión a través de las membranas. Por el contrario, para los electrolitos débiles, sales de ácidos o de bases débiles poco ionizados, la difusión a través de la membrana dependerá de la liposolubilidad de la forma no ionizada, así como de la cantidad de forma no ionizada (única que interviene en el gradiente de concentración), es decir, el grado de ionización de la molécula.

El grado de ionización de la molécula depende de dos factores, relacionados por la ecuación de Henderson-Hasselbach:

- La constante de disociación de la sustancia o pKa (pH en el cual la concentración de forma iónica es igual a la concentración de forma no iónica)
- El pH del medio donde se encuentra la molécula y que puede ser diferente a un lado y al otro de la membrana

Para los ácidos,
$$pH = pKa + \log \frac{\text{concentración forma iónica}}{\text{concentración forma no iónica}} \quad (\text{ecuación 12})$$

Para bases,
$$pH = pKa + \log \frac{\text{concentración forma no iónica}}{\text{concentración forma iónica}} \quad (\text{ecuación 13})$$

La necesidad de la existencia de una cierta lipofilia en la molécula implica que la forma ionizada de los fármacos no podrá ser absorbida por difusión pasiva a través de la membrana.

e) Estado termodinámico y solubilidad

Para la mayor parte de los fármacos, la intensidad de la absorción se encuentra limitada por la impermeabilidad de la piel. Es necesario, por tanto, que las sustancias

aplicadas sobre la piel tengan la mayor actividad termodinámica posible para que las cantidades absorbidas sean máximas.

Higuchi ha observado que la fuerza que permite la difusión de las moléculas es la diferencia de los potenciales termodinámicos que existe entre el excipiente y las estructuras córneas, el flujo se establece siempre desde una zona de potencial termodinámico elevado hasta una zona de potencial menor. El coeficiente de reparto del principio activo, entre el vehículo y el estrato córneo, puede expresarse así mismo en función de los coeficientes de actividad termodinámica:

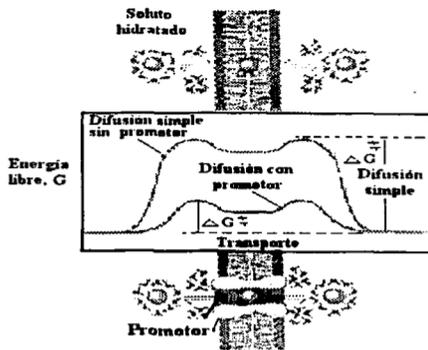
$$K_m = \frac{\gamma_v}{\gamma_s} \quad (\text{ecuación 14})$$

donde γ_s = coeficiente de actividad termodinámico de la sustancia en el estrato córneo

γ_v = coeficiente de actividad de la sustancia en el vehículo

El coeficiente de reparto y la biodisponibilidad pueden modularse mediante la elección de los excipientes; para una concentración dada de principio activo, la actividad termodinámica puede variar según la composición y concentración del vehículo.

En la Figura 7 podemos observar los cambios de energía que ocurren cuando un soluto (fármaco) pasa a través de la bicapa lipídica de una membrana biológica. Se puede observar que la energía de activación (ΔG) es muy elevada cuando el soluto hidratado penetra en la membrana por difusión simple; sin embargo cuando se utiliza algún promotor, esta ΔG disminuye, por lo tanto también se reduce el tiempo en el cual la membrana transporta el soluto.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 7: Cambios de energía para un soluto en solución acuosa a través de la bicapa lipídica de una membrana biológica (Figura modificada de 5)

Este es el caso de algunos cosolventes o promotores utilizados en la permeación de diversos fármacos. En un estudio previo realizado con ácido oleico a través del estrato córneo se demostró que la mayor cantidad liberada de éste ácido graso fue obtenida cuando se utilizó una solución de Etanol al 40%, se observó una disminución de la T_m (Temperatura de transición), lo cual indica que se trata de un efecto sinérgico entre el ácido oleico y el etanol. Se piensa que el sinergismo entre algunos promotores como etanol y transcutoi mejoran la solubilidad de algunos penetrantes en la membrana ¹³.

4. Cromatografía de Alta Resolución en Capa fina (HPTLC) como método de cuantificación ¹⁴

La cromatografía en capa fina (TLC) es una de las técnicas más usadas para la separación e identificación de fármacos.

Este método es aplicable para fármacos en estado puro, para formulaciones farmacéuticas y para muestras biológicas.

El método consiste en una fase móvil y una estacionaria; la primera se mueve por capilaridad a través de una placa uniforme y delgada, para finalmente separar los diversos componentes de la muestra sobre la fase estacionaria. Cuando una mezcla de fármacos es aplicada sobre la placa y desarrollada con la fase móvil, los fármacos se mueven a través de la placa en diferentes proporciones dependiendo de sus solubilidades, de sus valores de pKa y capacidad de enlaces de hidrógeno para después ser separados convenientemente.

La disposición de nuevos materiales, métodos e instrumentación en los últimos 10 años ha tenido grandes adelantos, por lo cual la TLC se puede estudiar como HPTLC. Las placas para HPTLC ofrecen mejores resultados comparadas con el tipo convencional, tienen partículas más pequeñas (2-7 μm), lo cual hace que sea aún más rápido, más reproducible, más sensitivo y más exacto para trabajos de cuantificación.

El crecimiento ha sido rápido en éste campo gracias al uso de dispositivos automatizados para aplicación de muestras y densitómetros precisos.

Actualmente está siendo difundida el uso de ésta técnica con fines cuantitativos ya que es posible realizar análisis con resultados tan buenos como los obtenidos por HPLC.

La HPTLC presenta diversas ventajas:

- La preparación de la muestra antes de la aplicación suele ser más sencilla, pues frecuentemente no es necesario remover aditivos u otras impurezas, ya que las placas se usan una sola vez.
- No hay restricción en cuanto a la elección de la fase móvil (pueden usarse solventes de baja transparencia al Ultravioleta (UV), pues estos son evaporados antes de la detección).
- No es necesario eluir los componentes para detectarlos. Todos los componentes se detectan sobre la placa.
- Es posible correr muchas muestras al mismo tiempo (en una placa de 20 cm de largo pueden correrse hasta 70 muestras).
- Bajo costo (utiliza aproximadamente el 5% del solvente con respecto al HPLC).

A continuación se muestran algunas ventajas de HPTLC sobre TLC:

Tabla 1: Características de una HPTLC y una TLC ¹⁴

Condiciones típicas	TLC	HPTLC
Dimensiones de la placa (cm)	Diferentes dimensiones	
Tamaño de partícula (sílica) (µm)	Aprox. 20	Aprox. 5
Grosor de la capa (µm)	100-250	150-200
Volumen de muestra (µl)	1-10	<0.1
Diámetro de la mancha antes el corrimiento (mm)	<4	<1.5
Diámetro de la mancha después del corrimiento (mm)	5-10	2-5
Distancia de corrimiento (cm)	10-15	3-6
Tiempo de corrimiento (min.)	30-120	5-15
Número de muestras por placa	10-15	30-40
Límite de detección (absorción)* (µg)	10-100	0.5-5
Límite de detección (fluorescencia)* (µg)	0.1-1.0	0.01-0.1
Reproducibilidad de valores Rf	Aprox. 3%	Aprox. 1%
Reproducibilidad de cuantificación	Aprox. 5%	Aprox. 2-3%

* Para fármacos fuertemente absorbentes o fluorescentes

5. Promotores de absorción percutánea

5.1 Definición, características y clasificación

Los promotores de absorción (PA) han sido descritos como compuestos químicos, farmacológicamente inactivos, pero con propiedades fisicoquímicas que permiten remover reversiblemente la barrera resistente del SC, ayudando a los fármacos a penetrar más rápidamente en los tejidos, para actuar de manera local o sistémica.^{1,2}

Un promotor de penetración percutánea idealmente debe cumplir con las siguientes características:¹⁵

- Debe ser farmacológicamente inerte y no presentar acción sobre los sitios receptores de la piel, o el cuerpo en general
- No debe ser tóxico, irritante o alérgico
- Después de su aplicación, el inicio de la acción debe ser inmediato y la duración debe ser predecible
- Cuando el promotor es removido de la piel, el tejido debe recuperar completa e inmediatamente su propiedad normal de protección
- La función protectora de la piel debe reducirse sólo en una dirección
- Debe ser compatible física y químicamente con una gran variedad de fármacos y adyuvantes farmacéuticos
- Debe ser un excelente solvente para fármacos
- Debe extenderse muy bien sobre la piel y ser cosméticamente aceptable
- Debe ser formulado en lociones, suspensiones, cremas, geles, aerosoles, ungüentos y sistemas adhesivos de la piel
- Debe ser una sustancia inodora, incolora, insípida y económica

Los PA pueden clasificarse por su naturaleza química en solventes, surfactantes y otros. Dentro de los más comúnmente utilizados se encuentran los siguientes: ^{16,17}

Solventes:

- ✓ Agua
- ✓ Sulfóxidos : dimetilsulfóxidos, decilmethylsulfóxidos
- ✓ Alcoholes : etanol, propanol, butanol
- ✓ Polioles: propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, propanodiol
- ✓ Amidas: derivados de pirrolidonas
- ✓ Laurocapram: Azona

Surfactantes:

- ✓ Aniónicos: alquilsulfatos (lauril sulfato de sodio)
- ✓ Catiónicos: bromuro de cetiltrimetil amonio, Cloruro de docetiltrimetil amonio,
- ✓ No iónicos: Poloxámeros, Brij[®], Span[®], Tween[®]
- ✓ Sales biliares: taurocolato de sodio, glicolato de sodio, ácidos desoxicólicos
- ✓ Ácidos grasos: heptanóico, capríco, láurico, cáprico, mirístico, esteárico, oleico
- ✓ Esteres de ácidos grasos: n-isopropil hexanoato, isopropil miristato

Otros:

- ✓ Amidas: Urea, dimetilacetamida, dimetiltoluamida, dimetilformamida
- ✓ Terpenos: hidrocarburos, alcoholes (α - terpenol), óxidos, aceites (eucaliptol, anís)
- ✓ Alcanos: N-heptano, N-octano, N-nonano
- ✓ Ácidos orgánicos: ácido salicílico y salicilatos, ácido cítrico, ácido succínico

5.2 Mecanismo de acción de los promotores de absorción cutánea

Como se mencionó anteriormente, el estrato córneo está formado por matrices proteínicas citoplásmicas (queratina) insertadas en lípidos extracelulares; en el ser humano la estructura lipídica está formada por esfingolípidos, fosfolípidos, etc. (Tabla 2).

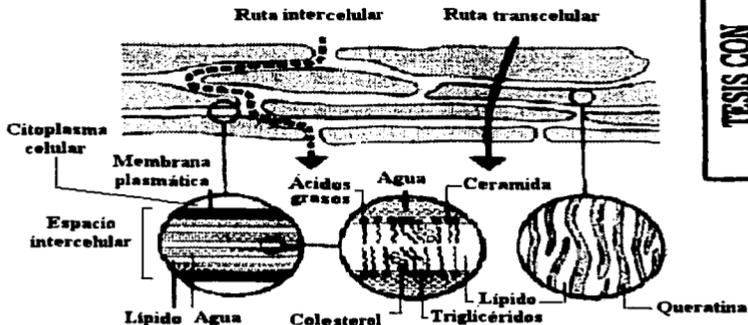
Tabla 2: Lípidos del estrato córneo ¹⁷

Tipo de lípido	Cantidad (% w)		
Lípidos neutros	64.6	56.5	60.0
Esteroles libres	14.0	11.0	30.0
Ésteres de esteroles	6.1	18.0	
Ácidos grasos libres	19.3	16.5	20.0
Triglicéridos	25.2	11.0	10.0
Esfingolípidos	18.1		
Glicoesfingolípidos	2.6		
Ceramidas	15.5	43.0	40.0
Fosfolípidos			
Región	Abdomen	brazo	Pierna

Por estudios previos, utilizando TLC, se sabe que los promotores afectan la estructura de la bicapa, disminuyendo la rigidez y facilitando la difusión del fármaco¹⁷.

Los PA actúan directamente en los espacios intercelulares del estrato córneo, que es la mayor ruta de difusión para los fármacos de naturaleza lipofílica¹³. Se cree que los promotores podrían interactuar con la cabeza polar de los grupos lipídicos dentro de la región acuosa, entre las cabezas lipídicas y los tallos hidrofílicos de la bicapa. Tal es el caso de los promotores no polares¹⁸.

Asimismo, se ha visto que existe otra microrruta de acceso en el estrato córneo llamada transcelular en donde los promotores pasan a través de células proteicas y cruzan regiones lipídicas; estos pueden interactuar con grupos polares y alterar la conformación de las hélices de queratina. Los promotores que siguen esta ruta son los solventes apróticos como pirrolidonas y surfactantes (Figura 8)¹.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 8: Microrutas de penetración de fármacos en el estrato córneo ¹

Para poder entender los posibles mecanismos de acción de los PA es importante tomar en cuenta algunas características fisicoquímicas de éstos compuestos.

En estudios realizados con ácidos grasos se ha encontrado que la magnitud de la promoción de penetración está relacionada con la *estructura del compuesto*, es decir, con la posición de los *dobles enlaces*, los tipos de *isómeros (cis o trans)*, el *grado de ionización* y la *longitud de la cadena*. Se ha visto que la cadena lineal alquílica de 12 átomos de carbono (C_{12}) - maximiza el efecto de un surfactante sobre la permeabilidad de la membrana. La cadena C_{12} tiene una solubilidad intermedia entre aceite/agua y por lo tanto, puede penetrar en la bicapa lipídica^{19,20}. Para una serie de éteres de polioxietileno, el éter laúrico (C_{12}) demostró ser un promotor más efectivo para el ibuprofeno, que el éter oleico (C_{18})¹⁹.

A pesar de que la mayoría de los compuestos con C_{18} han sido reportados como promotores poco eficaces, el ácido oleico (AO) presenta un comportamiento distinto, tal

vez debido a que es uno de los ácidos grasos *cis*-insaturados ($C_{18}\Delta 9:10$); probablemente, la inserción heterogénea de ácidos grasos *cis*-insaturados acentúe el desorden de los lípidos dentro de la membrana, pues el doble enlace produce una flexión pronunciada dentro de la cadena hidrocarbonada, previniendo la formación de cristales compactos bien ordenados y, por lo tanto, induciendo a una fase de separación, lo cual reduciría la resistencia de la membrana^{21,22}.

En un estudio realizado por IR donde se trató el SC con ácidos *cis*-octadecenoicos, con el sitio de insaturación localizado en la parte central de la estructura, (ej. AO), se observó un cambio a una frecuencia más alta y un ensanchamiento de las señales asociadas a los lípidos. El cambio en la frecuencia de estrechamiento C-H está relacionada con la formación de *conformers* en la cadena alquílica, los cuales crean espacios dentro de los lípidos hidrocarbonados, favoreciendo probablemente el paso de los fármacos a través de ellos^{23,24}. En un estudio anterior a éste se demostró que los ácidos grasos con cadenas alquílicas de C_{18} que poseen enlaces *cis*-insaturados localizados en las posiciones 9:10 o 10:11 pueden acentuar el desorden dentro de los lípidos aún más que los que contienen insaturaciones en otras posiciones²⁵.

Otra característica fisicoquímica importante es el grado de ionización de la molécula; en un estudio de Fluorescencia realizado con liposomas (hechos a base de lípidos de) se observó que el cambio conformacional de los lípidos fue inducido por la forma no disociada de los ácidos grasos. Aparentemente la forma no ionizada del ácido graso tiende a fluidizar la bicapa lipídica. Este efecto se atribuye a la interacción entre los ácidos grasos y otros componentes lipídicos, los cuales difieren por la forma ionizada y no ionizada del ácido graso. Esto sugiere que la ausencia de una carga eléctrica permite la distribución de la forma no disociada del ácido graso en la bicapa lipídica, con un cambio en las interacciones locales de Van der Waals²⁶.

Hasta el momento, no se sabe con certeza los mecanismos exactos por los cuales los promotores de penetración llevan a cabo dicha función, sin embargo, para describirlos podemos tomar en cuenta los efectos que ya han sido documentados.^{1,2}

- a) *La alteración de los lípidos del estrato córneo*
- b) *La alteración de las proteínas del estrato córneo*
- c) *El incremento en la partición del fármaco dentro de los tejidos*

a) Alteración de los lípidos del estrato córneo

En estudios recientes se ha visto que la promoción que se observa al aplicar un promotor es proporcional al incremento de fluidización de la estructura lipídica²⁷.

Los estudios realizados por DSC han mostrado un gran incremento en la fluidización lipídica cuando se utilizan ácidos grasos *cis*-insaturados, pues se observa una reducción en la T_m asociada con los lípidos intercelulares entre 60-65 °C y 70-75 °C; se piensa que éstos dobles enlaces previenen la formación de cristales bien ordenados^{23,28}. Cuando se incluyen ácidos grasos en la membrana lipídica del SC se puede afectar la estructura lamelar al formar puentes de hidrógeno, entre el grupo carboxilo de los ácidos grasos y el grupo fosfato de los fosfolípidos²⁹. El efecto de la fluidización de la bicapa lipídica se observa en la Figura 9.

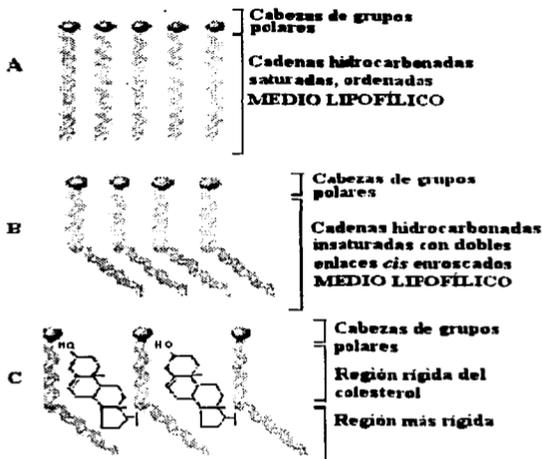
Otro posible mecanismo de penetración es la extracción de lípidos intercelulares. La extracción lipídica es el modo más aceptado para el etanol²⁹.

En un experimento realizado con mucosa oral queratinizada y etanol se observó que la presencia del etanol no solo disminuye la hidratación de la membrana, sino que también puede cambiar la interacción entre los lípidos y las proteínas, influyendo quizá en la extracción de algunos grupos lipídicos³⁰.

b) Alteración de las proteínas del estrato córneo

Un promotor actúa a nivel proteico interactuando con la queratina, cambiando la configuración proteica y abriendo canales de agua dentro del corneocito. Algunos de los promotores al interactuar con proteínas intracelulares solvatan el contenido celular, desplazan la unión del agua, expanden la estructura y compiten con el fármaco por sitios de unión con el hidrógeno.

Dentro de los promotores que actúan a nivel proteico se encuentran algunos *surfactantes aniónicos* como el dodecilsulfato de sodio (DSS), y algunos *solventes* como dimetilsulfóxido (DMSO), decilmetilsulfóxido (DCMS) y dimetilformamida (DMF).¹⁸



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

- A:** cadenas de ácidos grasos saturados empaçadas de manera compacta
- B:** enroscaduras debidas a los dobles enlaces *cis*, dilatando la estructura
- C:** moléculas esteroides de colesterol en forma de platos, interactuando con una región de cadenas hidrocarbonadas en parte inmobilizadas, muy cerrada en la región de grupos de cabezas polares

Figura 9: Efecto de la composición sobre la fluidización de la bicapa lipídica del estrato córneo (Figura modificada de 1)

c) Incremento en la partición del fármaco

Sabemos que algunos promotores pueden acumularse en las regiones intercelulares y proteicas del tejido y su presencia puede incrementar la partición del fármaco en la piel, incrementando el flujo. Dentro de los promotores que actúan de ésta forma están el dimetilsulfóxido (DMSO), las pirrolidonas (amida), el propilenglicol (poliol) y el etanol.

El contenido intracelular y los puentes de hidrógeno entre los grupos le dan solidez e impiden el transporte de fármacos; esto ha sido reportado para tejidos secos. En cambio, en tejidos hidratados la región intracelular es más fluida, es decir, la hidratación produce cambios en la estructura del estrato córneo; por lo tanto, el agua compete por los sitios de unión con hidrógeno, disminuyendo la barrera de difusión¹⁸ (Fig. 10). Por lo tanto algunos materiales como el propilenglicol ejerce acción sobre las proteínas, siendo más efectivo en condiciones hidratadas.

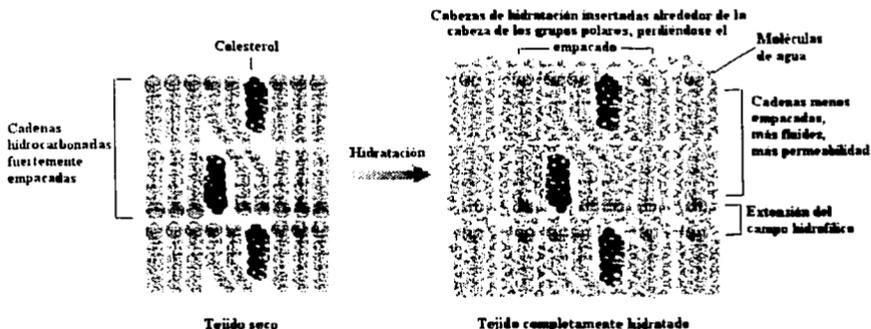


Figura 10: Efecto del agua sobre el estrato córneo (Figura modificada de 1)

5.3 Co-solventes

Es importante tomar en cuenta que, junto con los promotores, la penetración de fármacos puede ser favorecida utilizando co-solventes, ya que éstos promueven la absorción de los promotores (ej. surfactantes) dentro de la piel. Actualmente, se piensa que la función de éstos es la de disminuir la polaridad de la región acuosa e incrementar su capacidad de solubilidad para materiales lipídicos, así como alterar el empaquetamiento de los grupos de cabeza lipídica.

Es probable que la presencia de un co-solvente también pueda ocasionar un cambio en la solubilidad del fármaco, alterando su actividad y consecuentemente el coeficiente de partición piel/vehículo.

Sarpotdar y *Zatz* demostraron que el propilenglicol actúa como un buen co-solvente para los polisorbatos (surfactantes) en la permeación de Lidocaina a través de piel, ya que al aumentar la concentración del mismo, aumentaba el flujo del fármaco a través de la membrana, y por lo tanto, se reducía la tendencia del p.a. a la partición dentro del estrato córneo³¹.

En algunos estudios realizados con SC, se ha reportado que la penetración de Transcutol quizá pueda alterar temporalmente las propiedades de la barrera, reemplazando las moléculas de agua en el tejido^{32,33}. La presencia del transcutol en la región interfacial tiende a minimizar la energía libre durante la partición, promoviendo en ésta forma la absorción del fármaco^{34,35,36}.

El transcutol, en particular, ha demostrado tener una gran influencia en la proporción de penetración de algunos fármacos principalmente cuando se combina con otros promotores^{24,37,35}. En un estudio *in vivo* realizado en piel humana se observó que la penetración del 4-hidroxibenzoitrilo 4-(HB) fue incrementada por la presencia de surfactantes no iónicos (oleato y laureato de sacarosa). Aparentemente, los ésteres de azúcar y el Transcutol interactúan sinérgicamente para modificar la barrera de la piel. Este efecto fue particularmente evidente para las formulaciones por debajo de la concentración micelar crítica (CMC 3%)³⁸.

Es muy importante tomar en cuenta que el transcutol no puede ser utilizado como promotor cuando se trata de principios activos que presentan una mayor afinidad por los

componentes intercelulares, ya que es probable que se forme un depósito intercutáneo del fármaco^{37,39}.

5.4 Sucroésteres (SE)

Los PA comúnmente utilizados en la aplicación transdérmica son surfactantes iónicos y surfactantes no iónicos. El principal problema con las formulaciones que contienen éstos promotores es que la irritación de la membrana limita severamente la aplicación clínica. Generalmente, tanto los surfactantes aniónicos como catiónicos promueven más que los surfactantes no iónicos, pero estos también son considerados altamente tóxicos ya que pueden dañar la barrera de permeabilidad en bajas concentraciones.

Una posibilidad interesante es el empleo de ésteres de ácidos grasos y sacarosa, los cuales son considerados surfactantes no iónicos. Una de las ventajas de utilizar SE como promotores de absorción es reducir la irritación con relación a otros promotores, tales como sales biliares y alquilsulfatos. Siendo no irritantes de la piel y mucosas, estos no sólo están disponibles como aditivos para alimentos, sino también para productos farmacéuticos y cosméticos.²

a) Composición química

Químicamente, los SE son obtenidos de la reacción entre sacarosa y los ácidos grasos del C₁₂ a C₁₈ (ácido láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oléico), los cuales son derivados de grasas comestibles. La estructura química de los SE es la siguiente:

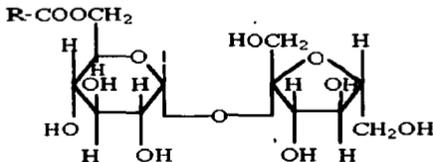


Figura 11: Estructura química de los sucroésteres⁴⁰

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

donde R es un radical del ácido graso. Debido a su origen y naturaleza, los SE proporcionan un grado de pureza específico y son completamente inofensivos y seguros. Además, la presencia en su molécula de una porción altamente hidrofílica (sacarosa) da a ésta clase de surfactantes un alto poder de emulsificación, superior al de otros monoglicéridos y monodiglicéridos.

Como la molécula de sacarosa contiene un gran número de grupos hidroxilos, los SE resultantes muestran una marcada afinidad para el agua y soluciones acuosas; la afinidad de los SE por las grasas es, como en los glicéridos, por la presencia de radicales de ácidos grasos en la molécula. Por consiguiente, los SE actúan como un excelente puente entre el agua y las grasas dando una mejor emulsificación entre ellos. Los productos alimenticios en los cuales se utilizan son estables y tienen buena apariencia.

Los SE puros son de color blanco o ligeramente amarillo, insípidos, inodoros y no tóxicos, con una estructura microcristalina y un punto de fusión proporcionado de acuerdo con los ácidos grasos usados en su preparación, que van desde 50°C hasta 100 °C; durante la fusión se lleva a cabo un oscurecimiento el cual es causado por la caramelización de la sacarosa esterificada.⁴¹

Siendo no irritantes de ojos y piel, los ésteres de sacarosa son usados no sólo para alimentos sino también para medicamentos y cosméticos, son biodegradables por lo que no causan contaminación ambiental.

b) Características generales

Los monoésteres de sacarosa son generalmente solubles en agua, en etanol y en acetona; son ligeramente solubles (menos del 1%) en aceites y muy poco solubles en agua fría. Los SE debido a su elevada actividad surfactante tienen un poder de emulsificación y dispersión importante.

Los SE son agentes emulsificantes no iónicos y se utilizan generalmente en emulsiones aceite/agua (o/w). Las emulsiones aceite/agua (o/w) realizadas con ésteres de sacarosa con un HLB alto pueden ser diluidas soluciones acuosas y por ésta razón ellas son de particular interés en los alimentos.

Los ésteres de sacarosa han sido recientemente investigados como promotores de absorción. Se encontró que dentro de la serie de SE probados, sólo el laureato de sacarosa

(LS) incrementaba el pasaje de Clorhidrato de Lidocaina (CL) a través de la mucosa bucal y la mucosa del paladar.¹¹

c) Usos de los ésteres de sacarosa ⁴⁰

- ✓ **Emulsificante de grasas:** los ésteres de sacarosa y monoglicéridos dan buenos resultados en emulsiones que contienen menos del 10% de la fase oleosa. Para emulsiones con mas del 10% de aceite, todos los tipos de ésteres de sacarosa son adecuados en una proporción del 2-5% en la fase oleosa. Sin embargo, cuando la fase excede el 50%, para mejorar la estabilidad, es necesario añadir sustancias tales como sacarosa, glucosa o maltosa para la fase acuosa con el fin de incrementar su viscosidad.

Los ésteres de sacarosa son utilizados comúnmente en alimentos como helado, mayonesa, margarina, chocolate, goma de mascar, caramelos, crema, productos cárnicos, espagueti, macarrones y queso entre otros.

- ✓ **Promotor o inhibidor de la cristalización:** los SE con HLB ≈ 11 pueden actuar como agentes promotores de la cristalización para grasas y aceites con un punto de fusión alto. Por otro lado, los SE con HLB ≈ 2 exhiben una gran habilidad para inhibir la cristalización de grasas y aceites, especialmente con ésteres de azúcar solubles en aceite los cuales suprimen la cristalización de los productos hidrogenados durante el almacenamiento, dando como resultado una disminución del índice de acidez.
- ✓ **Efecto antibacterial:** se ha demostrado que los SE inhiben el crecimiento de algunas bacterias como *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Desulfotomaculum nigrificans* y algunas esporas anaerobias pertenecientes a la especie *Clostridium*.
- ✓ **Formación de un complejo con almidón:** se ha demostrado que los SE combinados con almidón, especialmente amilosa, mejoran la calidad de los

productos que contienen dicho componente (como pastas, pan, pastel entre otros).

- ✓ **Lubricante:** Los ésteres de azúcar con valores bajos de HLB son utilizados como un lubricante en la manufactura de fármacos y dulces en tableta. Estos proveen una mejor fluidez de los ingredientes en polvo y consecuentemente un mejor mezclado y compactación. Estos transmiten efectivamente la carga a la máquina tableteadora e inhiben la adherencia de las tabletas al molde, dando lustre a las mismas. En la manufactura de chocolates, los diésteres de sacarosa disminuyen la viscosidad previniendo la fricción entre los componentes. En algunos alimentos en polvo (altamente higroscópicos), los ésteres de azúcar actúan como un lubricante sólido sobre la superficie de las partículas del polvo con el fin de mejorar la fluidez.

Los SE también son efectivos para prevenir la adherencia a los dientes de productos como goma de mascar, caramelos y nougat, para hacer más fácil el mezclado o bien, para mejorar la emulsificación de los mismos.

- ✓ **Efecto de dispersión o de mojado:** Los ésteres de azúcar previenen la sedimentación de partículas sólidas finas dispersas en agua por adsorción en su superficie. Baba y colaboradores⁴² reportan que la dispersión de carbonato de calcio con monoésteres de azúcar causa una coagulación a bajas concentraciones, pero actúa como un agente dispersante a concentraciones mayores (por arriba del 0.03 %), mientras que los diésteres de sacarosa siempre causan coagulación. Estos SE son usados como agentes dispersantes para polvo de cocoa, agua en anti-oxidantes solubles y fungicidas. También mejoran la reconstitución en agua de varios productos en polvo y dan uniformidad al producto terminado.

- ✓ **Inhibidores de la desnaturalización térmica:** los ésteres de azúcar con valores altos de HLB interactúan con las proteínas de la leche, incrementando la estabilidad en estas soluciones acuosas, y previniendo su desnaturalización térmica.

d) Laureato de Sacarosa: estructura, propiedades fisicoquímicas y mecanismo de acción

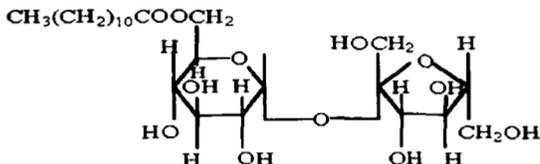


Figura 12: Estructura química del laureato de sacarosa ⁴⁰

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Tabla 3: Características fisicoquímicas del laureato de sacarosa ⁴⁰

Suroéster	Ácido graso (Cadena hidrocarbonada)	HLB	Solubilidad en agua (%)	Temperatura de fusión (°C)	Composición del éster %	
					Mono éster	Di, tri, poli éster
(L-1695)	Ácido láurico [12:0]	Aprox. 16	>50	35-47	Aprox. 80	Aprox. 20

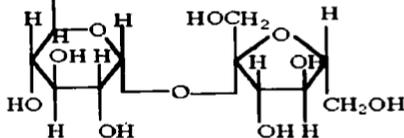
Mecanismo de acción del laureato de sacarosa

Como se sabe, el potencial que presentan los SE como promotores de absorción radica en la inserción de su larga cadena hidrocarbonada entre los tallos lipofílicos, permitiendo que el anillo de sacarosa interactúe con la cabeza polar de los lípidos.

En un estudio realizado sobre la absorción percutánea utilizando diferentes ácidos grasos saturados, se reportó que el ácido laúrico [12:0] fue más efectivo que el ácido cáprico [10:0] y que el mirístico [14:0]⁴³. Los ácidos grasos de cadenas medianas, entre C₁₀ y C₁₂, son más efectivos en la penetración de fármacos.

Por todo lo anterior, se piensa que el LS participa directamente en la región lipídica, insertándose y previniendo la cristalización de cadenas, trayendo en consecuencia la facilitación del transporte de fármacos. El LS afecta directamente el empaquetamiento de los lípidos, haciendo que los lípidos sean más fluidos y flexibles.

e) Oleato de Sacarosa: estructura, propiedades fisicoquímicas y mecanismo de acción



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 13: Estructura química del oleato de sacarosa ⁴⁰

Tabla 4: Características fisicoquímicas del oleato de sacarosa ⁴⁰

Sucroéster	Ácido graso (Cadena hidrocarbonada)	HLB	Solubilidad en agua (%)	Temperatura de fusión (°C)	Composición del éster %	
					Mono éster	Di, tri, poli éster
(O-1570)	Ácido oleico [18:1 (Δ ⁹)	Aprox. 15	10	27-43	Aprox. 70	Aprox. 30

Mecanismo de acción del oleato de sacarosa

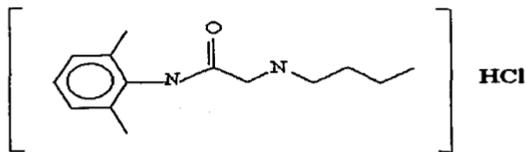
Sabemos que las moléculas que poseen ácidos grasos con enlaces *cis*-insaturados localizados en las posiciones 9:10 o 10:11, como es el caso del AO, pueden acentuar el desorden dentro de los lípidos aún más que los que contienen insaturaciones en otras posiciones²⁵, ya que el doble enlace produce una flexión muy pronunciada dentro de la cadena hidrocarbonada, rompiendo el empaqueo de los lípidos intracelulares.

El posible mecanismo del OS quizá está relacionado con la formación de conformeros *gauche* en la cadena alquílica, los cuales crean espacios de volumen libre dentro del campo de lípidos hidrocarbonados, aumentando la difusión de la membrana, y favoreciendo finalmente el paso de fármacos^{21,22}.

6. Propiedades fisicoquímicas de Clorhidrato de Lidocaina ¹⁴

Clorhidrato de Lidocaina

$C_{14} H_{22} N_2 O HCl, H_2O$



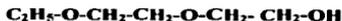
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 14: Estructura química del Clorhidrato de Lidocaina ¹⁴

- Nombre químico: Clorhidrato de 2 -(dietilamino)- N- 2,6 - dimetil (fenil) acetamina
- Sinónimos: Xilocaina, Ultracaina
- Peso molecular: 288.8 g/mol
- pKa: 7.9
- pH: al 0.5% de solución acuosa es de 4.0 – 5.5
- Características: polvo blanco cristalino con un punto de fusión de 74° a 79°C.
- Uso: anestésico local y antiaritmico clase IB
- Solubilidad: 1 parte en 1.5 partes de agua, 1 parte en 1.5 partes de etanol y 1 parte en 40 partes de cloroformo; prácticamente insoluble en éter
- Identificación: por UV en soln. ácida 263 nm, IR, HPLC, Espectroscopia de masas, cromatografía de masas, cromatografía en capa fina, reacciones coloridas.

7. Propiedades fisicoquímicas del Transcutol®⁴⁴

Transcutol®



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

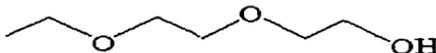


Figura 15: Estructura química del Transcutol®⁴⁴

- Nombre químico: Dietilen-glicol-monoetil éter
- Peso molecular: 134,17 g/mol
- Características: líquido, incoloro y con un olor ligeramente etéreo
- Uso: Es utilizado como solvente anfílico para preparaciones farmacéuticas, tópicas y transdérmicas; es compatible con algunos aceites vegetales y es utilizado como solvente para esteroides, trinitrina, indometacina, y algunas hormonas. También es utilizado en el área cosmetológica para la preparación de emulsiones, microemulsiones y lociones.
- Solubilidad: soluble en propilenglicol, hexilenglicol, etanol 96% y agua, parcialmente soluble en aceites vegetales e insoluble en aceites minerales
- Punto de ebullición: 195-202°C
- Viscosidad a 20°C: ≈ 4.5 mPa.s

III. MATERIALES Y REACTIVOS

a) REACTIVOS

- Acetona (Productos químicos Monterrey, S.A México)
- Acetato mercúrico (J.T. Baker NJ USA)
- Ácido acético glacial (Merck-México, S.A México.)
- Ácido fosfórico (Productos Químicos Monterrey, S.A. México)
- Agua destilada (Obtenida del equipo Milli-Q, Millipore)
- Ácido perclórico (Productos químicos Monterrey, S.A México)
- 1-Butanol (Productos químicos Monterrey, S.A México)
- Cristal violeta (Sigma, México S.A.)
- Clorhidrato de lidocaina (J. T. Baker NJ USA)
- Fosfato monobásico de potasio (Productos Químicos Monterrey, S.A. México)
- Hidróxido de sodio (J.T. Baker NJ USA)
- Laureato de sacarosa (Mitsubishi-Kasei Food Corporation, Tokio, Japón)
- Oleato de sacarosa (Mitsubishi-Kasei Food Corporation, Tokio, Japón)
- Transcutol (Gattefossé, Francia)
- Tributilamina (Merck-México, S.A. México)

b) APARATOS y EQUIPO

- Aplicador para cromatografía en capa fina de alta resolución, Linomat IV (Camag, Versión 2.12, Muttenz, Suiza)
- Balanza analítica (BOECO, modelo BBC 32, Alemania)
- Celdas de difusión verticales tipo Franz (0.96 de diámetro, receptor capacidad de 1.5 ml)

- **Dermatoma** (Zimmer, Mod. 901, USA)
- **Espectrofotómetro** (Varian, Mod. Cary IE 95031003, Australia)
- **Filtros de polipropileno en tubo para microcentrifuga** (0.45 μ m, Whatman, Maidstone, England)
- **Micrómetro electrónico digital** (No. 4443945, Japan)
- **pH metro** (modelo 430)
- **Placas de silica gel 60** (0.25 mm de grosor, 10 x 20 cm; Machery-Nagel, Alemania)
- **Scanner II Densitómetro** (CAMAG, Versión 4.06, Muttentz, Suiza)

IV. METODOLOGÍA

A) OBTENCIÓN DE LA PIEL

- Se utilizó piel de oreja de cerdo recuperada del rastro después del sacrificio de los animales y antes de tratarla con vapor o agua caliente
- Se aisló la piel de cada una de las orejas de cerdo utilizando bisturi y dermatoma
- Se hidrató la piel con solución salina fisiológica durante el proceso para evitar resequedad
- Se desechó todo el residuo de músculo y tejido adiposo
- Se cortaron pequeñas porciones de piel y se envolvieron en papel aluminio por separado
- Se congelaron hasta ser utilizadas a 0°C por un lapso no mayor de 30 días.

B) DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DEL CLORHIDRATO DE LIDOCAÍNA

- Se realizó de acuerdo al procedimiento de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 1988.
- Se disolvieron aproximadamente 700 mg de la muestra en 50 ml de ácido acético glacial.
- Se agregaron 10 ml de acetato mercurico y 2 gotas de cristal violeta y se titularon inmediatamente con solución 0.1 N de ácido perclórico hasta obtener una coloración verde esmeralda que es el punto final.
- Se realizó de la misma forma una determinación en blanco para hacer la corrección necesaria. Cada ml de solución 0.1 N de ácido perclórico equivale a 27.08 mg de Clorhidrato de Lidocaina (Anexo 1)

C) DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE CLORHIDRATO DE LIDOCAÍNA EN BUFFER DE FOSFATOS

- En viales pequeños se colocaron 2 mL de solución buffer de fosfatos a pH 3.5, 5.0, 7.0 y 9.0 (preparada de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos USP 2000) y se les agregó principio activo suficiente para saturar el medio.
- Se mantuvieron los viales a 37°C en baño de agua por 24 hrs.
- Las suspensiones se centrifugaron a 2500 revoluciones por 15 min. tomando el sobrenadante para hacer las diluciones necesarias con solución buffer a pH 7.0; las soluciones se leyeron a la longitud de onda máxima utilizando un espectrofotómetro.
- La concentración se obtuvo interpolando en la curva de calibración correspondiente

D) DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN DE CLORHIDRATO DE LIDOCAÍNA A PH 5.0, 7.0, 9.0

- En 3 embudos de separación se colocaron 30 mL de una de solución de Clorhidrato de Lidocaina de concentración conocida en buffer de fosfatos a pH 5.0, 7.0 y 9.0 respectivamente. A cada uno de estos se les agregó 30 mL de octanol
- Los embudos se agitaron por 1 hr. con el fin de saturar ambas fases.
- En tubos de ensaye se colocaron 3 ml de la solución acuosa (a cada uno de los pH's) y se le agregó la parte equivalente de oleato o laureato de sacarosa, según fue el caso y 3 mL de octanol. El volumen final de todos los sistemas fue de 7 ml
- La experiencia se realizó por triplicado para cada uno de los distintos pH's, analizando un total de 27 sistemas.
- Todos los sistemas se agitaron por 24 hrs.
- Se obtuvo la parte oleosa y se cuantificó por HPTLC. La concentración de la fase acuosa se determinó por diferencia con respecto a la concentración inicial.

E) CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CLORHIDRATO DE LIDOCAÍNA

Se realizó una curva de calibración por triplicado para el Clorhidrato de Lidocaina, en presencia de pequeñas porciones de piel utilizando como medio de disolución solución buffer de fosfatos a pH de 7.0. Esto se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se aislaron pequeñas porciones de piel de oreja de cerdo y se colocaron en solución buffer de fosfatos pH= 7.0 durante 8 horas, en baño de agua con agitación constante.
- Se centrifugó la solución obtenida a 2500 r.p.m. por 15 min. y posteriormente se filtró. Esta solución se utilizó como medio para preparar la curva de calibración del principio activo.

- Se preparó una solución stock de 10 $\eta\text{g}/\eta\text{l}$ de Clorhidrato de Lidocaina y a partir de ésta se tomaron 100, 500, 1000, 1500, 2000 y 2500 ηl para realizar la curva de calibración.
- Se evaluó la curva de calibración a la longitud de onda de máxima absorción por HPTLC.

F) MÉTODO DE PERMEACIÓN

- Se colocaron porciones de piel (0.7967 cm^2) en solución buffer por 5 minutos para descongelarlas
- Se montaron las celdas de permeación tipo Franz colocando en el compartimento receptor y donador 1.5 ml y 0.5 ml respectivamente de solución buffer de fosfatos a pH 7.0.
- Las celdas se incorporaron en un baño de agua a 37°C con agitación constante para hidratar por 30 minutos.
- Después de éste tiempo se extrajo la solución de ambos compartimentos y se colocó en el compartimento donador 100 μl de agente promotor (oleato o laureato de sacarosa según sea el caso) en Transcutol (2% v/v) y en el receptor solución buffer de fosfatos y se dejó por una hora.
- Después de éste tiempo se extrajo la solución del compartimento donador con algodón y se desechó la solución del compartimento receptor.
- Se colocó nuevamente en el compartimento receptor 1.5 mL de solución buffer de fosfatos pH 7.0 y en el compartimento donador 300 μl de una solución saturada de Clorhidrato de lidocaina en buffer de fosfatos a pH 5.0, 7.0 o 9.0 según sea el caso.
- Las celdas permanecieron 8 hrs. en un baño de agua a 37°C y con agitación constante
- Se tomaron muestras del compartimento receptor a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 hrs. reponiendo el volumen con medio fresco.
- Cada muestra se recolectó y se analizó por HPTLC.
- Se retiró la piel de la celda después de la permeación, la piel se enjuagó y cortó en pequeñas porciones y posteriormente se colocó en 5 mL de etanol durante 48 horas.

en un baño de agua a 37°C y con agitación constante, todo esto con el fin de extraer todo el fármaco que se pudiera haber retenido. La suspensión extraída se centrifugó y el sobrenadante obtenido se filtró y se determinó la cantidad de principio activo por HPTLC (de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 10.4)

- La experiencia de permeación se llevó a cabo por sextuplicado corriendo controles (sin pretratar la piel con promotores) y blancos (con solución buffer de fosfatos al pH correspondiente).
- Se construyó un gráfico de la cantidad acumulada o de fármaco permeado en función del tiempo utilizando todos los datos a cada tiempo marcado (Anexo 3).

G) DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA EXTRACCIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO RETENIDO EN LA PIEL

- Se colocaron 100 µl de una solución etanólica de clorhidrato de lidocaína de concentración conocida en la superficie de pequeñas porciones de piel (0.7967 cm²) y se dejó evaporar
- Posteriormente se cortaron cada una de las porciones y se colocaron en viales pequeños con 5 ml de etanol
- Se mantuvieron los viales a 37°C en baño de agua por 48 hrs.
- Las suspensiones se centrifugaron a 2500 revoluciones por 15 min., y posteriormente se filtraron
- El sobrenadante se cuantificó por HPTLC y los resultados se interpolaron en una curva de calibración, determinando el porcentaje de principio activo extraído con respecto a la cantidad total colocada.
- La experiencia se realizó por triplicado

H) CUANTIFICACIÓN DE CLORHIDRATO DE LICODAIÑA POR HPTLC

- Se utilizó como fase estacionaria placas de sílica gel 60 rociadas previamente con tributilamina y como fase móvil 1-Butanol: Ácido acético: Acetona (7: 3: 5).
- La distancia de corrimiento fue de 5.0 cm.
- Se aplicaron 1000 – 100.000 η l de cada una de las muestras (dependiendo de la cantidad de fármaco permeado) en forma de banda de 6 mm de largo.
- Todas las mediciones se calcularon en base al área del pico; el flujo fue calculado para la porción lineal obtenida de la relación entre la cantidad acumulada del fármaco (cantidad penetrada) y el tiempo

I) ESTUDIO DE PIEL DE CERDO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

- Se colocó la oreja de cerdo en un baño de agua a 60 °C por 1 minuto
- Se desprendió el estrato córneo manualmente
- Se trató la piel con Transcutol, con laureato de sacarosa/Transcutol(2%) y con oleato de sacarosa/Transcutol (2%) por 1 hr. Se tomó como control la piel con buffer pH 7.0
- Se cortaron pequeñas porciones de estrato córneo de aprox. 3 mm de diámetro y se secaron a temperatura ambiente durante 2 días
- Las muestras se cubrieron con una fina película de oro de aprox. 20 η m y se examinaron por Microscopía Electrónica de Barrido

V. RESULTADOS y ANÁLISIS

V.1 Determinación de la pureza de CL

La pureza del CL fue de **91.3116%**; ésta fue evaluada de acuerdo al procedimiento indicado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 1988 (Anexo 1).

V.2 Determinación de la solubilidad del CL en solución buffer de fosfatos

A partir de ésta prueba se determinó la solubilidad del p.a. en solución buffer con valores de pH= 3.5, 5.0, 7.0 y 9.0 (Anexo 1). Se decidió que el compartimento receptor estaría formado por solución buffer de fosfatos pH 7.0 (Tabla 5), ya que este valor se acerca a las condiciones fisiológicas corporales y el valor de solubilidad obtenido asegura que predominarán las condiciones sink en el sistema.

Tabla 5: Resultados de solubilidad del CL en buffer de fosfatos (n=3)

pH	Solubilidad (mg/ml)
3.5	949.7729 ± 36.0507
5.0	935.7619 ± 44.7413
7.0	927.4827 ± 3.8388
9.0	901.7959 ± 3.5459

V.3 Determinación del porcentaje de fracción ionizada del p.a. y del coeficiente de partición en buffer de fosfatos

Como sabemos, la fuerte polaridad de una forma iónica se opone constantemente a la difusión a través de la membrana, de manera que solo la fracción no ionizada liposoluble puede franquear la membrana por difusión pasiva.

Teóricamente se obtuvo la fracción no ionizada del p.a.; como podemos ver es mayor a pH 9.0 (Tabla 6), y va decreciendo conforme el pH va disminuyendo ya que se trata de una base débil ($pK_a = 7.9$).

Tabla 6: Porcentaje teórico de la fracción no ionizada de CL

pH	Fracción no ionizada	Porcentaje
5	0.0013	0.13
7	0.1118	11.18
9	0.9264	92.64

El coeficiente de partición se determinó experimentalmente utilizando como medio acuoso buffer de fosfatos con diferentes valores de pH, y como fase oleosa octanol

El valor del coeficiente de partición corresponde a la solubilidad relativa del fármaco en el medio lipofílico (octanol), el cual se toma como referencia considerando que el estrato córneo es una estructura de naturaleza lipofílica.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 7) a pH 7.0 y 9.0 sin promotor y con LS, el coeficiente de reparto es ligeramente superior a 1, lo cual implica que tiene una mayor afinidad por el medio lipofílico. Esto es adecuado pues una lipofilia "media" favorece la partición del fármaco con el SC (lipofílico) y el tejido subyacente (hidrofílico), así como con el medio receptor. Un coeficiente de reparto cercano a la unidad, pH 7.0 y 9.0

con OS, indica que la molécula se reparte de manera muy parecida entre el SC y el vehículo y, por último, un coeficiente de reparto pequeño, pH 5.0, demuestra que el principio activo tiene una gran afinidad por su vehículo, y por consiguiente, presentará una pobre difusión a través del SC. Esto concuerda con la fracción ionizada del CL a éste pH.

Tabla 7: Coeficientes de partición de CL

$$CF = \frac{C_l}{C_u}$$

C_l = conc. fase lipídica, C_u = conc. fase acuosa

pH	5	7	9
Sin promotor	0.0921	1.1469	1.1735
Oleato de sacarosa	0.0433	0.8444	0.9617
Laureato de sacarosa	0.1006	1.2731	1.1118

V.4 Curvas de calibración de CL en solución buffer de fosfatos pH 7.0 sin membrana y con membrana

Para evaluar la linealidad del método se determinó la respuesta analítica, área bajo la curva (ABC), para cada cantidad de p.a. analizada en buffer de fosfatos sin membrana y con membrana (Figura 16).

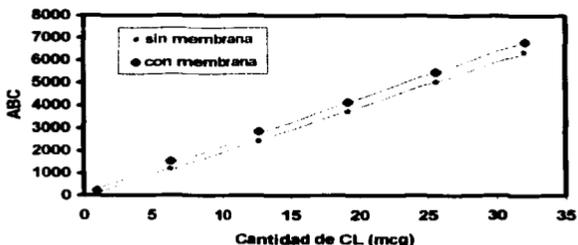


Figura 16: Curvas de calibración de CL (λ máx= 265 nm), con membrana y sin membrana

Como se aprecia en los resultados de la tabla 8, el valor de la ordenada al origen de ambas curvas es distinto de cero, por ello se realizó el análisis estadístico correspondiente para determinar si es significativamente diferente de cero con un nivel de significancia (α) de 0.05. Se estableció la siguiente hipótesis:

H₀: La ordenada al origen es igual a cero

H₁: La ordenada al origen es diferente de cero

Criterio de aceptación:

Si $t_{cal} < t_{critica}$ no se rechaza H₀

Si $t_{cal} > t_{critica}$ se rechaza H₀

De acuerdo a la hipótesis establecida y los resultados obtenidos existe la probabilidad del 95% de confianza que las curvas de calibración del CL sin membrana (t_{exp} 2.6282 > $t_{teórica}$ 2.12) y con membrana (t_{exp} -2.8920 > $t_{teórica}$ -2.12) no pasen por el origen; sin embargo con un nivel de significancia (α) de 0.01, la ordenada al origen de las curvas de

calibración sin membrana ($t_{exp} 2.6289 < t_{teórica} 2.92$) y con membrana ($t_{exp} -2.8920 < t_{teórica} -2.92$) es igual a cero (Anexo 2).

Tabla 8: Resultados de la regresión lineal de las curvas de calibración de CL sin membrana y con membrana

Parámetros estadísticos	Curva de calibración sin membrana	Curva de calibración con membrana
m	198.5771	209.4456
b	-61.8069	107.0517
r ²	0.9994	0.9995

Por otro lado, para comparar las dos curvas de calibración, se determinó la varianza del grupo de datos obtenidos (ABC) μ para cada curva, estableciendo la siguiente hipótesis:

H₀: No hay diferencia significativa entre las varianzas de las pendientes de las curvas de calibración de CL sin membrana y con membrana

H₁: Si hay diferencia significativa entre las varianzas de las pendientes de las curvas de calibración de CL sin membrana y con membrana

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza H_0

Si $F_{cal} > F_{crítica}$ se rechaza H_0

Los resultados muestran que se rechaza H_0 ($F_{cal} 0.8990 > F_{crítica} 0.4402$), por lo tanto se establece que las varianzas de las pendientes de las curvas de CL son significativamente diferentes (Anexo 2).

A partir de los datos obtenidos se realizó una prueba de t para determinar si las pendientes de las curvas de calibración son significativamente distintas. Para ello se estableció la siguiente hipótesis:

H₀: No hay diferencia significativa entre las pendientes de las curvas de calibración de Clorhidrato de lidocaina sin membrana y con membrana

H₁: Si hay diferencia significativa entre las pendientes de las curvas de calibración de CL sin membrana y con membrana

Criterio de aceptación:

Si $t_{cal} < t_{critica}$ no se rechaza H_0

Si $t_{cal} > t_{critica}$ se rechaza H_0

De acuerdo a la hipótesis establecida y los resultados obtenidos ($t_{exp} 0.4589 < t_{teórica} 2.0322$) no se rechaza H_0 , por lo tanto no hay diferencia significativa entre las pendientes de las curvas de calibración de CL sin membrana y con membrana, es decir, no existe una interacción de los componentes de la membrana sobre la cuantificación de éste principio activo (Anexo 2).

Con la información obtenida anteriormente se decidió utilizar la curva de calibración del p.a. en buffer de fosfatos con membrana.

V.5 Límites de detección y cuantificación

Se determinaron el límite de detección y de cuantificación del método a partir de los datos de la curva de calibración de CL con membrana.

La ecuación obtenida a partir del análisis de regresión lineal de la respuesta analítica en función de la cantidad de CL es la siguiente:

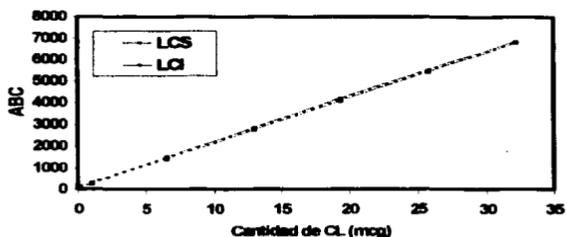
$$ABC = [\text{Cantidad CL } (\mu\text{g})] * 209.4456 + 107.0517 \quad (\text{ecuación 15})$$

A partir de la ecuación anterior, se calculó la respuesta analítica estimada correspondiente a cada cantidad de CL, y se determinaron los límites de confianza para cada punto (Tabla 9).

Tabla 9: Límites de confianza de las muestras de CL

Cantidad de CL (μg)	Respuesta analítica estimada (ABC)	LCI al 95% de la respuesta analítica	LCS al 95% de la respuesta analítica
0.0	<i>107.0517004</i>	63.11749418	150.985907
0.915855697	298.8736167	253.69213	344.055103
6.410989879	1449.805115	1399.087192	1500.52304
12.82197976	2792.558529	2738.733523	2846.38354
19.23296964	4135.311943	4081.41681	4189.20708
25.64395952	5478.065357	5427.124512	5529.0062
32.0549494	6820.818771	6776.456799	6865.18075

En el gráfico (Figura 17) se muestran los intervalos de confianza de las respuestas analíticas así como la recta de regresión obtenida. El valor de la respuesta analítica de **150.9859** correspondiente al límite de confianza superior de la cantidad de p.a. 0.0 μg , se interpoló en la curva de regresión anterior. Como sabemos, el límite de detección, en éste caso, es la cantidad estimada del límite superior de confianza del intercepto en la recta de regresión. El límite de detección obtenido fue **0.2098 μg** .



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 17: Gráfico de los intervalos de confianza de las respuestas analíticas (ABC) en función de la cantidad de CL

Para evaluar el **límite de cuantificación** se propusieron tres concentraciones (cantidades de CL) cercanas al límite de detección y se determinaron sus respuestas analíticas a partir de la ecuación 15; posteriormente se calcularon los límites de confianza para cada una de las respuestas (Tabla 10).

El límite de cuantificación es aquella concentración o cantidad de p.a. que tenga un límite de confianza inferior semejante al intervalo de confianza superior al intercepto, en este caso **154.6609**. El límite de cuantificación obtenido fue de **0.2273µg**.

Tabla 10: Límites de confianza para respuestas analíticas pronosticadas por la ecuación de regresión

Cantidad de CL (µg)	Respuesta analítica estimada (ABC)	LCI al 95% de la respuesta analítica	LCS al 95% de la respuesta analítica
0.22	153.1297253	108.886019	197.373431
0.44	199.2077501	154.660888	243.754612
0.66	245.285775	200.441971	290.129579

V.6 Extracción del principio activo retenido en piel

Este análisis nos permitió conocer el porcentaje de p.a. que se puede extraer de la piel después de las permeaciones. El medio de disolución elegido fue etanol ya que el p.a. presenta una solubilidad de 1 en 1.5 partes del disolvente de acuerdo a la literatura⁽⁴⁾.

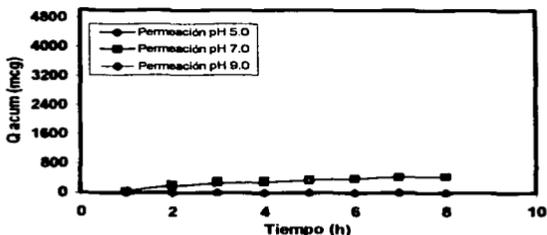
Debido a que el porcentaje determinado a partir de la primera evaluación no fue satisfactorio, se realizaron diferentes pruebas aumentando el tiempo de agitación y la temperatura. El mayor porcentaje de p.a. extraído de la membrana se obtuvo a 37°C por 48 hrs. (Tabla 11), tal y como se describe en la metodología.

Tabla 11: Resultados de las pruebas de extracción del p. a. retenido en piel de cerdo

Muestras	Porcentaje del principio activo extraído en piel (%)		
	25°C por 9 hrs. con agitación constante	25°C por 48 hrs. con agitación constante	37°C por 48 hrs. con agitación constante
a	70.2194	71.0910	88.5314
b	73.2146	73.1384	89.5750
c	72.3699	75.7535	90.3858
promedio	71.7170 ± 2.1179	73.3276 ± 2.3370	89.4974 ± 0.9296

V.7 Permeaciones del principio activo sin promotor

Se realizó un estudio de permeación de CL a través de piel entera de oreja de cerdo (PE); se utilizó como modelo animal piel de cerdo ya que en estudios previos realizados *in vitro* se ha visto que tiene propiedades histológicas y fisiológicas similares a la piel humana.^{45,46,47,48}

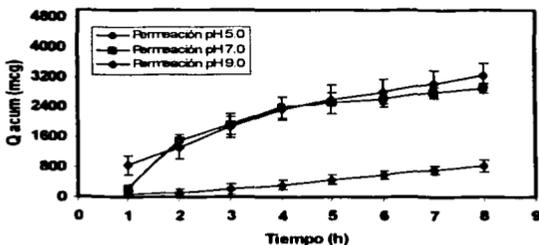


TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 18: Cinética de permeación de CL sin promotor a través de PE

El estudio de difusión se llevó a cabo para CL sin promotor, en buffer pH 5.0, 7.0, y 9.0. A partir de éste experimento sólo fue posible cuantificar el p.a. cuando se encontraba en buffer pH 7.0 (Figura 18), ya que la respuesta analítica para las otras dos permeaciones fue menor a la obtenida para el límite de cuantificación.

Tomando en cuenta que la variación entre celda y celda fue muy grande (Anexo 3) y que no obtuvimos resultados para las permeaciones realizadas a pH 5.0 y 9.0, se decidió homogenizar el grosor de la piel utilizando un dermatoma, ya que fue necesario tener un punto de comparación (respuesta analítica cuantificable) para cada una de las permeaciones a partir del cual se pueda evaluar el efecto promotor de los SE y el efecto del pH sobre el flujo del fármaco. El espesor promedio de las membranas utilizadas fue aprox. $353 \mu\text{m} \pm 25.0413$, ésta medición se realizó con un micrómetro electrónico digital.

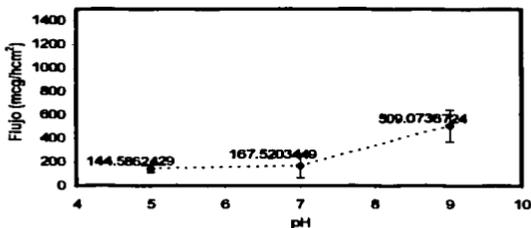


TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 19: Cinética de permeación de CL sin promotor de PCD

La cinética de permeación utilizando PCD (piel cortada con dermatoma) se muestra en la Figura 19; podemos observar que la cantidad acumulada del fármaco a las 8 hrs. en el compartimiento receptor es mayor a pH 9.0; esto concuerda con lo estudiado anteriormente (Tabla 6) ya que más del 90% de CL se encuentra no ionizado (pK_a 7.9).

Los resultados indican que el flujo del fármaco se incrementa significativamente con la cantidad de base no ionizada (Figura 20). Es interesante observar que a pesar de que a pH 7.0 el valor de flujo es ligeramente superior al de pH 5.0, las cantidades determinadas a pH 7.0 son mucho mayores que a pH 5.0 (Figura 19).

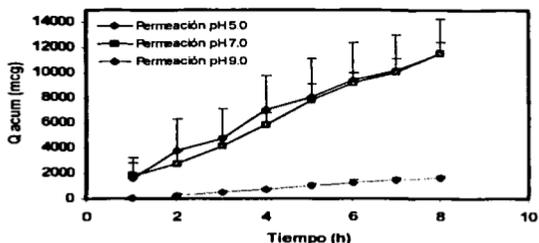


**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 20: Relación entre el flujo de CL a través de PCD y el pH de la fase donadora

V.8 Cinética de permeación de CL con Laureato de sacarosa

En la Figura 21 se muestran los perfiles de la cantidad acumulada del fármaco dentro del compartimento receptor a través de PCD utilizando como promotor LS. Se observó un incremento significativo en el flujo (Tabla 12) cuando el p.a. se encuentra en buffer pH 5.0 (FP=11.94550813 ± 3.623909144) y pH 7.0 (FP=10.8378 ± 2.1127), a diferencia de pH 9.0 donde se presentó el efecto contrario (FP=0.5912 ± 0.0382).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 21: Cinética de permeación del CL con laureato de sacarosa a través de PCD

En muchos casos se ha visto que algunos surfactantes tienden a promover el paso de p.a. polares, aún cuando no ocurra una interacción micelar.

En un estudio previo se determinó el efecto del polioxietilén-10-dodecil éter (surfactante no iónico) sobre la permeación del ácido nicotínico a través de piel a distintos niveles de pH, donde se observó que el grado de promoción fue mucho mayor para el anión (pH= 4.70 – 5.0) que para el ácido libre (pH= 4.30). En ausencia del surfactante, el grado de penetración disminuyó cuando se aumentó el nivel de pH, lo cual refleja la relativa inhabilidad de los iones a la partición dentro de las fases lipídicas del SC. Cuando se trató la piel con el surfactante, también se observó una disminución en la penetración del fármaco al incrementar el nivel de pH, sin embargo el efecto no fue tan marcado como en el caso anterior. Cuando se empleó el surfactante se obtuvieron constantes de permeabilidad significativas para las especies ionizadas (pH= 4.70, $K_p = 6.19 \text{ cm/h} \times 10000$; pH= 4.85, $K_p = 7.91 \text{ cm/h} \times 10000$)⁴⁹. Esto nos lleva a pensar que el LS al igual que el polioxietilén-10-dodecil éter, promueve preferentemente la permeabilidad de los fármacos a través del SC sólo cuando éstos se encuentran en su forma ionizada.

Tabla 12: Influencia del pH sobre el flujo de CL a través de PCD

pH	Sin promotor		Laureato de sacarosa 2%		Oleato de sacarosa 2%	
	J ($\mu\text{g}/\text{hcm}^2$)	FP	J ($\mu\text{g}/\text{hcm}^2$)	FP	J ($\mu\text{g}/\text{hcm}^2$)	FP
5	144.5862 \pm 29.4101 (1-7)	1	1727.1561 \pm 523.9674 (1-8)	11.9455 \pm 3.6239	545.6066 \pm 60.3819 (1-8)	3.7736 \pm 0.4176
7	167.5203 \pm 98.3932 (4-8)	1	1815.5473 \pm 353.9261 (1-8)	10.8378 \pm 2.1127	578.708 \pm 28.6968 (1-7)	3.4546 \pm 0.1713
9	509.0737 \pm 137.1540 (1-6)	1	300.9761 \pm 19.4593 (1-8)	0.5912 \pm 0.0382	1359.5089 \pm 207.1910 (1-8)	2.6706 \pm 0.4070

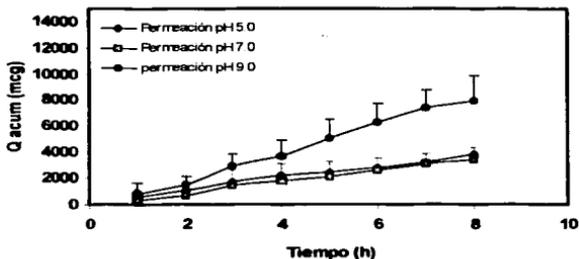
Ciertamente el mecanismo de acción de los surfactantes no iónicos se relaciona con la partición dentro de los lípidos intercelulares del SC, lo cual resulta en un incremento de la fluidez en ésta región disminuyendo la resistencia de la membrana.

Considerando que el transporte por el SC ocurre principalmente a través de éstos lípidos intercelulares, es de esperarse que la inserción de la cadena alquílica del LS fluidice los lípidos, favoreciendo con ello el paso del p.a. No obstante, el LS podría actuar a dos niveles: en la región hidrófoba de la bicapa, incrementando el paso de sustancias lipofílicas o bien abriendo los canales acuosos al interactuar con las cabezas polares de los lípidos, lo que en un determinado momento permitiría el transporte de sustancias hidrofílicas, incluyendo sustancias iónicas (Figura 21). De hecho pensamos que por la longitud de la cadena⁴⁹,⁵⁰ y los grupos hidroxilo presentes en la molécula de sacarosa, el paso de sustancias hidrosolubles se ve favorecido preferentemente.

V.9 Cinética de permeación de CL con Oleato de sacarosa

En los estudios de permeación realizados con OS (Figura 22) observamos que hubo un aumento mucho menor al observado con LS. Esto lo podemos comparar con lo

reportado anteriormente en un estudio in vivo realizado con 4-HB (4-hidroxibenzonitrilo) a través de SC humano, donde se observa que no existe un incremento significativo de la cantidad permeada del fármaco cuando se empleó OS como promotor de absorción³⁸.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 22: Cinética de permeación del CL con Oleato de sacarosa a través de PCD

Como hemos visto anteriormente, el potencial de los SE radica en la longitud de su cadena hidrocarbonada, la cual puede ser insertada entre los tallos lipofílicos de la bicapa permitiendo que el anillo de sacarosa interactúe con la cabeza polar de los grupos lipídicos.

A diferencia del LS, la molécula de éste SE presenta un ácido graso con una insaturación en el C9; esto, aunado a la lipofilia del oleato (atribuible a la mayor longitud de la cadena, C_{18}) probablemente sea la razón por la cual no se favorece tanto el paso del fármaco a través de la piel; esto se ve reflejado en el flujo y el factor de promoción (Tabla 12) obtenidos para las cinéticas de permeación a pH 5.0 y 7.0; probablemente el FP es menor al del LS porque la mayor lipofilia del oleato no favorece tanto el paso del p.a. en su forma ionizada, como ocurre con el laureato.

No obstante, a pH de 9.0, se observa un efecto promotor completamente distinto al de los otros dos pH's, lo cual marca una diferencia en cuanto al modo de acción si se compara con el LS, en donde incluso se tuvo un efecto retardador a pH 9.0 (Tabla 13); probablemente el SE interacciona con las cadenas alquílicas de los lípidos y por la flexión impuesta por la instauración *cis* del oleato, se crean huecos en la región hidrófoba, por lo que el paso del CL en su forma no ionizada se ve favorecido. No obstante, los grupos hidroxilo de la cabeza polar también incrementan el paso del CL en su forma ionizada. De éste modo podemos decir que el OS funge como promotor para el CL tanto en su forma ionizada como no ionizada debido a que altera tanto la región hidrófoba de la bicapa como las regiones polares. Por otro lado, el LS al poseer una cadena saturada y de menor longitud, origina menos desorden en la parte hidrófoba, pero actúa fuertemente con las cabezas polares, por lo que el paso del CL en su forma ionizada se ve favorecido de manera importante.

Tabla 13: Influencia del pH y de los ésteres de sacarosa sobre la permeabilidad en piel del Clorhidrato de Lidocaína

pH	% CL no ionizado	Coeficiente de permeabilidad (cm/h x 10000)		
		Sin promotor	Laureato de sacarosa 2%	Oleato de sacarosa 2%
5	0.1257	1.5452	18.4572	5.8306
7	11.1818	1.8062	19.5750	6.2396
9	92.6412	5.6451	3.3375	15.0756

A partir de los resultados obtenidos de las distintas permeaciones, podemos comparar el efecto promotor de ambos SE en relación a los tres niveles de pH. Las Figuras 23a y 23b muestran la cantidad de CL acumulado en el compartimiento receptor y en la membrana a las 8 hrs.; como se puede observar, la cantidad acumulada en el receptor es mayor con LS a

pH 5.0 y 7.0, mientras que con OS a pH 5.0 y 7.0 no hubo aparentemente un cambio significativo con respecto a la permeación sin promotor (Prueba de Duncan). De acuerdo al análisis de varianza realizado, se comprobó que solo existe una diferencia significativa a pH 9.0 ($F_{cal} 44.8676 > F_{crit} 4.1028$) donde el oleato promueve considerablemente el paso del fármaco a través de la piel (Anexo 3).

En cuanto a la cantidad retenida en el tejido (Figura 23b) podemos observar que aparentemente se acumula una mayor cantidad cuando no se utilizan promotores. Sin embargo, a partir de la Prueba de Duncan se determinó que no existe una diferencia significativa entre las cantidades de p.a. acumuladas en el tejido para las permeaciones realizadas con promotor y sin promotor, independientemente de la naturaleza de éstos, excepto entre la permeaciones pH 9.0 s/p y pH 9.0 con OS, donde se observa una disminución significativa en la cantidad retenida de p.a. cuando se utiliza OS (Anexo 3).

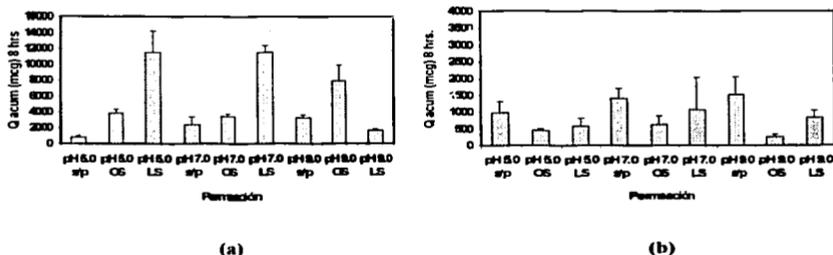
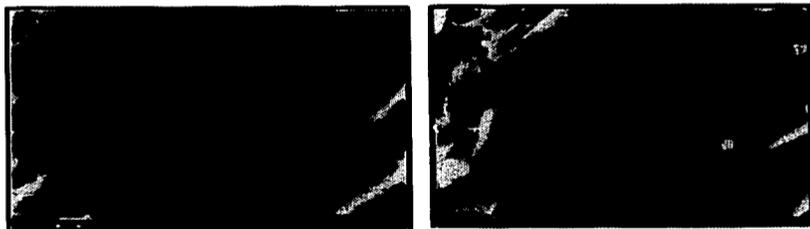


Figura 23: (a) Cantidad del p.a. retenido en el compartimento receptor a las 8 hrs.; (b) Cantidad de p.a. retenido en la membrana a las 8 hrs.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Con el fin de determinar el efecto del Transcutol, utilizado como co-solvente, y de los SE sobre el tejido, se examinó el SC de la piel utilizada en la experimentación por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Es importante mencionar que el transcutoal ayuda en la permeación a través del tejido al afectar la ruta lipofílica de penetración. La presencia del transcutoal en la región interfacial tiende a minimizar la energía libre durante la partición, promoviendo de esta forma la penetración del fármaco 31,32,33.

Las micrografías muestran el efecto del co-solvente sobre los corneocitos (Figura 25); como se esperaba, existe una marcada deshidratación en el tejido con respecto a la piel no tratada (Figura 24); esto se atribuye a que el Transcutol es fuertemente higroscópico, por lo tanto, al estar en contacto la piel, altera temporalmente las propiedades de la barrera, ya que el flujo de Transcutol que se establece a través del tejido reemplaza las moléculas de agua^{29,1,30}, contrayendo notablemente el epitelio, lo cual se hizo evidente en la Figura 25.



**Figura 24: Micrografías del estrato córneo de piel de oreja de cerdo sin tratamiento
(Barra equivalente a 10 μm , 1500 X)**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**Micrografías: Técnico Académico Rodolfo Robles Gómez, Laboratorio de Microscopía Electrónica,
FES-Cuautitlán**

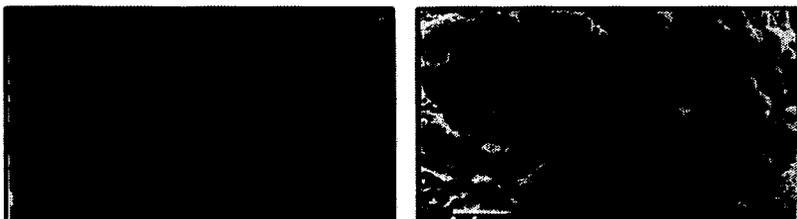
Cuando se utilizan las soluciones de los SE (2% en Transcutol) sobre el SC observamos que el tejido aparentemente no se contrae; esto quizá se debe a que las moléculas tanto del LS como del OS insertadas dentro del epitelio aumentan la fluidización de los lípidos³⁸, lo cual permite que el tejido tenga una apariencia menos rígida (Figura 26a y 26b).

Es probable que la molécula de sacarosa de éstos compuestos, por tener un gran número de grupos hidroxilo forme puentes de hidrógeno, lo cual ayudaría a disminuir la afinidad del Transcutol por las moléculas de agua, además de la sustitución de las mismas por el Transcutol, impidiendo considerablemente la deshidratación de la piel.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 25: Micrografía del estrato córneo de piel de oreja de cerdo tratada con Transcutol (Barra equivalente a 10 μ m, 1500 X)



**Figura 26: (a) Micrografía del estrato córneo de piel de oreja de cerdo tratada con una soln. de LS al 2% en Transcutol; (b) Micrografía del estrato córneo de piel de oreja de cerdo tratada con una soln. de OS al 2% en Transcutol
(Barra equivalente a 10 μm , 1500 X)**

La topografía de la piel si se ve alterada con los SE y el Transcutol. No obstante, las observaciones más importantes están relacionadas al efecto deshidratante que ejerce el Transcutol y que se ve atenuado cuando se incluyen los SE.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Micrografías: Técnico Académico Rodolfo Robles Gómez. Laboratorio de Microscopía Electrónica. FES-Cuautitlán

VI. CONCLUSIONES

- A pH alcalinos, se promueve la difusión del Clorhidrato de Lidocaina sin utilizar promotores debido a que el principio activo se encuentra básicamente en su forma no ionizada, lo que favorece su paso a través del ambiente lipídico del estrato córneo.
- El laureato de sacarosa promueve la difusión del Clorhidrato de Lidocaina en su forma ionizada (pH's 5.0 y 7.0), pero retarda la difusión del fármaco en su forma no ionizada (pH 9.0)
- El oleato de sacarosa mostró ser más efectivo que el laureato de sacarosa como promotor de absorción cuando la molécula de Clorhidrato de Lidocaina se encuentra no ionizada (pH alcalino).
- Estas observaciones pueden atribuirse a que el laureato de sacarosa crea un ambiente más hidrofílico que el oleato, debido que posee una cadena alquílica saturada, de menor longitud.
- Por su parte el oleato de sacarosa afecta de manera importante la ruta lipofílica al poseer una insaturación *cis* capaz de desordenar las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. La mayor longitud de la cadena del oleato de sacarosa puede contribuir a la mayor afinidad por la forma no ionizada del Clorhidrato de Lidocaina.

VII. PERSPECTIVAS

- La relación entre la efectividad de los promotores y el grado de ionización del fármaco debe ser corroborada mediante el estudio de otros principios activos
- Es importante seguir estudiando el mecanismo de acción de los SE, ya que pueden ser considerados para incluirse en formulaciones tópicas y transdérmicas como promotores de absorción potencialmente efectivos.

VIII. ANEXOS

Anexo I

Resultados de:

- **Pureza del Clorhidrato de Lidocaína**

- **Solubilidad del principio activo en buffer de fosfatos**

PUREZA DEL CLORHIDRATO DE LIDOCAÍNA

Conc. $\text{HClO}_4 = 0.0968 \text{ N}$

Muestras	Cantidad pesada de CL (mg)	Volumen gastado de HClO_4 (ml)	Cantidad recuperada de CL (mg)	Pureza (%)
Blanco		0.2		
a	700.5	25.1	652.7147	93.1784
b	700.4	24.3	631.7439	90.1976
c	700.5	24.4	634.3652	90.5589

Pureza (%) = 91.3116348

SOLUBILIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO EN BUFFER DE FOSFATOS

Curva de calibración $y = 1.5702x + 0.0066$

$$r^2 = 0.9985$$

Diluciones: 1:100, 1:50 para muestras pH 3.5, 7.0 y 9.0

Diluciones: 1:100, 3:100 para muestras pH 5.0

pH	Muestra 1 (Abs)	Muestra 2 (Abs)	Muestra 3 (Abs)	Conc. (mg/ml)	desvest
3.5	0.2922	0.3084	0.314	949.772852	36.050714
5.0	0.4712	0.4399	0.4311	935.761899	44.741255
7.0	0.298	0.299	0.2966	927.482699	3.838819
9.0	0.2888	0.291	0.2896	901.795950	3.545895

Anexo II

Resultados de la curva de calibración de Clorhidrato de Lidocaína

- **Curvas de calibración**

- **Prueba de t de student para intercepto**

- **Comparación estadística de las curvas de calibración con membrana y sin membrana**

CURVAS DE CALIBRACIÓN

- **Resultados de la curva de Calibración de Clorhidrato de Lidocaína sin membrana**

Cantidad de CL (µg)	Respuesta analítica (ABC)	desvest	c.v. (%)
0.9156	206.9	1.9925	0.9738
0.9156	203.4		
0.9156	203.5		
6.4110	1168.3	3.5642	0.3042
6.4110	1171.3		
6.4110	1175.4		
12.8220	2424.2	3.0050	0.0686
12.8220	2420.9		
12.8220	2418.2		
19.2330	3724.6	2.5968	0.0697
19.2330	3729.7		
19.2330	3726.3		
25.6440	5032.1	2.7392	0.0481
25.6440	5028.6		
25.6440	5026.7		
32.0550	6349.4	4.6130	0.0726
25.6440	6358.6		
25.6440	6353.4		

• **Resultados de la curva de Calibración de Clorhidrato de Lidocaina con membrana**

Cantidad de CL (µg)	Respuesta analítica (ABC)	desvest	c.v. (%)
0.9156	211.6	1.4731	0.7005
0.9156	210.6		
0.9156	208.7		
6.4110	1516.3	0.4726	0.0312
6.4110	1517.2		
6.4110	1517		
12.8220	2848	4.2297	0.1485
12.8220	2853.9		
12.8220	2845.7		
19.2330	4144.6	3.4819	0.0840
19.2330	4146.7		
19.2330	4139.9		
25.6440	5455.8	3.5679	0.0654
25.6440	5455.1		
25.6440	5449.3		
32.0550	6797.4	3.9804	0.0190
25.6440	6803.8		
25.6440	6804.7		

- **Resultados de la regresión lineal de las curvas de calibración de Clorhidrato de Lidocaína sin membrana y con membrana**

Parámetros estadísticos	Curva de calibración sin membrana	Curva de calibración con membrana
m	198.5772	209.4456
b	-61.8069	107.0517
r²	0.9994	0.9994

PRUEBA DE t DE STUDENT PARA INTERCEPTO

- **Prueba de t de student para la ordenada al origen**

Se planteó la siguiente hipótesis:

Ho: La ordenada al origen es igual a cero

Hi: La ordenada al origen es diferente de cero

Criterio de aceptación:

Si $t_{cal} < t_{critica}$ no se rechaza H_0

Si $t_{cal} > t_{critica}$ se rechaza H_0

	Curva de calibración sin membrana	Curva de calibración con membrana
b (pendiente)	198.5771	209.4456
A (intercepto)	-61.8069	107.0517
n	18	18
promedio x	16.1801	16.1801
Ex	291.2421	291.2421
Ex2	6784.1469	6784.1469
Ey	56721.5	62926.3
Ey2	260486764.9	310919516.3
Sy2	4808605.25	5349124.386
Sx2	121.8715	121.8715
Syx	55.1375	55.8262
t exp	2.6282	-2.8920
t teórica (alfa 0.05, gl n-2)	2.12	2.12
t teórica (alfa 0.01, gl n-2)	2.92	2.92

En la ambas curvas de calibración $t_{exp} > t_{teórica}$ con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, de manera que se rechaza H_0 y se considera que el intercepto es diferente de cero.

COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN CON MEMBRANA Y SIN MEMBRANA

• Prueba de F para varianzas de dos muestras

Se planteó la siguiente hipótesis:

H₀: No hay diferencia significativa entre las varianzas de las pendientes de las curvas de calibración de Clorhidrato de Lidocaina sin membrana y con membrana

H₁: Si hay diferencia significativa entre las varianzas de las pendientes de las curvas de calibración de Clorhidrato de Lidocaina sin membrana y con membrana

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{critica}$ no se rechaza H_0

Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza H_0

Parámetros estadísticos	Variable (ABC, CC sin membrana)
Media	3151.1944
Varianza	4808605.25
Observaciones	18
Grados de libertad	17
F	0.8990
P (F <=f) una cola	0.4146
Valor crítico para F (una cola)	0.4402

Ya que **0.8990 > 0.4402**, entonces se rechaza H_0 y se considera que las varianzas para las curvas de calibración de Clorhidrato de Lidocaina son desiguales.

- **Prueba de t de student para la pendiente de las curvas de calibración de Clorhidrato de Lidocaina con membrana y sin membrana**

Se estableció la siguiente hipótesis:

H₀: No hay diferencia significativa entre las pendientes de las curvas de calibración de Clorhidrato de Lidocaina sin membrana y con membrana

H₁: Si hay diferencia significativa entre las pendientes de las curvas de calibración de Clorhidrato de Lidocaina sin membrana y con membrana

Criterio de aceptación:

Si $t_{cal} < t_{critica}$ no se rechaza H₀

Si $t_{cal} > t_{critica}$ se rechaza H₀

	Variable (ABC, CC sin membrana)
Media	3151.1944
Varianza	4808605.25
Observaciones	18
Diferencia hipotética de las medias	0
Grados de libertad	34
Estadístico t	-0.4589
P (T <=t) una cola	0.3246
Valor crítico para t (una cola)	1.6909
P (T <=t) dos colas	0.6492
Valor crítico para t (dos colas)	2.0322

Debido a que $-0.4589 < -2.0322$, entonces no se rechaza H₀ y se considera que no hay diferencia significativa entre las pendientes de las curvas de calibración de Clorhidrato de Lidocaina

ANEXO III

Resultados de las permeaciones de Clorhidrato de Lidocaina sin promotor, con laureato de sacarosa (LS) y con oleato de sacarosa (OS)

a) Permeaciones realizadas a pH 7.0 sin promotor con piel entera (PE)

b) Permeaciones realizadas a pH 5.0, 7.0 y 9.0 con piel cortada con dermatoma (PCD)

- **Permeaciones pH 5.0**
- **Permeaciones pH 7.0**
- **Permeaciones pH 9.0**
- **Comparación estadística de la cantidad de principio activo acumulado en el compartimento receptor a las 8 hrs. durante las permeaciones del Clorhidrato de Lidocaina sin promotor, con LS y con OS**
- **Comparación estadística de la cantidad de principio activo retenido en el tejido durante las permeaciones del Clorhidrato de Lidocaina sin promotor, con LS y con OS**

A) PERMEACIONES REALIZADAS A PH 7.0 SIN PROMOTOR CON PIEL ENTERA (PE)

Q acum. (µg)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Promedio	desvest	% Error (c.v.)
1	31.7945	71.1341	24.4752	42.4680	25.0939	59.0891
2	174.8757	304.1671	68.3087	182.4506	118.1115	64.7362
3	250.2210	397.2950	117.1697	254.8952	140.1211	54.9721
4	274.2665	420.9967	179.6094	291.6242	121.6267	41.7065
5	305.8104	446.3528	282.9786	345.0473	88.4728	25.6410
6	340.8492	454.2844	353.2104	382.7813	62.2311	16.2576
7	385.2771	493.5701	390.3118	423.0530	61.1215	14.4477
8	403.0417	498.3433	429.7694	443.7182	49.1582	11.0787

membrana	3680.1286	2891.9113	1607.8113	2726.6171	1046.0002
-----------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

r²	0.9901	0.9701	0.9688
b	148.6645	336.9523	-63.8067
m (µg/h)	32.3479	20.8827	64.7239
m/A (µg/hcm²)	40.6043	26.2128	81.2441

Area= 0.7967 cm²

Promedio= 49.3537 (µg/h)

Desvest= 28.5399

J= 49.3537 ± 28.5399 µg/hcm²

- **Intervalo de horas utilizadas para la regresión: 3-8**
- **Las permeaciones a pH 5.0 y 9.0 con piel entera no se pudieron cuantificar**
- **El flujo es el cociente entre el promedio de las pendientes de cada una de las celdas y el promedio del área de las mismas**
- **Todas las permeaciones se realizaron por sextuplicado; de todos los datos obtenidos, solo se eligieron las celdas que presentaban un comportamiento parecido**

B) PERMEACIONES REALIZADAS A PH 5.0, 7.0 Y 9.0 CON PCD

- Permeaciones a pH 5.0 sin promotor

Q acum. (µg)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Prom	desvest
1	0.0000	0.0000	151.5984	128.0441	66.4530	69.2191	70.4219
2	0.0000	0.0000	189.7067	231.0858	66.4530	97.4491	107.6146
3	0.0000	290.9801	276.8006	351.6968	144.6520	212.8259	140.9153
4	198.4931	480.4063	334.8465	429.8386	211.5498	331.0269	126.4244
5	304.0482	564.1579	444.2482	587.1048	425.1433	464.9405	114.7459
6	456.2343	698.8375	508.4950	678.7811	644.6811	597.4058	108.3741
7	633.5520	747.6991	612.3680	847.7050	793.4087	726.9466	101.5890
8	807.6646	797.9683	612.3680	1053.9140	894.4280	833.2686	160.5643

memb	1152.3854	950.4620	590.3662	1417.4985	821.9292	986.5283	315.6667
------	-----------	----------	----------	-----------	----------	----------	----------

r ²	0.9152	0.9507	0.9887	0.9926	0.9168
b	-217.8350	-161.6956	47.2472	-5.0750	-180.7820
m (µg/h)	111.3276	139.7839	78.1190	117.4922	129.2077
m/A (µg/hcm ²)	139.7429	175.4625	98.0582	147.4810	162.1867

$$\text{Area} = 0.7967 \text{ cm}^2$$

$$\text{Promedio} = 144.5862 \text{ (µg/h)}$$

$$\text{Desvest} = 29.4101$$

$$J = 144.5862 \pm 29.4101 \text{ µg/hcm}^2$$

- Intervalo de horas utilizadas para la regresión: 1-7

- **Permeaciones a pH 5.0 con laureato de sacarosa**

Q acum. (µg)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Prom.	desvest
1	3421.9606	1360.0884	196.5880	1659.5457	1633.4054
2	5887.5391	4561.6099	1009.8040	3819.6510	2522.0928
3	6718.3731	5502.1621	2143.7239	4788.0864	2369.4476
4	8136.6150	9069.3634	3960.7329	7055.5704	2720.4814
5	8969.8247	10601.5613	4726.3833	8099.2565	3032.7951
6	9880.6461	12138.0140	6249.7402	9422.8001	2970.7170
7	10240.5230	12973.6368	7293.4634	10169.2078	2840.7581
8	11213.0379	14369.4120	8918.2105	11500.2201	2736.9243

memb	339.8485	749.1548	695.9962	594.9998	222.5603
------	----------	----------	----------	----------	----------

r ²	0.9528	0.9668	0.9943
b	3418.0745	541.7049	-1342.3131
m (µg/h)	1031.2201	1840.0613	1256.5875
m/A (µg/hcm ²)	1294.4293	2309.7196	1577.3196

Area= 0.7967 cm²

Promedio= 1727.1561 (µg/h)

Desvest= 523.9674

J= 1727.1561 ± 523.9674 µg/hcm²

- Intervalo de horas utilizadas para la regresión: 1-8

• **Permeaciones a pH 5.0 con oleato de sacarosa**

Q acum. (µg)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Prom.	desvest
1	0.0000	731.1422	1046.9760	592.7061	537.0411
2	342.3818	1335.6446	1530.7515	1069.5926	637.2938
3	870.3556	1652.9602	2643.1254	1722.1471	888.4077
4	1432.0921	2120.8775	3117.6929	2223.5542	847.4783
5	1709.2215	2379.7445	3246.0367	2445.0009	770.4830
6	1981.9942	2681.1046	3526.8664	2729.9884	773.5953
7	2656.1242	3064.5266	3844.6986	3188.4498	603.8998
8	3528.7545	3594.6454	4371.4753	3831.6250	468.6834

memb	473.4148	452.7719	373.1048	433.0972	52.9702
-------------	----------	----------	----------	----------	---------

r²	0.9775	0.9905	0.9371
b	-571.4223	479.0682	900.5530
m (µg/h)	474.7862	381.3361	447.8666
m/A (µg/hcm²)	595.9708	478.6685	562.1803

Area= 0.7967 cm²

Promedio= 545.6066(µg/h)

Desvest= 60.3819

J= 545.6066 ± 60.3819µg/hcm²

- **Intervalo de horas utilizadas para la regresión: 1-8**

• **Permeaciones a pH 7.0 sin promotor**

Q acum. (µg)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Prom.	desvest
1	199.0246	240.4674	320.7747	253.4222	61.9002
2	1479.8101	1347.7949	1668.0690	1498.5580	160.9581
3	2187.6543	1628.3681	1962.7748	1926.2657	281.4248
4	2710.5619	2164.1670	2309.5429	2394.7573	282.9894
5	2791.3897	2227.1302	2483.2349	2500.5849	282.5296
6	2858.1905	2423.3082	2596.5871	2626.0286	218.9309
7	2858.1905	2615.2966	2911.7937	2795.0936	157.9986
8	2900.4606	2783.4185	3060.4812	2914.7868	139.0858

memb	1076.8413	1533.5634	1628.0928	1412.8325	294.7906
------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

r ²	0.9019	0.9789	0.9778
b	2555.7998	1466.6624	1514.0667
m (µg/h)	44.6598	162.6670	193.0435
m/A (µg/hcm ²)	56.0588	204.1861	242.3161

Area= 0.7967 cm²

Promedio= 167.5203 (µg/h)

Desvest= 98.3932

J= 167.5203± 98.3932 µg/hcm²

• Intervalo de horas utilizadas para la regresión: 4-8

• **Permeaciones a pH 7.0 con laureato de sacarosa**

Q acum. (µg)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Prom.	desvest
1	2738.3874	2057.6616	827.2185	1874.4225	968.6713
2	3896.7104	2540.4511	1817.0807	2751.4141	1055.7433
3	4851.7294	4198.0392	3422.6283	4157.4656	715.4140
4	6345.5996	6546.0216	4769.1587	5886.9266	973.1886
5	7557.5827	9232.0392	6831.1556	7873.5925	1231.2421
6	8449.5781	10134.2043	8992.1866	9191.9897	859.9025
7	9220.5397	11193.0689	9977.7453	10130.4513	995.0916
8	10676.5958	12450.7441	11428.7825	11518.7074	890.4861

memb	457.2924	564.8187	2193.8332	1071.9814	973.0385
-------------	----------	----------	-----------	-----------	----------

r^2	0.9954	0.9749	0.9924
b	1671.0832	-18.9630	-1158.8060
m (µg/h)	1121.3349	1625.1093	1592.6779
m/A (µg/hcm²)	1407.5450	2039.9030	1999.1938

Area= 0.7967 cm²

Promedio= 1815.5473(µg/h)

Desvest= 353.9261

J= 1815.5473± 353.9261 µg/hcm²

- Intervalo de horas utilizadas para la regresión: 1-8

- **Permeaciones a pH 7.0 con oleato de sacarosa**

Q acum. (μg)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Prom	desvest
1	417.2074	184.8798	282.7811	276.6220	290.3726	95.6774
2	963.1118	411.5842	559.2598	643.6254	644.3953	233.1164
3	1881.6428	1198.3387	1251.5506	1395.2873	1431.7048	311.2800
4	2212.6941	1487.3505	1612.4666	1705.1398	1754.4128	318.2874
5	2418.3430	1915.8019	1900.6190	2151.1375	2096.4754	243.3032
6	2917.1946	2531.5335	2415.0832	2396.8207	2565.1580	242.1571
7	3322.4418	2913.2902	3286.2749	2843.0333	3091.2600	248.1704
8	3396.6007	3345.3224	3815.6356	3119.6552	3419.3035	290.3198

memb	433.6979	1002.4989	539.4295	550.2350	631.4653	252.8813
------	----------	-----------	----------	----------	----------	----------

r^2	0.9662	0.9891	0.9769	0.9834
b	138.8666	-357.1163	-294.7373	-78.5441
m ($\mu\text{g/h}$)	470.0203	469.3783	477.5427	427.1955
m/A ($\mu\text{g/hcm}^2$)	589.9886	589.1827	599.4310	536.2331

Area= 0.7967 cm^2

Promedio= 578.7088 ($\mu\text{g/h}$)

Desvest= 28.6968

J= 578.7088 \pm 28.6968 $\mu\text{g/hcm}^2$

- Intervalo de horas utilizadas para la regresión: 1-7

• **Permeaciones a pH 9.0 sin promotor**

Q acum. (µg)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Prom	desvest
1	895.1466	975.3584	521.4210	1180.8763	699.2118	854.4028	253.8880
2	1221.4656	1243.5648	1037.9629	1751.8954	1229.7669	1296.9311	267.9137
3	1707.6966	1634.6466	1785.6388	2321.6731	1848.3640	1859.6038	270.5489
4	2066.8573	2033.2994	2542.6473	2732.6660	2433.6128	2361.8166	304.2648
5	2263.9121	2107.2434	2937.6631	2962.0660	2749.1152	2604.0000	394.6605
6	2717.0030	2283.4494	3155.9445	3000.6586	2886.0926	2808.6296	334.5568
7	3022.2128	2524.9194	3454.3535	3122.8883	3119.4012	3048.7550	335.4493
8	3276.3951	2874.7511	3764.2214	3158.9318	3258.4276	3266.5454	321.2973

memb	1473.5924	1287.0460	1205.3741	2474.8337	1199.7068	1528.1106	540.6887
------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------

r ²	0.9904	0.9582	0.9712	0.9252	0.9620
b	552.4353	759.9126	34.0069	1010.9309	366.5908
m (µg/h)	359.8795	272.2898	560.8208	375.4405	459.3628
m/A (µg/hcm ²)	451.7353	341.7892	703.9649	471.2681	576.6108

Area= 0.7967 cm²

Promedio= 509.0737 (µg/h)

Desvest= 137.1540

J= 509.0737± 137.1540 µg/hcm²

- Intervalo de horas utilizadas para la regresión: 1-6

• **Permeaciones a pH 9.0 con laureato de sacarosa**

Q acum. (µg)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4	Celda 5	Prom.	desvest
1	0.0000	101.7479	87.3335	35.4346	18.4373	48.5906	44.0740
2	396.6080	350.2301	179.9985	95.8875	238.4703	252.2389	122.7790
3	691.1097	526.6649	478.9701	398.8379	520.0786	523.1322	106.8148
4	909.7077	763.6513	752.2986	668.1988	697.0280	758.1769	93.3560
5	1256.0174	1081.1398	996.7366	927.6335	963.5242	1045.0103	130.9360
6	1534.4109	1428.5090	1207.6575	1068.3834	1156.8701	1279.1662	194.9053
7	1642.9909	1551.4603	1543.9022	1283.1385	1510.0816	1506.3147	134.1204
8	1790.2445	1574.6244	1752.6674	1485.1196	1723.0398	1665.1391	129.6775

memb	523.1191	919.7969	918.4229	840.2556	1059.2131	852.1615	200.1538
------	----------	----------	----------	----------	-----------	----------	----------

r^2	0.9778	0.9742	0.9936	0.9896	0.9964
b	-131.6410	-113.7809	-245.0914	-237.8201	-243.0129
m (µg/h)	257.6171	230.2298	248.8971	218.4776	243.6565
m/A (µg/hcm ²)	323.3715	288.9938	312.4257	274.2420	305.8475

Area= 0.7967 cm²

Promedio= 300.9761(µg/h)

Desvest= 19.4593

J= 300.9761± 19.4593 µg/hcm²

- Intervalo de horas utilizadas para la regresión: 1-8

- **Permeaciones a pH 9.0 con oleato de sacarosa**

Q acum. (µg)

Tiempo (h)	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Prom.	desvest
1	849.1681	0.0000	1627.9384	825.7022	814.2229
2	1379.7315	833.7448	2123.4092	1445.6285	647.3526
3	2922.2523	1951.5729	3838.7673	2904.1975	943.7267
4	3772.4691	2380.9167	4839.6199	3664.3352	1232.9132
5	5030.6679	3500.1772	6468.3206	4999.7219	1484.3137
6	6193.1089	4855.9858	7782.0539	6277.0495	1464.8389
7	7248.1234	6131.2246	8829.3695	7402.9058	1355.7156
8	7248.1234	6373.0207	10171.9289	7931.0243	1989.3947

memb	240.0524	347.7156	200.7502	262.8394	76.0864
------	----------	----------	----------	----------	---------

r ²	0.9798	0.9861	0.9941
b	-234.1203	-1082.2613	-11.0542
m (µg/h)	1014.3502	963.4648	1271.3845
m/A (µg/hcm ²)	1273.2534	1209.3801	1595.8933

Area= 0.7967 cm²

Promedio= 1359.5089(µg/h)

Desvest= 207.1910

J= 1359.5089 ± 207.1910 µg/hcm²

- Intervalo de horas utilizadas para la regresión: 1-8

- **Comparación estadística de la cantidad de principio activo acumulado en el compartimento receptor a las 24 hrs. durante las permeaciones del Clorhidrato de Lidocaína sin promotor, con LS y OS**

Permeación pH 5.0

Muestras	Sin promotor	Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa	suma
Celda 1	807.6646	3528.7545	11213.0379	15549.4569
Celda 2	797.9683	3594.6454	14369.4120	18762.0257
Celda 3	612.3680	4371.4753	8918.2105	13902.0537
Celda 4	1053.9140			1053.9140
Celda 5	894.4280			894.4280
suma	4166.3429	11494.8751	34500.6603	50161.8783
suma2	17358412.9964	132132154.1583	1190295561.9389	2516214036.3674

T=	50161.8783
T2=	2516214036.3674
N=	11
j=	3
n=	5,3,3

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor de F crítico
Entre permeaciones	215534190.7195	2.0000	107767095.359 7	55.5359	4.4590 (0.05,2,8)
Dentro de las permeaciones	15523961.3108	8.0000	1940495.1639		
Total	231058152.0303	10.0000			

Ho: No hay diferencia significativa entre las cantidades de principio activo acumulada en el compartimento receptor a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

H1: Si hay diferencia significativa entre las cantidades de principio activo acumulada en el compartimento receptor a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{critica}$ no se rechaza **Ho**

Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza **Ho**

Dado que $55.5359 > 4.4590$ se rechaza **Ho** y por lo tanto si hay diferencia significativa entre las cantidades de CL acumulado en el compartimento receptor a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con OS y con LS.

Prueba de Duncan

Cantidad acumulada de CL a las 8 hrs. (µg)

	Sin promotor	Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa
Promedio	833.2686	3831.6250	11500.2201
desvest	160.5643	468.6834	2736.9243

sp	1393.0166
df	8.0000

Para muestras de	2	3
Rango de significancia	3.2600	3.3900
Rango mínimo significativo	4541.2340	4722.3262

Sin promotor	Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa
833.2686	3831.6250	11500.2201

con laureato – sin promotor	10666.9515 vs. 4722.3262	Diferencia significativa
con laureato – con oleato	7668.5951 vs. 4541.2340	Diferencia significativa
con oleato – sin promotor	2998.3565 vs. 4541.2340	Diferencia no significativa

Permeación pH 7.0

Muestras	Sin promotor	Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa	suma
Celda 1	2900.4606	3396.6007	10676.5958	16973.6571
Celda 2	2783.4185	3345.3224	12450.7441	18579.4850
Celda 3	3060.4812	3815.6356	11428.7825	18304.8992
Celda 4		3119.6552		3119.6552
Celda 5				
suma	8744.3603	13677.2139	34556.1223	56977.6965
suma2	76463836.6690	187066180.6067	1194125589.8429	3246457900.5324

T=	56977.6965
T2=	3246457900.532
N=	10
j=	3
n=	3,4,3

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor de F crítico
Entre permeaciones	145650563.935 7	2	72825281.9679	271.5223	4.7374 (0.05, 2, 7)
Dentro de las permeaciones	1877477.3868	7	268211.0553		
Total	147528041.3	9			

H₀: No hay diferencia significativa entre las cantidades de principio activo acumulada en el compartimento receptor a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

H₁: Si hay diferencia significativa entre las cantidades de principio activo acumulada en el compartimento receptor a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{critica}$ no se rechaza H_0

Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza H_0

Dado que $271.5223 > 4.7374$ se rechaza H_0 y por lo tanto si hay diferencia significativa entre las cantidades de Clorhidrato de Lidocaina acumulada en el compartimento receptor a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con laureato de sacarosa y con oleato de sacarosa

Prueba de Duncan

Cantidad acumulada de CL a las 8 hrs. (µg)

	Sin promotor	Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa
Promedio	2914.7868	3419.3035	11518.7074
desvest	139.0858	290.3198	890.4861

sp	517.890968
df	7

Para muestras de	2	3
Rango de significancia	3.35	3.47
Rango mínimo significativo	1734.93474	1797.08166

Sin promotor	Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa
2914.7868	3419.3035	11518.7074

con laureato – sin promotor 8603.9206 vs. 1797.0817 Diferencia significativa
con laureato – con oleato 8099.4039 vs. 1734.9347 Diferencia significativa
con oleato – sin promotor 504.5168 vs. 1734.9347 Diferencia no significativa

Permeación pH 9.0

Muestras	Sin promotor	Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa	suma
Celda 1	3276.3951	7248.1234	1790.2445	12314.7629
Celda 2	2874.7511	6373.0207	1574.6244	10822.3962
Celda 3	3764.2214	10171.9289	1752.6674	15688.8177
Celda 4	3158.9318		1485.1196	4644.0514
Celda 5	3258.4276		1723.0398	4981.4673
suma	16332.7269	23793.0729	8325.6957	48451.4955
suma2	266757966.5994	566110319.8773	69317208.3526	2347547412.7125

T=	48451.49546
T2=	2347547413
N=	13
j=	3
n=	5,3,5

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor de F crítico
Entre permeaciones	75337904.7409	2	37668952.3704	44.8676	4.1028 (0.5,2,10)
Dentro de las permeaciones	8395575.1309	10	839557.5131		
Total	83733479.8717	12			

H₀: No hay diferencia significativa entre las cantidades de principio activo acumulada en el compartimento receptor a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

H₁: Si hay diferencia significativa entre las cantidades de principio activo acumulada en el compartimento receptor a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{critica}$ no se rechaza **H₀**

Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza **H₀**

Dado que **44.8676** > **4.1028** se rechaza **H₀** y por lo tanto si hay diferencia significativa entre las cantidades de Clorhidrato de Lidocaina acumulado en el compartimento receptor a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

Prueba de Duncan

Cantidad acumulada de CL a las 8 hrs. (µg)

	Sin promotor	Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa
Promedio	3266.5454	7931.0243	1665.1391
desvest	321.2973	1989.3947	129.6775

sp	916.273711
df	10

Para muestras de	2	3
Rango de significancia	3.15	3.3
Rango mínimo significativo	2886.2622	3023.7033

Con laureato de sacarosa	Sin promotor	Con oleato de sacarosa
1665.1391	3266.5454	7931.0243

con laureato – sin promotor 1601.4062 vs. 2886.2622 Diferencia no significativa
con laureato – con oleato 6265.8852 vs. 3023.7033 Diferencia significativa
con oleato – sin promotor 4664.4789 vs. 2886.2622 Diferencia significativa

- **Comparación estadística de la cantidad de principio activo retenido en el tejido durante las permeaciones del Clorhidrato de Lidocaina sin promotor, con LS y con OS**

Permeación pH 5.0

Muestras	Sin promotor	Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa	suma
Celda 1	1152.3854	473.4148	339.8485	1965.6488
Celda 2	950.4620	452.7719	749.1548	2152.3887
Celda 3	590.3662	373.1048	695.9962	1659.4672
Celda 4	1417.4985			1417.4985
Celda 5	821.9292			821.9292
suma	4932.6414	1299.2915	1784.9995	8016.9324
suma2	24330950.9808	1688158.5130	3186223.2681	64271205.7044

T=	8016.9324
T2=	64271205.7
N=	11
j=	3
n=	5,3,3

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor de F crítico
Entre permeaciones	648147.2410	2	324073.6205	5.1516	4.4590 (0.05, 2, 8)
Dentro de las permeaciones	503259.8587	8	62907.4823		
Total	1151407.0997	10			

H₀: No hay diferencia significativa entre las cantidades de principio activo acumulada en el tejido a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

H₁: Si hay diferencia significativa entre las cantidades de principio activo acumulada en el tejido a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{critica}$ no se rechaza H_0

Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza H_0

Dado que $5.1516 > 4.4590$ se rechaza H_0 y por lo tanto si hay diferencia significativa entre las cantidades de CL acumulado en el tejido a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con OS y con LS

Prueba de Duncan

Cantidad acumulada de CL a las 8 hrs. (µg)

	Sin promotor	Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa
Promedio	986.5283	433.0972	594.9998
desvest	315.6667	52.9702	222.5603

sp	250.8136
df	8

Para muestras de	2	3
Rango de significancia	3.26	3.39
Rango mínimo significativo	817.652469	850.258242

Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa	Sin promotor
433.0972	594.9998	986.5283

con laureato – sin promotor 391.5284 vs. 817.6525 Diferencia no significativa
con laureato – con oleato 161.9027 vs. 817.6525 Diferencia no significativa
con oleato – sin promotor 553.4311 vs. 850.2582 Diferencia no significativa

Permeación pH 7.0

Muestras	Sin promotor	Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa	suma
Celda 1	1076.8413	433.6979	457.2924	1967.8316
Celda 2	1533.5634	1002.4989	564.8187	3100.8810
Celda 3	1628.0928	539.4295	2193.8332	4361.3554
Celda 4		550.2350		550.2350
Celda 5				
suma	4238.4974	2525.8613	3215.9443	9980.3030
suma2	17964860.4996	6379975.1868	10342297.5682	99606447.6446

T=	9980.302984
T2=	99606447.64
N=	10
j=	3
n=	3,4,3

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor de F crítico
Entre permeaciones	1070068.3882	2	535034.1941	1.6577	4.7374 (0.05, 2, 7)
Dentro de las permeaciones	2259257.8077	7	322751.1154		
Total	3329326.1959	9			

H₀: No hay diferencia significativa entre las cantidades de principio activo acumulada en el tejido a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

H₁: Si hay diferencia significativa entre las cantidades de principio activo acumulada en el tejido a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{critica}$ no se rechaza H_0

Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza H_0

Dado que $1.6577 < 4.7374$ no se rechaza H_0 y por lo tanto no hay diferencia significativa entre las cantidades de Clorhidrato de Lidocaina acumulado en el tejido a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

Prueba de Duncan

Cantidad acumulada de CL a las 8 hrs. (µg)

	Sin promotor	Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa
Promedio	1412.8325	631.4653	1071.9814
desvest	294.7906	252.8813	973.0385

sp	568.1119
df	7

Para muestras de	2	3
Rango de significancia	3.35	3.47
Rango mínimo significativo	1903.17482	1971.34825

Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa	Sin promotor
631.4653	1071.9814	1412.8325

con laureato – sin promotor 340.8511 vs. 1903.1748 Diferencia no significativa
con laureato – con oleato 440.5161 vs. 1903.1748 Diferencia no significativa
con oleato – sin promotor 781.3672 vs. 1971.3483 Diferencia no significativa

Permeación pH 9.0

Muestras	Sin promotor	Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa	suma
Celda 1	1473.5924	240.0524	523.1191	2236.7639
Celda 2	1287.0460	347.7156	919.7969	2554.5586
Celda 3	1205.3741	200.7502	918.4229	2324.5471
Celda 4	2474.8337		840.2556	3315.0893
Celda 5	1199.7068		1059.2131	2258.9199
suma	7640.5530	788.5182	2361.3389	10790.4101
suma2	58378050.0818	621760.9712	5575921.5223	116432950.8576

T=	10790.4101
T2=	116432950.8576
N=	13
j=	3
n=	5,3,5

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor de F crítico
Entre permeaciones	3126604.2440	2	1563302.1220	11.6560	4.1028 (0.5,2,10)
Dentro de las permeaciones	1341201.3768	10	134120.1377		
Total	4467805.6208	12			

H₀: No hay diferencia significativa entre las cantidades de principio activo acumulada en el tejido a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

H₁: Si hay diferencia significativa entre las cantidades de principio activo acumulada en el tejido a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{critica}$ no se rechaza **H₀**

Si $F_{cal} > F_{critica}$ se rechaza **H₀**

Dado que **11.6560 > 4.1028** se rechaza **H₀** y por lo tanto si hay diferencia significativa entre las cantidades de Clorhidrato de Lidocaina acumulado en el tejido a las 8 hrs., durante las permeaciones sin promotor, con oleato de sacarosa y con laureato de sacarosa

Prueba de Duncan

Cantidad acumulada de CL a las 8 hrs. (µg)

	Sin promotor	Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa
Promedio	1528.1106	262.8394	852.1615
desvest	540.6887	76.0864	200.1538

sp	366.2242
df	10

Para muestras de	2	3
Rango de significancia	3.15	3.3
Rango mínimo significativo	1153.60611	1208.53974

Con oleato de sacarosa	Con laureato de sacarosa	Sin promotor
262.8394	852.1615	1528.1106

con laureato – sin promotor 675.9491 vs. 1153.6061 **Diferencia no significativa**
 con laureato – con oleato 589.3221 vs. 1153.6061 **Diferencia no significativa**
 con oleato – sin promotor 1265.2712 vs. 1208.5397 **Diferencia significativa**

IX. REFERENCIAS

1. Barry B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J. Cont. Rel.* 6 (1987) 85-97
2. Barry B. W. Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *J. Cont. Rel.* 15 (1991) 237-248
3. Turner, Norris G. Nonato, Lourdes B. Visualization of Stratum Corneum and Transdermal Permeation Pathways. In: Potts R. O., Guy R. H. *Mechanisms of Transdermal Drug Delivery*. Ed. Dekker. USA, 1997 Vol. 83 pp. 1-2, 34-35
4. Añache J. M. Devissaguet J. Ph. Guyot-Hermann A.M. *Biofarmacia*. Ed. El Manual Moderno. México, 1983 pp. 22-29, 127-128, 151-154, 380-382, 391
5. Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M., *Principles of Biochemistry*. Ed. Worth Publishers, 2ª edición. E. U. A., 1993 pp. 87, 242, 254, 272, 284
6. Wilkinson J B. More R J. *Cosmetología de Harry*. Ed. Diaz de santos. México, 1990. pp. 5-18
7. Jacob S.W. *Anatomía y fisiología humana*. Ed. Interamericana. 4ª edición. México, 1982. pp. 78 – 83
8. Acevedo Peña Juana. Estudio del efecto promotor de azona y 4-deciloxazolidin-2-ona sobre la absorción percutánea de tres fármacos con diferentes características de lipofilia, Tesis FES-C, UNAM. México. 1999 pp. 9
9. Jacob S. W. *Anatomía y fisiología humana*. Ed. Interamericana. 4ª edición. México, 1982 pp. 78-83
10. Naik, Aarti. Guy, R. H. Infrared Spectroscopic and Differential Scanning Calorimetric. Investigations of Stratum Corneum Barrier Function. In: Potts, R.O. Guy, R.H. *Mechanisms of Transdermal Drug Delivery*. Ed. Dekker. USA, 1997 Vol. 83 pp. 87-92
11. Gummer, Christopher L. The In vitro Evaluation of Transdermal Delivery. In: Hadgraft J., Guy R.H. *Transdermal Drug Delivery*. Ed. Dekker. USA, 1989 Vol. 35 pp. 193
12. Rietschel R. L., Spencer T. S. Skin permeation: In vitro Techniques. In: *Methods for cutaneous investigation*. Ed. Dekker. USA, 1990 Vol. 9 pp. 171 – 183
13. Francoeur, M. L., Golden, G. M., Potts R.O. Oleic acid: its effects in stratum corneum in relation to transdermal drug delivery. *Pharm. Res.* 7 (1990) 621-627
14. Clarke E. G. C. *Isolation and identification of drugs*. The pharmaceutical Press. 2ª edición. London, 1986 pp. 160-167, 705-706

15. Barry B. W. *Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption*. Ed Dekker. New York, 1983
16. Smith E. W., Maibach H. F. *Percutaneous Penetration Enhancers*. CRC Press. USA. 1995 pp. 2-14
17. Keneth A. Walters. *Penetration Enhancers and Their Use in Transdermal Therapeutic Systems*. In: Hadgraft J., Guy R. H. *Transdermal Drug Delivery*. Ed. Dekker. USA, 1989 Vol. 35 pp. 197-232
18. Marjukka Suhonen T., Bouwstra J. A., Urtti A., *Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations*. *J. Cont. Rel.* 59: 2 (1999) 149-161
19. E. -S. Park, S. -Y. Chang, M. Hanh, S. -Ch. Chi. *Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen*. *Int. J. Pharm.* 209 (2000) 109-119
20. Ogiso T., Shintani M. *Mechanism for the enhancement effect of fatty acids on the percutaneous absorption of propranolol*. *J. Pharm. Sci.* 79 (1990) 1065-1071
21. Gay C. L., Murphy T. M., Hadgraft J., Kellaway I. W., Evans J. C., Rowlands C. C. *And electron spin resonance study of skin penetration enhancers*. *Int. J. Pharm.* 49 (1989) 39-45
22. Ortiz A., Gomez-Fernandez J. *A differential scanning calorimetric study of the interaction of free acids with phospholipid membranes* *Chem. Phys. Lipids.* 45 (1987) 75-91
23. Golden G. M., Mckie J. E., Potts R.O., *Role of transdermal corneum lipid fluidity in transdermal drug Flux*. *J. Pharm. Sci.* 76 (1987b) 25-28
24. Mak V. H. W., Potts R. O., Guy R. H. *Oleic acid concentration and effect in human stratum corneum: non -invasive determination by attenuated total reflectance infrared spectroscopy in vivo*. *J. Cont. Rel.* 12(1990) 67-75
25. Verma S. P., Wallach D. F. H., Sukura J. D. *Raman analysis of the termotropic behavior of lecithin-fatty acid systems and of their interaction with proteolipid protein*. *Biochemistry* 19(1980) 574-579
26. Kitagawa S., Yokochi N., Murooka N. *pH-Dependence of phase transition of the lipid bilayer of liposomes of stratum corneum lipids*. *Int. J. Pharm.* 126(1995) 49-56
27. Ganem-Quintanar A. D. Quintanar G., Falson-Rieg F., Buri P. *Ex vivo oral mucosal permeation of lidocaine hydrochloride with sucrose fatty acid esters as absorption enhancers*. *Int. J. Pharm.* 173:203-210 (1998)
28. Ganem-Quintanar A., Kalia Y. N., Falson-Rieg F., Buri P. *Mechanisms of oral permeation enhancement* *Int. J. Pharm.* 156(1997) 127-142

29. Ganem-Quintanar A., F-Rieg F., F. Buri P. Contribution of lipid components to the permeability barrier of oral mucosa. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 44(1997) 107 – 120
30. Ganem-Quintanar A., Yves J., Falson-Rieg F., Buri P., Lipid extracting effect of ethanol on keratinized oral mucosa. *Pharm. Res.* (1997) 15-34
31. Sarpotdar P. P., Zatz J. L. Evaluation of Penetration Enhancement of Lidocaine by Nonionic Surfactants Through Hairless Mouse Skin In vitro. *J. Pharm. Sci.* Vol. 75, No. 2 (1986) 176-181
32. Zatz J. L. And Dalvi E. R., Evaluation of solvent-skin interaction in percutaneous absorption, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 34 (1983) 327 – 334
33. Ganem-Quintanar A., Lafforgue C., Falson-Rieg, F., Buri P., Evaluation of the transepidermal of diethylene glycol monoethyl ether and skin water loss. *Int. J. Pharm.* 147 (1997) 165-171
34. Rieg-Falson F., Huertas L., Blouquin P., Conrath G. and Couarraze G., Characterization of the enhancing effects of a vehicle in a transdermal system. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15 (1989) 2393-2406
35. Watkinson A. C., Hadgraft J. And Bye A., Aspects of the transdermal delivery of prostaglandins. *Int. J. Pharm.* 74 (1991) 229 – 236
36. Hadgraft J. And Walters K. A., Skin penetration enhancement. In de Boer. A. G. (Ed.), *Drug Absorption Enhancement*. Harwood, Switzerland 1994, pp 177-198
37. Touitou E., Levi-Schaffer F., Shaco-Ezra N., Ben-Yossef R. And Fabin B., Enhanced permeation of theophylline through the skin and its effect on fibroblast proliferation, *Int. J. Pharm.* 70 (1991) 159-166
38. Ayala B. H. A., Quintanar G. Kalia Y. N., Naik A., Cornejo-Bravo M., Ganem-Quintanar A., Effects of sucrose oleate and sucrose laurate on *in vivo* human stratum corneum permeability. *J. Pharm. Res.* (en impresión).
39. Ristchel W. A. and Rhussain. A. S., Influence of selected solvents on penetration of griseofulvin in rat skin, *in vitro*. *Pharm. Ind.* 50 (1988) 483-486
40. Ryoto sugar ester technical information. Mitsubishi-Kasei Food Corporation, 1987
41. Perotti A. G. Sucrose esters in food products. *IFFA.* (1977) 149 – 152
42. T. Baba, K. Namiki, S. Maeda: *Kogyo Kagaku Zasshi* 67 2081(1964)
43. Yamada M., Uda Y., Enhancement of percutaneous absorption of molsidomina. *Chem. Pharm. Bull.* 35 (1987) 3390
44. Certificate of analysis, Gattefossé Corporation. Francia, 1999.

45. Priborsky J., Muhlbachova E., Evaluation of in vitro percutaneous absorption across human skin and in animal models. *J. Pharm. Pharmacol.* 42:7 (1990) 468-472
46. Dick I. P., Scott R. C., Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. *J. Pharm. Pharmacol.* 44:8 (1992) 640-64
47. Tanojo H., Bouwstra J. A., Junginger H. E., Bodde H. E., In vitro human skin barrier modulation by fatty acids: Skin permeation and thermal analysis studies. *Pharm. Res.* 14:1 (1997) 42-49
48. S. Andega, N. Kanikkannan, M. Sing. Comparison of the effect of fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. *J. Cont. Rel.* 77:1-2 (2001) 17-25
49. Walters K. A., Olejnik O., Harris S., Influence of nonionic surfactant on the permeation of ionized molecules through hairless mouse skin. *J. Pharm. Pharmacol.* 36(1984) 78P
50. Nakada Y., Awata N., Nakamichi C., Sugimoto I., The effect of additives on the oral mucosal absorption of human calcitonin in rats. *J. Pharmacobio-Dyn.* 11(1988) 395-401