



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTUDIO DEL TRANSPORTE DE SUSTANCIAS POR VIA
CUTANEA O MUCOSAL

ESTUDIO DE LA PENETRACION DE FENAZOPIRIDINA A
PARTIR DE MUESTRAS EN POLVO A TRAVES DE PIEL
"EX VIVO"

**EL INFORME DE SERVICIO SOCIAL
T I T U L A C I O N
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ALBERTO SANCHEZ CHAVEZ**

ASESORA DE TESIS: DRA. ADRIANA GANEM RONDERO



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.



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
 PRESENTE

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:

El Informe de Servicio Social: Estudio del Transporte de Sustancias por Vía Cutánea o Mucosal. Estudio de Penetración de Fenazopiridina a Partir de Muestras en Polvo a Través de Piel "Ex Vivo".

que presenta el pasante: Alberto Sánchez Chávez
 con número de cuenta: 9555681-1 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Diciembre de 2003

PRESIDENTE	<u>QFI. Leticia Zúñiga Ramírez</u>	
VOCAL	<u>MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Adriana Ganem Rondero</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. Norma L. Delgado Buenrostro</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MFC. Beatriz de Jesús Maya Monroy</u>	

DEDICATORIAS:

Madre: Gracias por haberme engendrado, brindarme tanto amor, comprensión, ternura y consejos que me diste, ya que me motivaron y ser fuerte para lograr lo que me propongo y es por esta razón que este proyecto va dedicado para Ti mamá.

Padre: Gracias por ser mi papá y mi mejor amigo, por todo el apoyo, confianza, lealtad, y consejos que en el transcurso de mi vida me has aportado, ya que eres mi mejor ejemplo que puedo tomar en la vida, por esas cosas te dedico este proyecto.

Hermanos: Gracias a mis hermanos por su apoyo, confianza, lealtad por lo cual les dedico este proyecto, como un ejemplo de que si se puede realizar lo que quieren, ya que si tienen perseverancia y fe en lo que se propongan, más vale tarde que nunca siempre; hay que terminar lo que uno empieza.

AGRADECIMIENTOS:

Dra. Adriana Ganem Rondero le agradezco la oportunidad que me brindo al realizar este proyecto y también por su gran tolerancia, confianza, apoyo y consejos.

Dr.: David Quintanar le agradezco los consejos y la ayuda que me brindo durante este proyecto.

Sinodales: Leticia Suñiga, Ma. Eugenia, Norma Laura y Beatriz de Jesús por sus aportaciones para culminar este proyecto.

Ing.: Draucin Jiménez del taller de soplado de vidrio de la F.E.S. – Cuautitlan por su ayuda en la elaboración de las celdas de permeación.

Sta.: Araceli Mora Ángeles por ser una parte importante en mi vida, te agradezco tu ayuda incondicional ya que sin tu cooperación y consejos no hubiera culminado este proyecto.

Compañeros Finalmente a mis compañeros de laboratorio en especial a Lupita, Gisela, Marina, Miriam, Luis y Jennifer por el gran apoyo incondicional y ayuda para culminar mi proyecto satisfactoriamente

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
Abs	Absorbancia
Pa	Absorción Percutánea
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
HLB	Balance hidrofílico y lipofílico
C.Vis	Campo Visible
Cc	Centímetro Cúbicos
CF	Clorhidrato de Fenazopiridina
r^2	Coefficiente de correlación
Kp	Coefficiente de Permeabilidad
CV	Coefficiente de Variación
vs	Contra
Desv. Std.	Desviación Estándar
SC	Estrato Córneo
Ex	Ex vivo (sin vida)
Fco	Fármaco
FNH	Factores Naturales de Hidratación
Fig.	Figura
RI	Índice de refracción
kg	Kilogramos
β	Letra griega denominada Beta
LCI	Límite de Confianza Inferior
LCS	Límite de Confianza Superior
λ	Longitud de Onda
MP	Materias Primas
m	Metro
μg	Microgramo

Mm	Milímetros
∞	Nivel de Significancia
No.	Número
<i>b</i>	Ordenada al origen
<i>m</i>	Pendiente
PA	Principio Activo
P.P.	Promotor de Permeación
SIP	Sistema Inmune de la Piel
STT	Sistema Terapéutico Transdermal
SNC	Sistema Nervioso Central
UV/Vis	Ultravioleta y Visible

Índice de Figuras

Figura

No.	Título	Página
1	Corte Transversal de la Piel.....	3
2	Corte histológico de la piel mostrando la epidermis y sus capas: <i>Capa Córnea</i> , <i>2 Capa Lúcida</i> , <i>3 Capa Granulosa</i> , <i>4 Capa Espinosa</i> , <i>5 Capa Basal</i> y <i>6 Membrana Basal</i>	6
3	<i>Corte transversal de la piel mostrando en detalle las siguientes estructuras Epidermis</i> , <i>2 Dermis</i> , <i>3 Subcutis</i> , <i>4 Tallo del pelo ó Folículo piloso</i> , <i>5 Glándula sebácea</i> , <i>6 Glándula sudorípara</i> , <i>7 Stratum papillare</i> , <i>8 Membrana basal</i> y <i>9 Células basales</i>	10
4	Microfotografía electrónica de células córneas descamadas....	15
5	Representación esquemática de la capa córnea: el Modelo del Cemento y Ladrillos.....	16
6	Estructura de las membranas celulares.....	17
7	Estructura química del Clorhidrato de Fenazopiridina.....	36
8	Ilustración del procedimiento de la "Técnica de Tape Stripping".....	50-51
9	Espectro del CF en Octanol.....	54
10	Curvas de Calibración del CF Con Piel y Sin Piel.....	55
11	Histogramas de las cantidades de CF (μg) en un tiempo de exposición de 40 min.....	57
12	Histogramas de las cantidades de CF (μg) en un tiempo de exposición de 100 min.....	57
13	Histogramas de las cantidades de CF (μg) en un tiempo de exposición de 180 min.....	58
14	Histogramas de las cantidades de CF (μg) en un tiempo de exposición de 180 min. para la prueba de lavado drástico.....	59
15	Máximas Cantidades de Penetración del SC a los Diferentes tiempos de Contacto.....	59

16	Distancias Acumuladas de Penetración del SC a los Diferentes tiempos de Contacto.....	60
----	---	----

Figuras en los Anexos

	Curvas Independientes de calibración del CF con piel y sin piel.....	70
	Perfiles de Absorción de las Cantidades de CF Contenida en Piel de Cerdo en un tiempo de Exposición de 40 min.....	76
	Perfiles de Absorción de las Cantidades de CF Contenida en Piel de Cerdo en un tiempo de Exposición de 100 min.....	76
	Perfiles de Absorción de las Cantidades de CF Contenida en Piel de Cerdo en un tiempo de Exposición de 180 min.....	77
	Perfiles de Absorción de las Cantidades de CF Contenida en Piel de Cerdo en un tiempo de Exposición de 180 min. para la Prueba de lavado drástico.....	77

Índice de Tablas

Tabla

No.	Título	Página
1	Características fisiopatológicas de la piel.....	4
2	Microorganismos Comúnmente encontrados en cultivos de piel sana y su abundancia relativa.....	23
3	Coefficiente de partición del CF (octanol Buffer de Fosfatos pH 7.4).....	54
4	Resultados de regresión lineal de la Curvas de Calibración del CF sin piel y con piel	55
5	Límite de Detección de las Muestras de CF.....	56
6	Análisis de varianza para distancias acumuladas.....	60
7	Análisis de varianza para cantidades.....	61

I.- Introducción

Los principios activos constituyen una clase muy amplia de estructuras moleculares complejas y que durante el proceso de manufactura de medicamentos, al mezclarse con sus excipientes, pueden cambiar su estructura y también sus propiedades químicas, lo que puede favorecer una mayor absorción en piel. La exposición laboral a diferentes agentes químicos puede constituir grandes riesgos, sobre todo si el operador está expuesto de manera continua y prolongada durante el proceso de fabricación. Durante estos procesos pueden liberarse cientos de sustancias distintas que son una fuente contaminante importante a la que el ser humano y otras especies están expuestas si no se toman las medidas de seguridad pertinentes.

En la actualidad es de gran importancia prestar atención a la protección adecuada de los operadores y brindar la capacitación al trabajador sobre los riesgos y precauciones a tomar. En este trabajo se decidió trabajar con piel puesto que es el órgano más extenso y constituye la interfase con el medio ambiente. La piel representa no sólo la barrera para la entrada de un sin número de sustancias exógenas, sino que es una vía de administración para el tratamiento de enfermedades locales, así como para la liberación sistémica de fármacos. Se ha visto que la vía transdermal tiene ventajas sobre otras vías como la nasal u ocular por la baja actividad de enzimas contenidas en la piel, lo que hace posible evitar el metabolismo del primer paso hepático, pudiendo disminuir así la dosis administrada. Una desventaja que se puede observar para esta vía es su baja velocidad de permeación membranal para los fármacos.

Como agente permeante se eligió al CF, pues a pesar de ser un fármaco que normalmente se administra por vía oral, se ha constatado que se impregna en la piel de los operarios involucrados en la producción de la forma farmacéutica que la contiene. Está bien documentado que el CF puede ocasionar reacciones de fotosensibilidad.

El objetivo de esta tesis fue evaluar la capacidad de penetración del CF a través de la piel, evaluando la influencia del tiempo de contacto. Para ello, se realizaron pruebas de permeación en piel de cerdo, aplicando la técnica de "Tape Stripping" para construir los perfiles de penetración a través del estrato córneo.

Glosario

Auto esterilización: Proceso en el que la glándula sudorípara secreta sustancias tales como interferón, lisosimas, transferrinas y todos los tipos de inmunoglobulinas, inhibiendo el crecimiento en la superficie e impidiendo la proliferación de organismos oportunistas.

Ceramidas: Es la mezcla de lípidos complejos en la capa córnea, los cuales son responsables en primer instancia de la función de retención de humedad y formación de la barrera de permeabilidad de la piel

Cuerpos de Odland: Son pequeñas estructuras de los queratinocitos maduros. Las vacuolas de membrana cerrada en donde se almacenan sustancias precursoras de la barrera lipídica cutánea en forma de bicapas discoidales agrupadas.

Desmosomas: También conocidos como puentes de unión intercelular; constituidos por proteínas en forma de 3 tipos: filamentos de queratina, plaquinas, desmogleinas, estas unen células epidermales entre sí y a la dermis por medio de la membrana basal.

Difusión: Es la penetración molecular a través del movimiento espontáneo y al azar de moléculas individuales de gas, líquido o sólido en las diferentes regiones de la piel por medio de los poros intercelulares y reviste especial importancia a nivel del endotelio capilar.

Equilibrio hídrico: Es la hidratación ideal de la piel para desempeñar sus funciones vitales en el cuerpo humano, ya que el agua interviene en el metabolismo y característica funcional de cincuenta mil millones de células de nuestro organismo.

Linfa: Parecida a la sangre, es más abundante que ella, pero sólo contiene glóbulos blancos y su función principal es la nutrición de todas las células.

Mitosis: Es el proceso de división celular en la que las dos células resultantes obtienen exactamente la misma genética de la célula progenitora y se divide en diferentes etapas: interfase, profase, metafase, anafase y telofase.

Oliguria: Es el nombre que se le da a la disminución de la capacidad para formar y eliminar la orina. Eliminación de menos de 500 ml por día de orina.

Ósmosis: Fenómeno en donde el agua puede entrar por ósmosis causada por gradientes de concentración a través de membranas semipermeables de los organismos y también puede salir esta agua por el mismo fenómeno por la piel.

Parestesias: Sensación o conjunto de sensaciones anormales y especialmente de hormigueo, adormecimiento o ardor que experimentan en la piel ciertos enfermos.

Piodermia: Es el nombre que recibe la infección de la piel causada por bacterias.

Queratinopoyesis: Es el proceso por el cual un queratinocito se divide en la capa basal y sufre cambios estructurales como la formación de la queratina que es el más importante al ir a estratos superiores hasta llegar al estrato córneo y por último descamarse.

Seborrea: Término que hace referencia a cualquiera de las dermatosis en las que existe un aumento en la secreción grasa de las glándulas sebáceas de la piel.

Simbiosis: Asociación de individuos animales ó vegetales de diferentes especies en la que ambos asociados o simbioses sacan provecho de la vida en común. Como las bacterias banales que viven en la superficie de la piel.

Topografía: Se refiere a la diversidad y variaciones de color y también que existen en textura, grosor y espesor de piel en las diferentes regiones del mundo.

ÍNDICE

CONTENIDO	Página
Índice de Abreviaturas.....	I - II
Índice de Figuras.....	III-IV
Índice de Tablas.....	V
Introducción.....	VI - VII
Glosario.....	VIII - X
I.- Objetivos.....	1
II.- Marco Teórico.....	2
1.- La Piel.....	2
Características de la Piel.....	2
Componentes de la Piel.....	2
Funciones de la Piel.....	4
La Epidermis.....	5
La Dermis.....	9
Los Anexos Cutáneos.....	12
Descamación, Cornificación y Renovación de la Piel.....	14
El Modelo del Cemento y los Ladrillos.....	15
Formación y Función de los Lípidos epidérmicos.....	16
Composición de lípidos	17
Barrera de Permeabilidad.....	18
Factores Naturales Hidratantes.....	19
Mecanismo de Defensa de la piel.....	20
Flora Microbiana Normal de la Piel.....	22
2.- Absorción Percutánea.....	23
Teoría de Difusión.....	24
Ley de Fick	25
Factores que Influyen en el Paso a Través de la Piel.....	29
Diferencias Anatómicas de la Piel entre Especies Animales.....	31
3.- La Técnica del "Tape Stripping".....	32

4.- Características y Propiedades del Clorhidrato de Fenazopiridina	36
a) Descripción del CF.....	36
b) Propiedades Físicoquímicas del CF.....	36
c) Farmacología (farmacocinética y farmacodinamia).....	37
d) Indicaciones Terapéuticas y Usos del CF.....	38
e) Ventajas y Desventajas al Utilizar CF.....	39
f) Posología.....	40
g) Presentaciones.....	40
h) Efectos Colaterales ó Reacciones Adversas.....	41
.i) Alteraciones en los Resultados de Pruebas de Laboratorio.....	42
.j) Contraindicaciones.....	42
k) Precauciones Generales.....	43
l) Efectos de carcinogénesis, mutagenesis, teratogenesis y fertilidad	43
m) Manifestaciones y manejo (sobredosificación o ingesta accidental)	44
III.- Metodología.....	46
A) Material, Aparatos y Reactivos	46
B) Obtención de la Piel y Almacenamiento.....	47
C) Determinación de la Pureza del CF.....	47
D) Determinación de la Solubilidad del CF.....	47
E) Determinación del Coeficiente de Partición del CF a pH 7.4.....	48
F) Curva de Calibración para CF.....	48
G) Estudios de Penetración.....	49
H) Técnica de Muestreo del SC (Tape Stripping).....	50
I) Cuantificación del CF por Espectrofotometría.....	52
V.- Resultados y Análisis de Resultados.....	53
VI.- Conclusiones.....	63
VII.- Perspectivas.....	64
Agradecimientos.....	65
VIII.- Anexos.....	66
IX.- Referencias.....	78

I.- OBJETIVOS

Objetivo General de Trabajo:

- Estudiar la penetración del Clorhidrato de Fenazopiridina (CF) a través de la piel, mediante la técnica de "Tape Stripping", con el fin de determinar el efecto del tiempo de contacto sobre la distribución del principio activo (PA) en el estrato córneo.

Objetivos Particulares:

- Realizar estudios de permeación a través de piel de lomo del cerdo, empleando la técnica de "Tape Stripping" para obtener el perfil de penetración del CF.
- Evaluar el efecto del tiempo de contacto sobre la distancia de penetración y la cantidad total permeada.

Objetivos Académicos:

- Aprender las técnicas para estudiar la penetración de excipientes y principios activos empleados para la fabricación de medicamentos) a través de la piel.

Objetivo Social:

- Determinar el grado de absorción en piel del CF, ya que se ha demostrado que su absorción prolongada puede ser causa de intoxicación, produciendo algún daño al operador durante el proceso de manufactura del medicamento, debido a que se encuentra expuesto a este PA y que en algunos lugares no se cuenta con el equipo de protección adecuado.

II.- MARCO TEÓRICO

1.- La Piel

Características de la piel:

Es el órgano más grande y extendido del organismo que forma una capa protectora sobre el cuerpo humano. La extensión del órgano cutáneo es variable según la talla y la complexión del individuo. La piel de una persona de 70 kg que mide 1.70 m está cubierta por 1.85 m² de piel con un volumen de 4,000 cc, 2.2 mm de espesor como promedio. Su peso es de 4,200 kg que equivale al 6% de peso corporal, más del doble que el cerebro y el hígado; contiene 1,800 cc de sangre, un 30% de la sangre total del organismo, es pues el órgano más extenso, de mayor peso y volumen, si fuese extendida sobre una superficie plana cubriría un área de entre 1.5 y 1.9 m². (Remington, 1988, Mario, 1989, Aguilar et al, 1993 y Michael, 1998)

Componentes de la Piel:

La piel es uno de los órganos más complejos. Para darse cuenta de ello basta observar los siguientes datos: un centímetro cuadrado de piel posee 5 folículos pilosos, 15 glándulas sebáceas, 100 sudoríparas, 4 metros de nervios y un metro de vasos, 5,000 organelos sensitivos y 6 millones de células (Fig. 1).

Exteriormente la piel es rugosa y entre estas arrugas se encuentran áreas más elevadas que están salpicadas con las aperturas de los poros que secretan la perspiración a través de la misma.

El aparato pilosebáceo compuesto por pelo y glándula sebácea conforma una unidad estructural y funcional, compuesta por el tallo del pelo, glándula sebácea, bulbo piloso, papila pilosa y glándula sudorípara. Las glándulas sebáceas y sudoríparas son glándulas exócrinas. Las glándulas sebáceas se encuentran casi siempre unidas a los folículos pilosos. Las glándulas sudoríparas expulsan su secreción directamente sobre la superficie cutánea (Wintrobe et al, 1974, Fritsch, 1990, Acevedo, 1999 y Andrea, 2002)

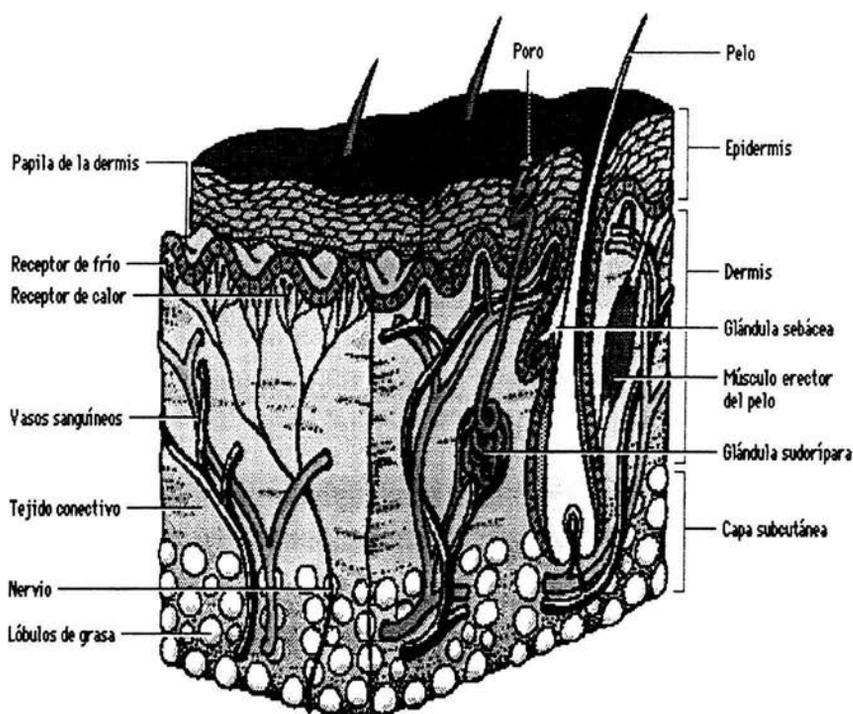


Figura No. 1 Corte Transversal de la Piel (Encarta, 2003).

Así como el color de la piel varía según la topografía, también hay variaciones de textura, grosor y espesor, ver la tabla No. 1 (Ronai et al, 2002). En los párpados es muy delgada y muy fina, en cambio en las palmas de las manos y sobre todo en las plantas de los pies es muy gruesa y áspera. También hay variaciones con respecto al sexo y a la edad. En la mujer la piel es muy fina y tersa con vello delgado, en el hombre es más gruesa, áspera y cubierta de vello más grueso y abundante. (Rémington, 1988, Mario, 1989 y Aguilar. et al, 1993)

Tabla No. 1 **Características fisiopatológicas de la piel**

REGION	CARACTERÍSTICAS
Palmas y plantas	Estrato córneo grueso. Barrera física. Sitio común de contacto a sustancias. Oclusión con ropa.
Áreas intertriginosas (axila, ingle, cuello, dedos, ombligo, genitales)	Humedad áreas ocluidas. Atrapa químicos. Aumenta absorción percutánea.
Cara	Se expone frecuentemente. Los lípidos de la superficie interactúan con sustancias hidrofóbicas.
Párpados	Substancias que frecuentemente se transportan con las manos. Función de barrera pobre, epidermis delgada. Sensible a irritantes.
Región retroauricular	Atrapa sustancias químicas. Oclusión
Piel cabelluda	Atrapa sustancias químicas. Folículo piloso

Funciones de la Piel

Es la cubierta exterior que reviste todo el cuerpo, no es como se cree una simple envoltura inerte, sino un órgano complejo anatómico y funcional ligado a la fisiología y patología de todo el organismo. Por su naturaleza es considerado como un tejido dinámico y en constante regeneración^(Mario, 1989, Aguilar et al, 1993, Michael et al, 1998 y Encarta, 2003)

Además de servir como barrera protectora contra el medio ambiente, regula la temperatura corporal, produce pigmentos y vitamina D, permite la percepción sensorial, cumple un papel importante en la regulación del equilibrio hídrico y puede ser un órgano importante en la eliminación de algunas sustancias tóxicas^(Aiache et al, 1983; Mario, 1989, Aguilar et al, 1993, Ortiz et al, 1999, Merk, 2000 y Encarta, 2003)

La piel, en anatomía es la parte del organismo que protege y cubre la superficie del cuerpo y se une, sin fisuras, con las membranas mucosas de los distintos canales (por ejemplo, el canal alimenticio) en los distintos orificios corporales. La piel forma una barrera fisiológica y revestimiento protector contra la acción de agentes físicos, químicos o bacterianos sobre tejidos más profundos, y contiene órganos especiales que suelen agruparse para detectar las distintas sensaciones, como sentido del tacto, temperatura y dolor.

Cumple un papel importante en el mantenimiento de la temperatura corporal gracias a la acción de las glándulas sudoríparas y de los capilares sanguíneos. En la regulación de la temperatura corporal participan los 4,5 m de capilares sanguíneos contenidos en cada 6,5 cm² de piel (Mario, 1989 y Encarta, 2003).

La piel está compuesta por cuatro capas: una capa externa llamada capa **Cornea**; la capa siguiente que es la **Epidermis** (cutis superficial) o piel verdadera; y la capa inferior llamada **Dermis** o corion (cutis profundo) en donde se encuentran los vasos sanguíneos, linfáticos y estructuras similares vitales para la salud y vida de la piel. Aquí también están algunas de las glándulas y las raíces de los folículos pilosos y finalmente la **Hipodermis** constituida básicamente por adipocitos (Fig. 1).

La parte superior de la epidermis está compuesta por células muertas que contienen queratina, la escleroproteína córnea que forma también el pelo y las uñas (Fig. 1) (Jacob, 1982 Michael et al, 1998 y Encarta, 2003).

La epidermis (cutis superficial)

La capa cutánea más exterior, la epidermis constituye la envoltura protectora natural frente al entorno. Su grosor medio es de 0.1 mm: en la cara sólo son 0.02 mm, en cambio en las plantas de los pies es de 1 a 5 mm (Jacob, 1982 y Michael et al, 1998).

Está constituida por varios estratos celulares, que forman en conjunto, un epitelio poliestratificado. Estos estratos son denominados, de dentro hacia fuera: basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo (Fig. 2). Todas las células proceden de una sola hilera compuesta el 90 % de las células propias de la epidermis llamadas individualmente queratinocitos, y el 10 % de otras células que se encuentran en la epidermis: Melanocitos, Células de Merkel y Células de Langerhans, se mantienen unidas gracias a los llamados desmosomas y que van a originar por sus divisiones a todas las demás, terminando con la muerte de la célula llena de queratina, esta última capa caerá renovándose continuamente.

Este proceso que llamamos queratinopoyesis: es el proceso mediante el cual el queratinocito se divide en la capa basal, conforme sube a estratos superiores va percibiendo una serie de cambios estructurales, el más importante de ellos es la formación de queratina, llega a la capa cornea y luego se descama. Este proceso tiene una duración promedio de 28 días. Son 14 días desde que la célula se divide en el estrato basal y asciende a la capa cornea y otros 14 días en la capa cornea hasta que se descama ver Fig. 2 (Michael et al, 1998)

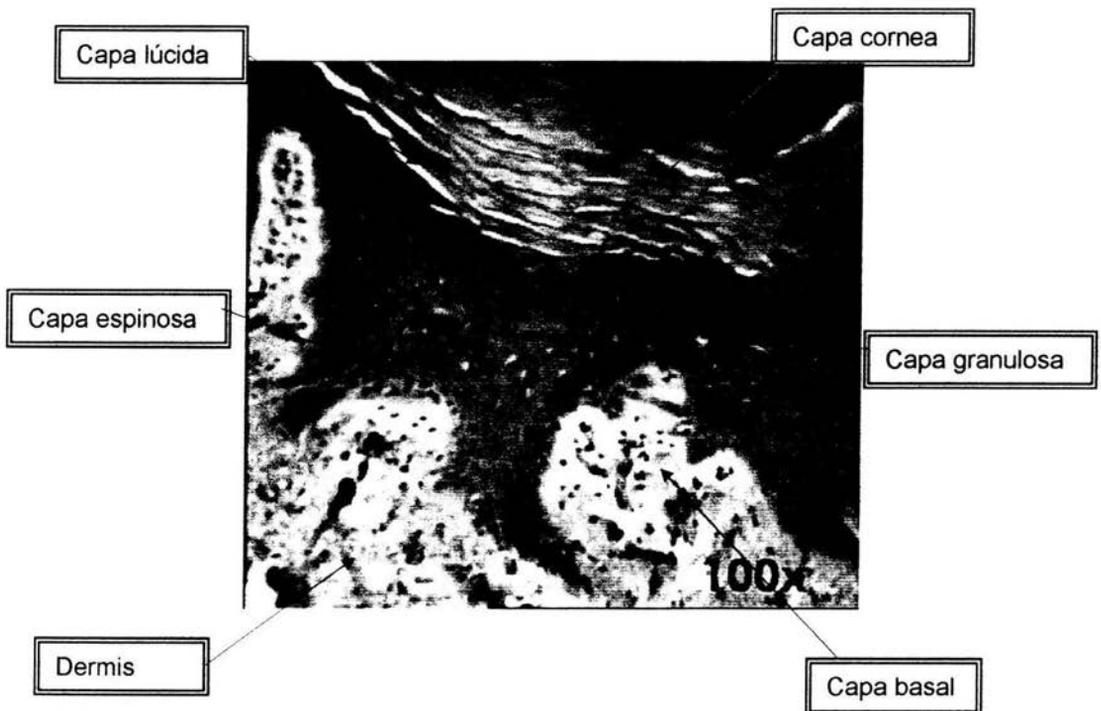


Figura No. 2 Corte histológico de la piel mostrando la epidermis y sus capas: 1 Capa Córnea, 2 Capa Lúcida, 3 Capa Granulosa, 4 Capa Espinosa, 5 Capa Basal y 6 Membrana Basal (Jacob, 1982, Fritsch, 1990 y Geocitios.com, pagina de internet)

Se distinguen en total cinco capas

Capa basal (stratum basale o Germinativo)

El stratum basale (del latín stratum = cubierta, capa; basalis = base, fondo) es la capa inferior de la epidermis (cutis superficial). Las células basales forman una sola hilera de células cilíndricas de núcleos muy basófilos que se encuentran directamente sobre la membrana basal, que separa claramente la epidermis de la dermis (cutis profundo) es decir dispuestas perpendicularmente a la dermis con mitosis frecuentes y que están en constante reproducción. Gracias a la división celular (proliferación) las células basales se comportan como células madres para la continua renovación de la piel. Gracias a esta división, las células hijas son desplazadas a las capas más exteriores. Ahí tienen lugar varios estados de desarrollo. En la capa basal se encuentran también de trecho en trecho células más claras, de núcleo hiperencromático en forma de luna que se les llamadas células claras de Maison o melanocitos, formadores de pigmentos de la piel o melanina. Se acepta que estas células provienen de las denominadas verdaderas células dendríticas que emigraron a la piel durante la vida embrionaria Fig. 2. ^(Jacob, 1982, Prota, 1996 y Michael et al, 1998)

Capa espinosa (stratum spinosum) o de Malpighi

El stratum spinosum (del latín spino = espina, pincho), o capa espinosa se encuentra a continuación de la capa basal. Está formado por varias hileras de células poliédricas dispuestas en mosaico y que tienen como característica especial la presencia entre ellas de "puentes" intercelulares que unen a una célula con otra dando cohesión a la epidermis, pero dejando suficiente espacio entre las células para la circulación de la linfa que las nutre. Estos puentes parecen estar formados por prolongaciones citoplasmáticas, reforzadas por tonofibrillas que en su centro se condensan para formar los nódulos. En ella empiezan a ser visibles los llamados queratinosomas, vacuolas de membrana cerrada (Cuerpos de Odland) que contienen las sustancias precursoras de los lípidos epidérmicos en forma de membranas lipídicas dobles discoidales agrupadas, Fig. 2 ^(Michael et al, 1998)

Capa granulosa (stratum granulosum)

A continuación de la capa espinosa encontramos el stratum granulosum (del latín granula = gránulo). A medida que se acercan a la superficie, las células se aplanan y empiezan a presentar en su interior unos gránulos de color azul oscuro que están formados del precursor de la queratina, la queratohialina. Llamados gránulos de queratohialina, son una mezcla de corpúsculos proteicos diversos y dan origen a la cornificación (queratinización) de los queratocitos. El estrato granuloso está formado apenas de una o dos hileras de estas células. En la actualidad se sabe que los gránulos están constituidos por ADN y proceden de la cromatina nuclear, Fig. 2 ^(Michael et al, 1998).

Capa lúcida (stratum lucidum)

El stratum lucidum es la llamada capa lúcida. Las células están fuertemente aplanadas y cementadas entre sí. Los límites entre las células ya no son visibles. En el cuerpo, donde la piel es gruesa, podemos observar con el microscopio de luz una banda clara localizada entre la capa granulosa y cornea. Esta zona se ha denominado estrato lúcido. (Fig. 2).

Capa córnea (stratum corneum)

El stratum corneum (del latín cornea = callosidad) es la capa más superficial ó exterior de la epidermis (cutis superficial). Variable en su espesor desde 0.02 mm. hasta 0.5mm en las plantas de los pies, está formado por hileras de células muertas, aplanadas sin núcleo y llenas de una sustancia llamada queratina blanda, Fig. 2 ^(Michael et al, 1998).

Las células córneas (corneocitos), se encuentran unidas entre sí gracias a unos cuantos desmosomas, apéndices de la membrana celular ricos en proteínas ("tonofibrillas"), además el espacio intercelular constituye una matriz de lípidos. Se observan así varias hileras de laminillas puestas unas sobre otras. La capa córnea, consta de una parte dura con 15 a 20 capas de células, en especial su tercio inferior, constituye la barrera de permeabilidad, la capa protectora natural de la piel frente a factores exógenos. Este último es el elemento de protección más eficaz. Resistente a los agentes reductores queratolíticos, a la mayoría de las

proteasas, a los compuestos ácidos y alcalinos. Esta resistencia no sólo está asegurada por puentes disulfuro, sino también por otros enlaces covalentes ^(Buxton et al, 1992, Haftesk et al, 1996 y Michael et al, 1998)

La hidratación de estas células se produce lentamente por ósmosis a través de los lípidos intercelulares. Las células han perdido su núcleo y se encuentran llenas de queratina. La queratina es una proteína rica en uniones disulfuro, que se dispone en filamentos agrupados y forman el 75% del peso de estas células. Las células son planas y no presentan organelos intracitoplasmáticos, los cuales ya fueron digeridos por enzimas lisosomales ^(Teunissen, 1992 y Michael et al, 1998)

El agua es indispensable para mantener las propiedades mecánicas de la capa cornea. Los lípidos que se encuentran en el estrato corneo representan un 7-9% de la masa total de tejido y están constituidos, sobre todo, por ácidos grasos libres o esterificados, ceramidas, triglicéridos y colesterol que se encuentran emulsificados con el agua.

La dermis (corion, cutis profundo)

La dermis (del griego *derm* = piel, también *cutis profundo* o *corion*) forma una abrupta frontera frente a la epidermis (*cutis superficial*). La transición al subcutis (tejidos bajo la grasa cutánea) es por el contrario fluida (Fig. 1, 3).

En la dermis hay un número variable de arterias, venas y nervios encargados de la irrigación e inervación de la piel por lo tanto su principal función es la nutrición de la epidermis (Fig. 1, 3) ^(Aiache, 1983 y Wilkinson, 1990 Michael et al, 1998)

La dermis consta de dos estratos:

Stratum papillare:

El *stratum papillare* (del latín *papille* = protuberancia) es la capa superior: formado por proyecciones irregulares de tejido conectivo, colágeno laxo (papilas), que se interdigitan con las respectivas proyecciones de la epidermis "crestas epidérmicas", constituye una frontera abrupta y ondulada hacia la epidermis (*cutis superficial*). Su estructura ondulada hace que la superficie de contacto con la epidermis sea mayor (Fig. 3) ^(Michael et al, 1998)

De esta manera se asegura un suministro óptimo de nutrientes a los epitelios inferiores de la epidermis, las células basales, a través de los vasos sanguíneos que atraviesan los corpúsculos papilares.



Figura No. 3 Corte transversal de la piel mostrando en detalle las siguientes estructuras: 1 Epidermis, 2 Dermis, 3 Subcutis, 4 Tallo del pelo ó Folículo piloso, 5 Glándula sebácea, 6 Glándula sudorípara, 7 Stratum papillare, 8 Membrana basal y 9 Células basales. (Fritsch, 1990)

Stratum reticulare

El stratum reticulare (del latín stratum = cubierta, capa; reticular = en forma de red) constituye la parte inferior de la dermis. Esta se convierte en el subcutis (tejido subcutáneo), situado más abajo, constituido igualmente por tejido conectivo colágeno laxo o colágeno irregular que se fusiona insensiblemente con el estrato papilar.

Parte esencial de la dermis son las fibras proteicas del tejido conectivo, compuestas por fibras elásticas de forma ondulada y por fibras colágenas casi rígidas. Ambas determinan la elevada elasticidad y resistencia a la tracción del cutis profundo.

Las fibras colágenas jóvenes - pueden absorber gran cantidad de agua, determinando así la elevada turgencia de la piel joven. Con el aumento de la edad, la malla de fibras colágenas se tensa, reduciéndose así su capacidad de retención de agua. La piel tiende entonces a la formación de arrugas^(Michael, 1998).

Tejidos conectivos, glicoaminoglicanos y capacidad de absorción de agua.

Los intersticios de la red dérmica de fibras contienen una especie de relleno compuesto de largas cadenas de moléculas de azúcar (polisacáridos, del griego poly = cuantioso, mucho; sacchar = azúcar). Estos llamados glicoaminoglicanos (también mucopolisacáridos), que con ayuda de la fibroconectina, una especie de pegamento, unen la estructura proteica de tejido conectivo dando lugar a los proteoglicanos, tienen la capacidad de absorber agua. Esta masa gelatinosa funciona como una esponja. Al ser presionada, el agua retenida puede ser tanto absorbida como expulsada. Este proceso contribuye probablemente al suministro de nutrientes de la dermis^(Michael, 1998).

Los ácidos hialurónicos (del griego hyalo = cristal) pertenecen al grupo de los glicoaminoglicanos y con ello a la función retentora de agua en el tejido conectivo. Los glicoaminoglicanos están sujetos a una continua construcción y destrucción. Por el contrario, el almacén de colágeno sólo se renueva en caso de necesidad, como pueden ser lesiones de la piel.

Otros componentes de la dermis son diversos tipos de células como los fibroblastos, mastocitos y otras células de tejido, aparte de numerosos vasos sanguíneos y linfáticos, terminaciones nerviosas, y receptores del frío y el calor, al igual que los órganos del sentido del tacto^(Michael, 1998).

Los anexos cutáneos

Las membranas mucosas encontradas en cavidades del cuerpo, tales como la boca, nariz, aparato digestivo y ojos, son también modificaciones de la piel. La membrana mucosa difiere de la piel externa de muchos modos, principalmente en la secreción de mucus^(Aiache et al, 1983 y Michael, 1998).

Entre los anexos cutáneos se encuentran las uñas, los pelos y las glándulas (glandulae cutis). Se originan en invaginaciones de la epidermis (cutis superficial) en la dermis (cutis profundo).

Las **Uñas** son placas córneas que están firmemente ancladas en el lecho ungueal. Tienen un grosor de unos 0,5 mm y se componen de un borde anterior libre, el cuerpo de la uña y la raíz, insertada esta última en una invaginación de la piel.

En los **Pelos** se distingue entre el tallo, que sobresale de la piel, y la raíz. Esta última está engrosada en su polo inferior (bulbo piloso), el cual asienta a su vez sobre la llamada papila pilosa de la dermis, responsable de la formación y crecimiento del pelo. La raíz del pelo está situada en la vaina de la raíz, la cual está revestida, hacia afuera, por el folículo piloso, el cual está comunicado a la glándula sebácea ver Fig.3^(Aiache et al, 1983 y Michael, 1998).

Entre las glándulas de la piel (**Glandulae cutis**) se encuentran las glándulas sudoríparas, odoríferas, sebáceas y mamarias. Las glándulas sebáceas se encuentran casi siempre unidas a los folículos pilosos, gracias a cuyo orificio en forma de embudo, su secreción rica en lípidos puede alcanzar la superficie cutánea. El tamaño de las glándulas sebáceas y con ello su secreción varía en función de la zona corporal. Así, en la cara encontramos glándulas sebáceas mayores a las de brazos y piernas. Un importante factor que influye en la actividad de las glándulas sebáceas son los andrógenos.

Las glándulas sebáceas y sudoríparas (Fig. 3), se encuentran entre las llamadas glándulas exócrinas (del griego exo = fuera, afuera), lo que significa que estas glándulas vierten sus secreciones directamente en una superficie, como por ejemplo la piel. Esto ocurre en el caso de las glándulas sebáceas por disociación de células con alto contenido lipídico. Gracias a la división de las células basales se produce de forma continua el reabastecimiento (glándulas holócrinas). En las glándulas apócrinas, como las mamas o sudoríparas de la axila. Sólo las partes externas del cuerpo de la célula son repelidas con la secreción. Las células de las glándulas ecrinas, como las glándulas sudoríparas pequeñas, no muestran ninguna pérdida de citoplasma tras la secreción.

Junto con las glándulas sudoríparas, las glándulas sebáceas suministran sustancias esenciales como un sebo, además de los lípidos epidérmicos que constituyen, junto a otras, para la formación de la película hidrolipídica que mantiene la piel en condiciones flexibles.

Con excepción de las palmas de las manos o las plantas de los pies, las glándulas sebáceas se encuentran por toda la piel. En la cara son mayores que en los brazos o las piernas (Aliche et al, 1983 y Michael, 1998).

El subcutis (tejido subcutáneo)

Se conoce como subcutis (del latín sub = debajo; cutis = piel) el tejido adiposo subcutáneo. Se compone de un sistema de cámaras de tejido conectivo rellenas de células adiposas (adipocitos) que almacenan energía (Fig. 3).

El subcutis se encuentra atravesado por numerosos vasos sanguíneos, lo que garantiza un rápido transporte de los nutrientes almacenados según las necesidades (Aliche et al, 1983 y Michael, 1998).

Agrupaciones de células adiposas

Las células adiposas se encuentran unidas en grandes grupos con forma de almohadillas, sujetos por fibras colágenas llamadas cámaras o vainas de tejido conectivo.

Entre las funciones del tejido adiposo subcutáneo se encuentran, además del almacenamiento de nutrientes en forma de grasas líquidas, el aislamiento del cuerpo frente al frío y la amortiguación de los golpes. En las palmas de las manos, nalgas y plantas de los pies, el acolchamiento adiposo prácticamente sólo sirve como protección frente a los impactos.

La distribución de grasas en hombres y mujeres: El contenido graso del subcutis no es idéntico en todas las zonas del cuerpo. También entre hombres y mujeres el tejido adiposo subcutáneo se encuentra repartido desigualmente. Por eso la celulitis, a modo de ejemplo, aparece sobre todo en las mujeres, determinada por la especial disposición de las vainas del tejido adiposo subcutáneo y del almacenamiento preferencial de grasas en caderas, muslos y nalgas. Por el contrario, los hombres tienden a almacenar grasas en la zona del tronco.

Las grasas, también llamadas triglicéridos o acilglicerinas, son los lípidos que contienen ácidos grasos más numerosos y sencillos. Son ésteres del alcohol trivalente Glicerina, pudiendo tener tres grasas saturadas o insaturadas. Las grasas constituyen la parte esencial del cúmulo o depósito graso de la piel.

Descamación, Cornificación y renovación de la piel

La piel está constantemente renovándose desde el nacimiento hasta la muerte. Las capas más externas son desprendidas a medida que las capas más internas producen nuevas células. Miles de millones de nuevas células son introducidas cada día mientras que miles de millones de células corneales muertas son desprendidas por el cuerpo. Existen treinta capas de células que están continuamente siendo añadidas desde abajo y desprendidas desde arriba.

Durante la llamada cornificación las células basales cilíndricas vivas se transforman en células córneas planas sin núcleo, variando en el proceso su forma y composición. Las células atraviesan en el camino la zona barrera, la zona fronteriza interfacial, entre la capa cutánea superficial viva y la capa córnea, al tiempo de que ocurre el depósito de los lípidos epidérmicos intercelulares (Kaiser,

1993 y Michael, 1998)

La epidermis (cutis superficial) se renueva mediante una continua reproducción, cornificación y descamación (desprendimiento mecánico del nivel superior de células córneas) cada 28 días ver Fig. No. 4.



Figura No. 4 *Microfotografía electrónica de células córneas descamadas*
(Fritsch, 1990)

Hacia la superficie cutánea la capa córnea se vuelve más quebradiza, las diferentes células no encajan entre ellas, separándose y desprendiéndose imperceptiblemente en forma de escamas de piel. Este proceso continuado se denomina descamación. Un adulto pierde diariamente alrededor de 10 g de escamas córneas.

Junto a la queratohialina, una precursora de la queratina, los gránulos contienen la llamada filagrina, la sustancia cementante del armazón celular (Kaiser, 1993 y Michael, 1998)

El modelo del cemento y ladrillos

Entre las células se encuentran los lípidos epidérmicos: si nos imaginamos las células córneas como ladrillos, los lípidos serían el cemento o la argamasa que rellenan los espacios intercelulares (Fig. 5).

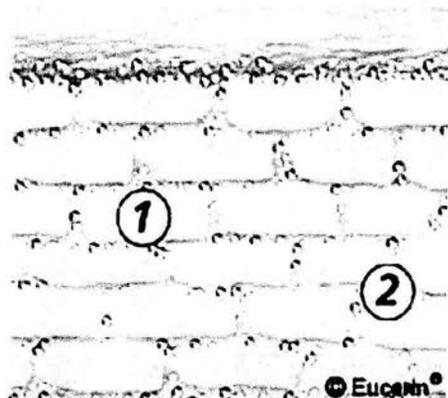


Figura No. 5 Representación esquemática de la capa córnea: el modelo del cemento y ladrillos. 1 Células corneicas (corneocitos) y 2 Lípidos epidérmicos (Fritsch, 1990)

Formación y función de los lípidos epidérmicos

La composición de los lípidos y su contenido de agua en la epidermis se modifican con el aumento de la cornificación de las células cutáneas. Los lípidos se producen en los aparatos de Golgi de las células corneicas. Finalmente se hacen visibles en pequeñas estructuras de los queratinocitos maduros: en estas vacuolas de membrana cerrada, los llamados Cuerpos de Odland, se almacenan las sustancias precursoras de la barrera lipídica cutánea en forma de bicapas discoidales agrupadas. El contenido de los Cuerpos de Odland es depositado en los espacios extracelulares mediante la exocitosis. Ahí es donde se originan los lípidos epidérmicos: en forma de cemento córneo celular, estas bicapas lipídicas confieren estabilidad a la capa córnea (Friberg, 1990, Kaiser, 1993, Madison, 1996 y Michael, 1998).

Simultáneamente, estas membranas lipídicas intercelulares constituyen la barrera crítica de permeabilidad de la capa córnea: la regulación del contenido de agua y humedad es una de sus funciones más importantes, ya que la elasticidad y solidez de la capa córnea dependen de su contenido acuoso (Kaiser, 1993 y Michael, 1998).

Composición de los lípidos epidérmicos

Entre los lípidos de la capa córnea predominan las ceramidas con una proporción del 40%. A continuación vienen los ácidos grasos 25%, y el colesterol 25% y sulfatos de colesterol. De esta mezcla de lípidos complejos, las ceramidas son responsables en primera instancia de la función de retención de humedad y formación de la barrera. Desde el punto de vista químico se trata de un grupo de diferentes esfingolípidos, sobre todo esfingosina con diversos ácidos esenciales como por ejemplo el ácido linoléico (Madison, 1996).

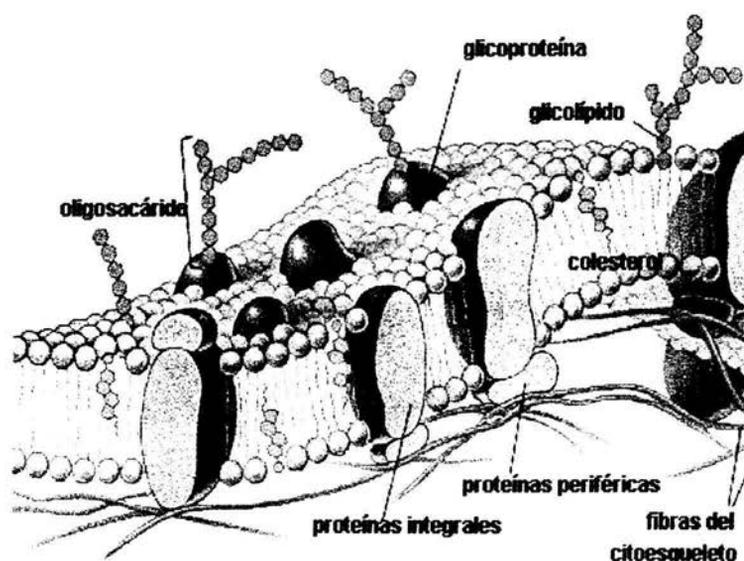


Figura No. 6 Estructura de las membranas celulares (Escalona, 1989; Meyer, 1990 y Lehninger, 1993)

La Barrera de Permeabilidad

Los lípidos epidérmicos constituyen de un 10 a un 30 % del volumen total de la capa córnea. Esto equivale a una proporción en sustancia intercelular sobre el volumen total de 100 a 200 veces mayor que en otros tejidos. De esta manera la capa córnea forma una efectiva **barrera de permeabilidad**, que realiza dos funciones esenciales ver Fig. 6 (Dawning, 1992 y Michael, 1998)

Una de las funciones principales es mantener una temperatura constante en el organismo lo cual se logra por la evacuación de sudor. La cantidad de calor radiado depende de la temperatura externa.

Estratos epicutáneos (manto ácido de la piel). Antes de revisar la estructura histológica de la piel que se inicia con la capa cornea, debemos decir que sobre esta capa existen otras dos invisibles llamadas: **manto gaseoso** y **manto ácido**, que forman en conjunto la microatmósfera que rodea a la piel del individuo y la pone en contacto con el medio exterior.

El manto gaseoso: está formado por una capa de aire más caliente, con más contenido de CO₂ y vapor de agua resultante de la evaporación del sudor.

El manto ácido: es una emulsión formada por la secreción sudoral y sebácea dando origen a dos fases, agua en aceite cuando es más abundante la grasa y aceite en agua cuando es lo contrario. El manto ácido da a la epidermis su acidez, su pH es de 5.5 mientras que la dermis es alcalina con un pH de 7 a 7.2, en la acidez de la epidermis influye el CO₂ y los aminoácidos. Las axilas, regiones genitales, oídos, palmas y plantas son menos ácidos (ventanas alcalinas) y también la piel de la mujer, del niño y anciano tienden a la alcalinidad. El manto ácido es una importante defensa contra gérmenes y hongos. La inflamación alcaliniza la piel (Dawning, 1992 y Michael, 1998)

La segunda función es la barrera de protección de la piel contra sustancias extrañas, el pH ácido de la piel juega un papel esencial en la formación de la barrera de permeabilidad. Impide la penetración de determinadas sustancias como por ejemplo microbios, agentes químicos y alergenicos.

La piel también excreta material de desecho, ayuda a prevenir la pérdida de fluidos corporales y es el órgano fundamental del sentido del tacto.

Si se eliminan capas de células córneas y con ello lípidos epidérmicos, la piel será más permeable al agua y otras sustancias, incluidas sustancias agresivas y alérgicos.

La piel realiza numerosas funciones, como la termorregulación y la acción aislante, el almacenamiento de energía, la sensibilidad y protección frente a los influjos ambientales como por ejemplo hongos, bacterias o también radiaciones UV (Dawning, 1992 y Michael, 1998).

Los factores naturales hidratantes

En la superficie cutánea acaban los conductos de salida de las glándulas sudoríparas (100-200 cm²) y las aberturas de las glándulas sebáceas (50-100 cm²). Su secreción se encarga de la humectación y engrasamiento de la piel y con ello del mantenimiento del manto hidrolipídico. La epidermis en sí no contiene vasos sanguíneos, por tanto el suministro de nutrientes se produce a través de los finos vasos sanguíneos en las papilas de la dermis (Friberg, 1990).

Se conoce como agua transepidérmica aquella que alcanza la superficie cutánea por termodifusión, evaporándose una vez ahí. Cuanto menos intacta se encuentre la barrera cutánea de la capa córnea, mayor será dicha pérdida.

La capacidad de retención de agua de la piel se encuentra determinada de forma importante por la composición de la barrera lipídica de la capa córnea. La estructura proteínica de las células córneas también es significativa para la capacidad de retención de agua de la piel, como puede ser la presencia del aminoácido arginina. Estas sustancias propias del cuerpo, que fijan el agua en la capa córnea, se denominan: FNH. Se originan durante el proceso de cornificación de los queratocitos (p.ej. el ácido pirrolidoncarbónico), en el sudor y la secreción de las glándulas sebáceas como: urea, sales y ácidos orgánicos (Friberg, 1990, Zee, 1992 y Bibertein 1994).

Mecanismos de Defensa de la Piel

Es común que cualquier afección de piel termine finalmente en infección. El nombre que recibe la infección de piel causada por bacterias es **piodermia**. Según el estrato de la piel que alcance será la clasificación y la gravedad del caso. En la piel normal hay ciertos mecanismos de defensa:

Físicos: manto piloso (primera protección); estrato córneo (capa de células densas e inertes) más la costra sebácea que se forma sobre la superficie del estrato córneo, producto de las secreciones y descamaciones.

Químicos (elementos sobre la superficie de la piel): ácido linoléico (bactericida); sustancias hidrosolubles (sales inorgánicas y proteínas); elementos de inmunidad (complemento, transferrina, Igs G, M, E, A, Interferones)

Bacterias banales: Viven sobre la superficie de la piel (en el infundíbulo del pelo, donde la piel se invagina) en simbiosis, e intercambian factores de crecimiento. El número de bacterias está influenciado por el pH de la piel, su salinidad, humedad, ácidos grasos, proteínas, etc.

Hay dos grupos de bacterias:

Residentes: no producen patogenicidad y se multiplican sobre la piel.

Acinetobacter spp., *Staphylococcus* (Coagulasa+), *Staphylococcus* (Coagulasa -), *Micrococcus spp.*, *Streptococcus* (*β hemolítico*).

Transitorios: son más agresivos. Estando sobre la superficie de la piel no se pueden reproducir, pero son potencialmente capaces de producir patogenicidad ante alteraciones de la piel (ayudan al patógeno primario a agravar la situación) (Sharon, 1998)

Pseudomonas aeruginosa, *Proteus vulgaris*, *Corynebacterium spp.*, *E. coli*, *Bacillus spp.* El único patógeno primario es *Staphylococcus intermedius* (Sharon, 1998)

Normalmente la piel contiene una cantidad determinada de bacterias. Esa población aumenta en climas húmedos y de alta temperatura y disminuye en climas fríos y secos.

En las pieles lesionadas, como en casos de seborrea, piel grasa, inflamaciones, aún sin haber infección aumenta el número de bacterias. El aumento del número de bacterias sin infección se denomina **colonización bacteriana** (Zee, 1992 y Bibertein et al, 1994).

La piel, considerada como un órgano, posee un ambiente menos favorable para el crecimiento microbiano que las encontradas en otros sitios anatómicos, como por ejemplo las membranas mucosas (Bibertein et al, 1994 y Sharon, 1998).

Factores más característicos de la piel

Humedad: Condiciones que interfieren con la evapotranspiración en la piel promueven el crecimiento de microorganismos que pueden ser patógenos para los tejidos.

pH: Aunque existen variaciones de pH a lo largo de la superficie del cuerpo del animal. Los valores de pH = 6.0 desfavorecen el crecimiento de muchas bacterias.

Descamación: El constante desprendimiento de las capas superficiales de la piel provoca la eliminación de organismos transitorios y potencialmente infecciosos. La flora normal se recupera rápidamente a partir de la población residual.

Secreciones y excreciones: Las glándulas sebáceas, secretan lípidos de cadena larga, incluidos los ácidos grasos, muchos de los cuales inhiben el crecimiento bacteriano. Adicionalmente y junto con las glándulas sudoríparas, contribuyen a crear una capa "sellante" que limita el acceso y adhesión de muchos patógenos.

Las glándulas sudoríparas secretan además lactato, propionato, caprilato y altas concentraciones de cloruro de sodio, como inhibidores de crecimiento. Sustancias tales como Interferón, lisosimas, transferrinas y todos los tipos de inmunoglobulinas también están presentes en las secreciones de estas glándulas, provocando un estado de "auto esterilización" de la superficie e impidiendo la proliferación de organismos oportunistas^(Biberstein et al. 1994).

Interacciones microbianas: La flora bacteriana normal impide el crecimiento de muchos organismos oportunistas mediante la excreción de metabolitos inhibitorios (ácidos grasos volátiles, antibióticos), bacteriocinas, bacteriostáticos entre otros. Adicionalmente los mecanismos de inhibición competitiva juegan un papel primario en el control de las poblaciones de organismos patógenos.

Sistema inmune de la piel (SIP): En condiciones normales el SIP responde eficientemente al estímulo de antígenos locales, incluyendo los microbiales. Las células de Langerhans, macrófagos titulares, poseen un papel primordial en la presentación de antígeno, fagocitosis y constituyen el eje principal del SIP^(Biberstein et al, 1994 y Haftek et al, 1996).

Flora Microbiana Normal de la Piel

Los microorganismos presentes en la piel están normalmente limitados a la porción distal de las glándulas sebáceas y de los folículos pilosos y a las capas superficiales de la piel en donde la cohesión de las células es más laxa antes de la descamación. Su densidad varía dependiendo del sitio, siendo más abundante en sitios de alta humedad, aunque siempre en proporciones menores que las encontradas en las membranas mucosas^(Sharon, 1998).

La Tabla 2 resume el tipo de microorganismos presentes normalmente en la piel y su abundancia relativa, con base en cultivos microbiológicos de animales clínicamente sanos. Se presentan algunos de los microorganismos cuyos aislamientos están asociados con infecciones de grado variable^(Bibertein et al, 1994).

Tabla No. 2 Microorganismos comúnmente encontrados en cultivos de piel sana y su abundancia relativa. (Bibertein 1992, Zee, 1992; Bibertein et al, 1994, (Sharon, 1998 y Portal Veterinaria, pagina de Internet)

Tipo de Microorganismos	Especie (+ Abundancia Relativa)
Bacterias	<i>Staphylococcus sp</i> (5+), <i>Corynebacterium sp</i> (3+), <i>Propionibacterium sp</i> (3+), <i>Micrococcus spp</i> (2+), <i>Streptococcus sp</i> (2+), <i>Acinetobacter sp</i> (2+), <i>Escherichia coli</i> (2+), <i>Proteus mirabilis</i> (1+), <i>Streptococcus sp</i> (1+), <i>b-hemolítico</i> (1+), <i>Pseudomona aeruginosa</i> (1+), <i>Fusobacterium necrophorum</i> (1+), <i>Bacteroides sp</i> (1+).
Hongos	<i>Trichophyton sp</i> (2+), <i>Microsporium sp</i> (2+), <i>Malassezia sp</i> ** (2+), <i>Epidermophyton</i> (1+), <i>Candida spp</i> (1+), <i>Aspergillus spp</i> (1+).
** Levadura	

2.- Absorción Percutánea

El estrato córneo consiste de multicapas de células rígidas compactadas, aplastadas, deshidratadas y queratinizadas siendo tres las rutas de pasaje a través de ella: 1) transcelular, 2) intercelular y 3) por apéndices de la piel^(Barry, 1983, 1987; 1991).

De las tres rutas antes mencionadas, la intercelular parece ser la más frecuente. En este caso, las sustancias penetran rodeando a los corneocitos y atravesando los lípidos intercelulares (Fig. 5).

Una vía potencial no parenteral es la vía Percutánea, pero los péptidos tienen dificultad para atravesar la capa córnea debido a: su hidrofilia su alto peso molecular, su carácter iónico (Barry, 1983; 1987; 1991).

La absorción percutánea consiste en la introducción de un fármaco desde la superficie de la piel hasta el estrato córneo, bajo la influencia de un gradiente de concentración con su posterior y consecuente difusión por todas las capas de la piel como: la epidermis, dermis y hasta llegar a la microcirculación. La penetración molecular a través de las diferentes regiones de la piel está limitada por la resistencia difusional que ofrecen estas capas (Barry, 1983; 1987; 1991).

La difusión de la sustancia activa está limitada, además, por la oposición que ofrece la microvasculatura a la liberación sistémica del principio activo. Existen otros factores que controlan la penetración o velocidad de permeación, entre ellos está la densidad del medio de difusión, que es inversamente proporcional al coeficiente de distribución. La estructura molecular y el orden en que se encuentra dispuesto el medio de difusión también influyen de manera significativa (Barry, 1983; 1987; 1991).

Teoría de Difusión

Ley de Fick aplicada a una membrana: Sabemos que la mayoría de las moléculas se absorben en 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 (Aiche et al, 1983).

El periodo de latencia se refiere al tiempo necesario para la penetración de la sustancia al interior de las estructuras corneas y para el establecimiento de un gradiente de concentración (Amado, 1979). La resistencia difusional total (R piel), a la penetración a través de la piel, ha sido descrita por Chien, como:

$$R \text{ PIEL} = REC + RE + RPD \dots\dots\dots(i)$$

donde:

REC = Resistencia difusional estrato córneo.

RE = Resistencia difusional epidermis.

RPD = Resistencia difusional capa papilar de la dermis.

La mayor resistencia a la penetración es la que opone el estrato córneo, por lo tanto, es el factor que limita la absorción percutánea^(Aiche et al, 1983).

Al estrato córneo se le puede considerar una membrana de difusión pasiva pero no un sistema inerte, porque, por lo general, tiene cierta afinidad por la sustancia aplicada. El estrato córneo hidratado tiene la propiedad de ser más afín para los componentes lipofílicos.

La correlación entre las concentraciones externa y superficial se expresa en términos de coeficiente de distribución (Km) de la membrana disolvente^(Aiche et al, 1983).

El efecto de la variación regional sobre la permeabilidad de la piel puede ser importante. Se ha sugerido que habría que diferenciar entre las especies de estrato córneo: El de las plantas de los pies y las palmas de las manos (hasta 600 μm de espesor), adaptado para soportar peso y fricción y el de la capa córnea del resto del cuerpo (aproximadamente 10 μm de espesor), adaptado para la flexibilidad, la impermeabilidad y la discriminación sensorial.

En términos generales los datos sugieren el siguiente orden para la difusión de moléculas simple a través de la piel: plantas > palmas > brazos, piernas, tronco, dorso de las manos > escrotal y posauricular > axilar > cuero cabelludo.

El paso limitante en la absorción percutánea tiende a ser la difusión a través del estrato córneo. Para la determinación del flujo del soluto en el estado de equilibrio y del coeficiente de permeabilidad, se utiliza la fórmula integrada de la primera **Ley de Fick**^(Aiche et al, 1983).

$$J_s = K_m * D * C_s / d \dots\dots\dots (ii)$$

$$K_p = K_m * D / d \dots\dots\dots (iii)$$

Donde:

K_p = Coeficiente de Permeabilidad.

C_s = Diferencia de Concentración del soluto a través de la Membrana.

D = Promedio del Coeficiente de Difusión a través de la Membrana para el Soluto.

d = Grosor de la Membrana.

J_s = Flujo del soluto en el estado de equilibrio.

K_m = Coeficiente de partición del soluto (solución / piel).

El flujo del soluto en el estado de equilibrio es de gran importancia debido a la información que brinda en cuanto a la efectividad del uso de un promotor de permeación (PP) (Acevedo, 1990 y Taro et al. 1995).

Se ha planteado que el éxito de todo sistema terapéutico transdérmico (STT) depende de la capacidad de la sustancia para difundir a través de la piel en cantidades suficientes para lograr el efecto terapéutico deseado. Todos los sistemas de este tipo, que se encuentran actualmente en el mercado, contienen principios activos con un coeficiente de difusión dependiente de la naturaleza del sistema y del tamaño molecular del principio activo^(Taro et al, 1995), y donde la cinética de liberación debe ser de orden cero para obtener niveles constantes de sustancia activa en plasma; otra de las características que deben cumplir estos compuestos es que se requieren bajos niveles plasmáticos para lograr su efectividad terapéutica. Algunas de las sustancias activas que se encuentran en investigación no poseen la capacidad intrínseca de atravesar la piel de manera eficiente, por lo que ha sido necesaria la búsqueda de vías para modificar esta barrera difusional. Una de las formas que ha sido estudiada con mayor rigor es la del uso de agentes promotores de la permeación (PP), que son sustancias químicas capaces de disminuir la resistencia difusional que ofrece la piel^(Barry, 1983).

Esta opción pudiera ser la solución para aquellas sustancias con dificultad para atravesar el estrato córneo; sin embargo, no podemos olvidar las reacciones adversas, en cuanto a irritación se, que estos agentes ocasionan por su naturaleza oclusiva o bien por alteración de los componentes de la piel, conduciendo a la acumulación del sudor e incrementando el crecimiento microbiano^(Ham et al, 1969; Fischer et al 1985, Hurkmans et al, 1985 y Bibertein et al, 1994).

De acuerdo a las teorías, los PP pueden actuar 1) alterando la estructura organizada de los lípidos del SC incrementando la difusión intercelular, 2) interactuando con proteínas intracelulares para aumentar la penetración en los corneocitos, 3) actuando como solvente de los componentes del SC ^(Fischer et al, 1985, Bibertein et al, 1994 y Marjukka et al, 1999).

Las moléculas que mejor ejemplifican el mecanismo número uno, son los terpenos. Estos compuestos son cadenas carbonadas largas que provocan inestabilidad de los lípidos constitutivos de las membranas celulares permitiendo que otras sustancias menos afines puedan penetrar la barrera lipofílica. De la misma forma los ácidos grasos insaturados pueden alterar en forma reversible la membrana celular para provocar el mismo efecto. En general, la capacidad transportadora de los terpenos aumenta en la medida en que se incrementa el carácter lipofílico del medio. ^(Fischer, 1985, Bibertein et al, 1994; Remington's, 1990 y Magnusson et al, 2001)

Las sustancias iónicas como los fenoles y algunos ácidos, tienden a actuar desnaturalizando los filamentos de queratina del corneocito. La dimetilformamida y las pirrolidonas producen este mismo efecto tanto en proteínas como en lípidos. Otras sustancias menos activas como la urea, polioles, y la misma agua pueden hidratar las proteínas de membrana causando engrosamiento y aumentando la penetración de las sustancias ^(Fischer, 1985, Remington's, 1990, Bibertein et al, 1994, Taro et al, 1995 y Magnusson et al, 2001)

Se sabe que los agentes activos de superficie pueden ocasionar cambios en las proteínas; este efecto se observa en mayor medida para los compuestos polares.

Penetración del Fármaco: Un PA en un vehículo líquido polar se absorbe poco ya que se evapora con facilidad y por otra parte la capa córnea es hidrófoba. Si utilizamos un vehículo graso como las pomadas y los ungüentos, la absorción es máxima ya que el excipiente se acumula en la capa córnea y va liberando lentamente el fármaco hacia el interior de la piel, gracias al gradiente de concentración, actuando como un efecto depot.

Debido a la diversidad de estructura y funciones de la piel, los estudios *In Vitro* para evaluar la absorción cutánea y percutánea pueden proporcionar resultados no confiables por la limitación en la modelación de las condiciones *In Vivo* (Bibertein et al, 1994).

La interacción de estas sustancias con el estrato córneo parece estar determinada por la hidrofilia de los surfactantes. La mayoría de los surfactantes hidrofílicos (iónicos y switeriónicos) interactúan de forma muy marcada con la queratina y alteran el transporte de moléculas polares; sin embargo, los surfactantes hidrofóbicos (grandes cadenas de alcoholes) interactúan débilmente con la queratina y no favorecen a las moléculas polares.

Se sabe que estas sustancias causan cambios estructurales en el estrato córneo y que pueden inducir el transporte convectivo a través de los folículos pilosos y los conductos sudoríparos de la piel.

Hoy en día es obvio que todos los compuestos químicos de peso molecular inferior a 700 son potencialmente capaces de a atravesar la piel normal, sean cuales fueren sus propiedades físicas y su solubilidad.

Todo PA 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 estos medios líquidos, hacia las paredes celulares, según la siguiente ecuación (Marjukka et al, 1999).

$$Pa = \text{Disolución} / \text{Difusión} = \text{Absorción} \dots \dots \dots (\text{iv})$$

Podemos definir Pa de una sustancia como la suma de dos fenómenos que son, por una parte, su penetración desde un medio exterior hasta el seno de la piel entera y, por otra, su transporte a través de las estructuras cutáneas hacia la circulación sanguínea ó linfática. El término percutáneo 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 PA 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 ó menos absorbido se le llama "absorbilidad" y solo depende de sus propios caracteres fisicoquímicos.

Como ya se mencionó, 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 ó 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 epidermis. Las sustancias difusibles, de bajo peso molecular y lipófilas pueden penetrar 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 prioritaria, pero cuando se establece un gradiente de difusión en el SC predomina la vía transdérmica.

Factores que influyen en la permeación

Numerosos factores influyen en el paso de los medicamentos a través de la piel, entre ellos ^(Aiache et al, 1983 y Marjukka et al, 1999). La región de la piel. Se sabe que la absorción cutánea varía de una región a otra del organismo. Las zonas de la piel provistas de numerosos folículos pilosos son más permeables en general que aquellas con pocos o ninguno.

La manipulación local. Una de las maneras más eficaces de aumentar la absorción local de la piel es aplicar un vendaje plástico oclusivo a la superficie cutánea. Si se combina la oclusión con la separación del estrato córneo, aplicando tiras de cinta adhesiva, la absorción cutánea casi se duplica.

Las propiedades químicas del fármaco y el vehículo. La naturaleza del principio activo determina su penetración en la piel, y el efecto intenso de los vehículos sobre la absorción^(Andrea, 2002).

La frecuencia de la aplicación. En dermatología se acostumbra aplicar los preparados tópicos de dos a cuatro veces al día, pero se ha visto que el tratamiento local del antebrazo del mono Rhesus tres veces al día no produce un efecto significativamente mayor que la aplicación una sola vez al día^(Amado, 1979).

El contacto prolongado y continuo. En la industria farmacéutica como en otras industrias siempre se han presentado intoxicaciones o riesgos ocupacionales en los operadores, por la constante manipulación durante largos tiempos de trabajo, de las materias primas y principios activos empleados en la elaboración de un producto. Mediante estudios experimentales se ha comprobado que la absorción percutánea continua produce concentraciones del fármaco más altas en los tejidos situados inmediatamente por debajo del lugar de la aplicación, que en otras zonas. La cantidad de sustancia que atraviesa la piel depende de la dosis empleada, la duración del contacto, el grado de hidratación de la piel, el estado y edad de la piel, el flujo sanguíneo y el lugar de aplicación^(Andrea, 2002).

Caracteres fisicoquímicos de los Fármacos.

Constante de difusión: de una molécula a través de una membrana corresponde a la resistencia que opone el entorno a sus desplazamientos. Es una manifestación física característica de la sustancia y de la membrana, relacionada con los movimientos brownianos, ligada con la masa molecular del compuesto y sus interacciones químicas con los constituyentes de la membrana, así mismo depende de la viscosidad del medio y de la temperatura^(Andrea, 2002).

La ley de Stock Einstein es la que da el verdadero valor de la constante de difusión, las moléculas de baja masa molecular difunden más rápidamente que las moléculas de masa molecular elevada a menos que no se unan con los constituyentes de la membrana. En estas condiciones, los niveles de absorción deberán ser inversamente proporcionales a las masas moleculares. El grado de lipofilia es otro factor importante, pues se ha constatado que moléculas con una lipofilia media son capaces de penetrar el SC (con características lipofílicas) y difundir a través de la epidermis viable y dermis de naturaleza más bien hidrofílica (Aiache et al, 1983).

Diferencias anatómicas de la piel entre especies animales

Estudios en dermatología, farmacología cutánea y absorción percutánea, han revelado diferencias significativas en las características dermatológicas de la piel entre diferentes especies animales (Fischer et al, 1985 y Magnusson et al, 2001). Por esta razón, resulta difícil extrapolar los datos de absorción dérmica de una especie a otra, básicamente por las diferencias anatomofisiológicas entre especies (p.ej grosor, número de capas celulares, número de glándulas sebáceas, número de folículos pilosos, etc.). Los animales de laboratorio, poseen mayor cantidad de folículos pilosos y menor cantidad de glándulas sebáceas que la piel humana. Se estima que existen más de 10.000 folículos pilosos por cm² en algunas regiones de piel en ovejas de la raza merino, considerando que la primera vía de absorción cutánea es el folículo piloso, puede suponerse que en estos animales se presentará una mayor tasa de penetración de medicamentos usados en forma tópica (Fischer et al, 1985 y Bibertein et al, 1994).

De igual forma se considera que, al menos en bovinos y ovinos, la principal vía de absorción de medicamentos a nivel cutáneo es el folículo piloso, debido a la alta densidad de estas estructuras por centímetro cuadrado, presencia de sustancia emulsificantes que facilitan la absorción, aumento del área de absorción por las invaginaciones del estrato corneo dentro del folículo (Fischer et al, 1985 y Bibertein et al, 1994).

El punto crucial en la absorción de medicamentos a nivel dérmico radica en el estrato córneo (SC), una matriz de células queratinizadas, anucleadas (queratinocitos), rodeada de lípidos, que le confieren baja permeabilidad y resistencia. Su grosor varía de una especie a otra, teniendo un espesor que puede oscilar entre **19.9** (caninos, **cerdos**, **humanos**) hasta 30 micrómetros (bovinos, ovinos) (Fischer et al, 1985, Dick et al, 1992, Bibertein et al, 1994 y Magnusson et al, 2001)

Esta diferencia entre especies y la baja permeabilidad de la piel han sido las principales dificultades que se han enfrentado en la medicina veterinaria para el desarrollo y uso de medicamentos dermatológicos. Una solución reciente para estos inconvenientes ha sido la utilización de agentes promotores en la formulación de estos productos. Estas moléculas interactúan con los componentes de la piel causando incremento en la fluidez de las membranas lipídicas del SC, promoviendo la penetración de los medicamentos a través de las capas protectoras de la piel. (Fischer et al, 1985, Dick et al, 1992, Bibertein et al, 1994 y Magnusson et al, 2001)

3.-Técnica de Tape Stripping (TS)

La técnica consiste típicamente en el uso de una cinta adhesiva la cual es presionada sobre la piel en el sitio de muestra y removida bruscamente y subsecuentemente. La aplicación y el procedimiento de remoción pueden ser repetidos durante numerosos tiempos de exposición, la piel sometida a stripping de este modo en la investigación nos puede dar un daño estandarizado de heridas remediabiles. Esta técnica es adaptada para el desarrollo cinético epidermal y también puede ser provechoso como herramienta de diagnóstico en dermatología ocupacional evaluando la calidad de SC. Malkinson y Ferguson observaron y reportaron que la piel sirve como reservorio para químicos. La localización de este reservorio dentro del estrato córneo fue posteriormente demostrado por Vickers y tiende a ser confirmado por otros (Vickers et al. 1963 Carr et al 1966a: 1966b. Munro et al, 1969. Malkinson. et al, 1995 y Cristian, 2002)

El uso de la técnica de TS, en la investigación del reservorio y en función de la barrera de la piel, tiene una expansión significativa y pone a disposición las herramientas experimentales disponibles en la investigación de la piel. Las diferencias en la permeabilidad de la piel intacta y al quitar completamente la piel tiende a proporcionar información acerca de la resistencia difusional de las diferentes capas dermales. Esta tiende a hacer reconocida por su completa remoción del SC y esta no es posible sino hasta después de 30 – 40 stripping constantes como una falta de la función de la barrera al detener o para el tratamiento de algún tejido^(Vickers et al, 1963, Carr et al 1966a; 1966b, Munro et al, 1969, Malkinson, et al, 1995 y Cristian, 2002)

Aplicación de la Técnica del TS

La técnica del TS metodológicamente es una herramienta prometedora para seleccionar y comparar vehículos para fármacos tópicos. Los datos experimentales que de ella derivan y sirven para determinar 1) penetración de químicos dentro de la piel, 2) permeación de químicos a través de la piel, 3) eliminación de químicos desde la piel, 4) parámetros farmacodinámicos y 5) parámetros clínicos^(Vickers et al, 1963, Carr et al 1966a; 1966b, Munro et al, 1969, Malkinson, et al, 1995 y Cristian, 2002)

Diversos estudios han mostrado la utilidad de la técnica de tape stripping, por ejemplo: En una serie de investigaciones In Vitro e In Vivo usando la técnica TS, se pudo mostrar que el fármaco se encontraba dentro del estrato córneo determinado por la cuantificación de radio marcadores químicos sobre la cinta removida, encontrando que fueron claramente dependientes del vehículo. La penetración del fármaco In Vitro dentro del SC fue mayor que In Vivo, mientras que la penetración en tejidos profundos fue más alta In Vivo. Fue notado que mientras que, los diferentes vehículos pueden dar diferentes concentraciones terapéuticas de fármaco en la piel, fueron producidas cargas sistémicas similares (p.ej.: corticoesteroides).

Dupuis, Lotte, Rougier, y colaboradores^(Dupuis et al, 1984, 1986; Rougier et al, 1987a, 1987b) estandarizaron la metodología de la técnica TS. Su método determina la concentración de químicos en el estrato córneo al final de un periodo corto de aplicación (30min). Ellos encontraron una relación lineal entre el contenido del reservorio del estrato córneo y la absorción percutánea in vivo (cantidad de fármaco permeado en 4 días) usando el método estándar de excreción urinaria (Feldmann et al, 1969; 1970; 1974a y 1974b). Ellos han podido también mostrar para una variedad de vehículos farmacéuticos simples que la absorción percutánea del ácido benzoico depende del vehículo y puede ser predicho de la cantidad de fármaco dentro del estrato córneo a 30 min. después de la aplicación. A pesar del hecho que el ensayo proporciona predicciones fiables del total de la absorción de un grupo de compuestos seleccionados, interpretaciones mecánicas son todavía raras. Basado en los datos de Rougier y colaboradores, Auton presentó un acercamiento matemático inicial que puede ayudar explicar algunas de las observaciones anteriores^(Auton et al, 1990).

Pershing y colaboradores simultáneamente compararon un blanco con contenido de fármaco en estrato córneo de humano seguido de una aplicación tópica de una formulación comercial de dipironato de betasona al 0.05%. La correlación drástica entre el método del TS y la respuesta del blanco de la piel fue reportada de moderado a bueno, aunque la dosis de la formulación empleada en este estudio fue a niveles terapéuticos. Usualmente la captación de un fármaco es evaluada por la aplicación de una muestra y de productos de referencia simultáneamente en múltiples sitios de la piel en un solo estudio y las muestras de estrato córneo son obtenidas en intervalos secuenciales de los tiempos de aplicación^(Pershing et al, 1992, 1992 y 1994).

De una manera similar para evaluar la eliminación del fármaco de la muestra de productos de referencia, son aplicados por periodos específicos en múltiples sitios seguido por el removimiento secuencial del SC. Adicionalmente el estudio de la eliminación del fármaco en el SC se ha propuesto y ha sido incluido en las pautas del proyecto de la FDA^(Von, 1980, Lüker, 1984 y Shah, 1990).

Estos datos hacen pensar en la potencial aplicación de la técnica de Tape Stripping en estudios de dermatofarmacocinética ^(Von, 1980, Lüker, 1984 y Shah, 1990).

El Potencial Futuro del Método de TS: Shah y colegas resumieron los detalles esenciales expuestos en un panel de expertos internacionales quienes presentaron una serie de evidentes contribuciones en los talleres de la FDA sobre bioequivalencia de formas de dosificación tópica. Métodos de Evaluación Bioequivalente, tomado en septiembre de 1996. Los talleres exploraron la posibilidad de que la caracterización farmacocinética pueda proporcionar un planteamiento alternativo para juicios clínicos de la determinación de bioequivalencia de productos tópicos y en un modo paralelo para el uso de curvas de concentración–tiempo de fármacos dosificados sistemáticamente. Siendo válido y completamente acorde para divulgaciones científicas y estadísticas, este aprovecha la baja energía de estudios de dermatofarmacocinética al reemplazar pruebas clínicas, documentando bioequivalencia en la selección de fármacos de productos tópicos ^(Shah et al, 1996).

Preguntas sin contestar y Preocupaciones

A pesar del hecho que el método de TS se ha usado en dermatofarmacocinética durante varias décadas, no se han definido muchos detalles experimentales y la técnica todavía espera la aprobación rigurosa. Primero en las evaluaciones de bioequivalencia clásica los componentes del vehículo de una prueba y un producto de referencia pueden ser diferentes y pueden influir en ambas las propiedades adhesivas de la cinta, así como la cohesión de corneocitos. La caracterización dermatofarmacocinética puede ser sumamente compleja y susceptible al error. Como fueron descritos previamente por Surber y colaboradores, el vehículo puede cambiar la cohesión de los corneocitos significativamente. Se mostró en este trabajo que la proporción del desprendimiento de corneocitos a los sitios diferentes era muy difícil y la caracterización dermatofarmacocinética basada en un perfil de la concentración dentro del SC no era posible ^(Surber et al, 1993 y Molen et al, 1997).

Una observación similar fue hecha por Molen y colaboradores que mostraron que el TS en SC humano normal puede dar como resultado profundidades variables, debido a los surcos en la piel^(Surber et al, 1993 y Molen et al, 1997).

Diversos trabajos de investigación que usan la técnica de TS describen el uso de una cinta específica para asegurar el levantamiento constante de SC del área exacta de tratamiento^(Shah et al, 1990).

4.- Características y Propiedades del Clorhidrato de Fenazopiridina

a) Descripción: Este fármaco corresponde a un **analgésico** específico en infecciones de tracto urinario para ser utilizado por vía oral^(Parkedavis, pagina de Internet, 2003).

La fenazopiridina está indicada en el tratamiento de la insuficiencia hepática y renal.

En estudios hechos en animales, se ha demostrado que la fenazopiridina tiene efectos carcinogénicos. No existe evidencia de carcinogenicidad en seres humanos.

b) Propiedades Físicoquímicas del Clorhidrato de Fenazopiridina:

Fórmula Empírica es: $C_{11}H_{11}N_5 \cdot HCl$.

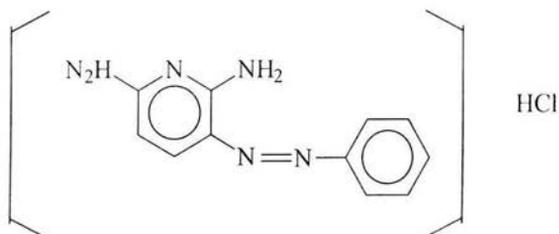


Figura No. 7 Estructura química del Clorhidrato de Fenazopiridina^(Merck, 2000).

c)Farmacología: (farmacocinética y farmacodinamia)

Nombre Químico: Clorhidrato de 2,6-diamino-3-fenilazopiridina ó Clorhidrato de 3-(fenilazo)-2,6-diaminopiridina, β -fenilazo- α,α' -diamono piridina hidrocioridrato (Tecnofarma, Nordox, pagina de internet)

Sinónimos: Fenazopiridina, Fenazo, Piridacil, Piridium, estos son ingredientes de Azo gantanol, Azo gastrisin, Azo mendalamina, Azotrex, y Uromida. Mallofen, Sedural, Urodinia, Fenazodina.

Peso Molecular: La fenazopiridina es un **azo-colorante** con un peso molecular de **249.70**. C 52.91%, H 4.84%, Cl 14.20%, N 28.05%.

Contenido de uniformidad: Contiene no menos del 99% y no más de 101% de Clorhidrato de fenazopiridina, calculado con referencia a la sustancia seca (4hr/105°C).

Características: es un polvo cristalino, sin olor característico, de color rojo claro u oscuro a violeta oscuro.

Temperatura de fusión: Aproximadamente 235°C con descomposición (Clarke, 1986; FEUM, 6a Ed. y Merck, 2000)

Solubilidad: ligeramente soluble en agua, alcohol y cloroformo: 1/300 de agua fría, 1/20 en agua hervida, 1/60 etanol, y 1/330 de cloroformo. Muy ligeramente soluble en éter, álcalis, lanolina soluble en ácido acético glacial, CF realmente forma fácilmente soluciones acuosas saturadas cuando se deja en reposo. Precipita en una solución del 2% a 25° después de 2 días y 1% de la solución únicamente después de meses. Con soluciones acuosas puede ser estabilizada adicionando un 10% de glucosa. Una parte es sólida si se mezcla en 100 partes de glicerol USP, también es soluble en etilen y propilen glicol. Insoluble en acetona, benceno, tolueno. En soluciones acuosas son de color amarillas y en soluciones ácidas son de color rojo ladrillo (Clarke, 1986; FEUM, 2001 y Merck, 2000)

Métodos de Cuantificación del CF:

- Pruebas de Color: Prueba verde de Mandelín y la prueba roja de Marquis.
- Cromatografía de capa fina: Sistema TA-Rf 59, sistema TB-Rf-01, sistema TC-Rf 50 (con solución de permanganato de potasio acidificado da la prueba positiva).
- Cromatografía de gases: sistema GA-fenazopiridina RI 2245, 4-amino fenol RI 1265, anilina RI 1158.
- Espectro ultravioleta: Etanol 238nm ($A = 455^a$), 277 nm.
- Espectro infrarrojo: principales picos en número de onda 1585, 1656, 762, 685, 1248, 1493 (revolver en nugol).
- Espectro de masas: principales picos en m/z 108, 81, 213, 54, 77, 136, 51, 43; 4-amino fenol 109, 80, 53, 81, 108, 52, 54, 110 (Clarke, 1986; FEUM, 2001 y Merck, 2000)

El Clorhidrato de Fenazopiridina: se absorbe después de la administración por vía oral, tiene biotransformación y rápida eliminación por vía hepática y posiblemente otros tejidos la metabolizan. Cabe destacar que uno de sus metabolitos principales es el **paracetamol ó acetaminofen**. La ligadura plasmática es inexistente y tiene una vida media de 8-12 horas. Hasta el 65%, 80% y 90% de la dosis puede excretarse sin sufrir cambios, se elimina por vía renal dentro de las 24 horas posteriores a su ingesta incluyendo sus metabolitos. Aproximadamente un 18% de la dosificación se elimina como paracetamol, cuando un 7% es de anilina, un 20% es N-acetil-4-amino fenol, 25% es 4-amino fenol y 45% no cambia de fármaco (Clarke, 1986 y Sanofi-Syntelao. pagina de Internet, 2003)

d) Indicaciones terapéuticas: Este fármaco es excretado en la orina en donde ejerce su acción por un efecto de **analgesia y anestésica tópica** sobre la mucosa urogenital del tracto urinario bajo, ocasionada por la irritación. Esta acción que ejerce el CF se encuentra indicado para el alivio sintomático a corto plazo ya que ayuda a disminuir las molestias que ocurren como los síntomas tales como el dolor, quemazón, la sensación de urgencia y/o frecuencia miccional y el tenesmo.

Analgésico auxiliar en el tratamiento de infecciones de las vías urinarias tales como: pielitis, pielonefritis, uretritis, uretrotrigonitis; generado por infecciones urinarias agudas, y dolorosas producidas por microorganismos **Gram negativos** mientras el agente bactericida controla la infección^(Tecnofarma, pagina de internet, 2003).
Terapia antibacteriana por infección, trauma, cirugía (como profiláctico en el pre y postoperatorio). procedimiento endoscopio, sondajes o instrumentación diagnóstica y terapéutica^(Sanofi-Syntelao pagina de internet, 2003).

e) Ventajas y desventajas al utilizar CF: El exacto mecanismo de acción de este fármaco por el cual estos efectos ocurren no está del todo claro y se desconoce hasta la fecha. Las propiedades farmacocinéticas de este fármaco no han sido determinadas. Se excreta rápidamente por los riñones, y alrededor de un 65% de la droga es excretada sin cambios metabólicos por vía urinaria.

Ya que este fármaco sólo genera alivio sintomático^(Bago, pagina de internet, 2003), hasta que pueda determinarse y tratarse la causa subyacente de la irritación donde se deben instaurar las medidas correctivas de la causa que genera las molestias, y la Fenazopiridina será discontinuada una vez que el control de los síntomas se haya obtenido.

La acción analgésica de este fármaco puede reducir o eliminar la necesidad de analgésicos sistémicos y narcóticos.

Sin embargo el CF es compatible con terapia antibacteriana y puede ayudar a aliviar el dolor y las molestias durante el intervalo que existe antes de que la terapia microbiana pueda controlar la infección. La terapia antibiótica se mantendrá por el tiempo que indique el médico.

f) Posología: Dosis usual para el adulto: Infecciones del tracto urinario no complicada causada por *E. coli*, *Klebsilla pneumoniae* o *Proteus mirabilis*. La dosis recomendada para adultos es de 2 comprimidos recubiertos de 100 mg o 3 veces al día después de las comidas^(Bago, pagina de internet, 2003) y 400 mg cada 12, horas por tres días, dosis máxima en adultos: 800 mg por día. La dosis usual pediátrica: niños debajo de 18 años de edad su uso no es recomendado. Tomar con abundante líquido^(Tecnofarma, pagina de internet, 2003). Dosis adultos: 200 mg cada 8 horas junto o después de los alimentos y niños: 100 mg cada 8 horas a criterio del médico, junto o después de los alimentos.

La Fenazopiridina debe tomarse con o después de los alimentos, para disminuir la irritación gástrica. Cuando se usa este fármaco concomitantemente con terapia antimicrobiana, o concurrentemente con un antibacteriano en el tratamiento de infecciones del tracto urinario, la duración de la terapia en la administración de Fenazopiridina no deberá exceder de los **dos días**. No existe evidencia adecuada disponible de que la terapia más prolongada con CF proporciona mayor beneficio terapéutico que la obtenida con el antibacteriano solo. La duración del tratamiento se establece a criterio del médico, cuando han sido controlados los síntomas. No se recomienda su uso por más de 15 días consecutivos. Vía de administración: oral^(Sanofi-Syntelao, pagina de internet, 2003).

g) Presentaciones

Envase conteniendo 15 comprimidos recubiertos^(Tecnofarma, pagina de internet, 2003). Caja por 10 y 100 tabletas^(Parkedavis; pagina de internet, 2003). Caja con 20 y 24 comprimidos de 100 mg en tiras de celopolial^(Sanofi-Syntelao; pagina de internet, 2003). Envase conteniendo 12 comprimidos recubiertos. Cada comprimido contiene CF 100 a 200 mg y excipiente cbp 1 comprimido. Tabletas **Fenazopiridina**. Cada tableta recubierta contiene: fenazopiridina 100 mg excipientes c.s^(Parkedavis; pagina de internet, 2003). Cada gragea contiene: CF 100 mg^(Bago; pagina de internet, 2003).

Cada comprimido recubierto contiene: trimetoprima 120.0 mg; sulfametoxazol 600.0 mg; Fenazopiridina 150.0 mg^(Sanofi-Syntelao, pagina de internet, 2003).

Conservacion y almacenamiento Consérvese a temperatura ambiente a no más de 30 °C y en lugar seco^(Sanofi-Syntelao, pagina de internet, 2003).

Legendas de protección: Literatura exclusiva para médicos. Su venta requiere receta médica. No se deje al alcance de los niños^(Sanofi-Syntelao, pagina de internet, 2003).

h) Efectos colaterales o reacciones adversas: En general son poco frecuentes: con el uso de la Fenazopiridina, en el **SNC** pueden aparecer somnolencia, debilidad, parestesias, vértigo, cefaleas, mareos. Rara vez alteraciones visuales subjetivas y reversibles, sin hallazgos objetivos; fotosensibilidad, cambio en la percepción de los colores, dificultad para enfocar, disminución de la agudeza visual y diplopía. En raras ocasiones se ha observado parálisis del sexto nervio craneal. Ocasionalmente manifestaciones gastrointestinales (tales como dispepsia, dolor abdominal, náusea, vómito, indigestión o dolor estomacal y abdominal). Mientras se usa esta medicación prestar atención a los siguientes signos potenciales de efectos adversos por **Alérgicas:** salpullido, prurito, dermatitis alérgica, meningitis aséptica, urticaria, angioedema, eosinofilia, rigidez de las articulaciones, calambres y ha sido descrita una reacción similar a la anafiláctica con el uso de este fármaco (reportado en un paciente: fiebre, confusión), cuya relación causal no se pudo precisar e insuficiencia renal. Las reacciones de fotosensibilidad, principalmente en las superficies de piel expuestas, desaparecen en cuanto se suspende el tratamiento.

En dosis superiores a las usuales se ha descrito la aparición de anemia hemolítica, hepatotoxicidad (ictericia)^(Tecnofarma, pagina de internet, 2003) y empeoramiento, se ven con mayor frecuencia cuando se administra en casos con insuficiencia renal por toxicidad o raramente metahemoglobinemia^(Parkedavis, pagina de internet, 2003) (coloración azul o azul púrpura de la piel)^(Sanofi-Syntelao, pagina de internet, 2003).

i) Alteraciones en los resultados de pruebas de laboratorio: Alteración de exámenes de laboratorio: Debido a sus propiedades como un **compuesto azoado**, la administración de la Fenazopiridina, puede interferir y alterar el resultado de algunos exámenes de laboratorio específicamente, fundamentalmente de orina (uro-análisis) y los que se basan en determinaciones por colorimetría o espectrometría o espectroscopía; por ejemplo: Puede haber trastornos en exámenes de orina, como son la determinación de albúmina, bilirrubina. Puede obtenerse una reacción falsa positiva a la prueba de la glucosa y de las porfirinas, por la liberación de ácido glucurónico de los metabolitos excretados como fenosulfoftaleína, proteína en orina, y urobilinógeno urinario. Se pueden obtener resultados incorrectos para esteroides 17-ceto y cetogénicos 17 hidrocorticosteroides, cuerpos cetónicos, 17-cetoesteroides, (todos en orina)^(Sanofi-Syntelao, pagina de internet, 2003)

j) Contraindicaciones: Deberá evaluarse la relación riesgo-beneficio en los siguientes problemas médicos: Historia de reacción alérgica a la Fenazopiridina, es decir no debe ser administrado a aquellos pacientes que hayan presentado reacciones de hipersensibilidad conocida a la Fenazopiridina y/o sus metabolitos. **Se encuentra contraindicado en pacientes con insuficiencia renal ya que se incrementa el riesgo de acumulación en la piel, con un tinte amarillento y que indica la suspensión del fármaco ya que son síntomas de toxicidad**^(Tecnofarma, y Bago; paginas de internet, 2003). Puede aparecer toxicidad hepática y/o renal, la cual puede estar generada por hipersensibilidad al compuesto.

Los pacientes con deficiencia al nivel de glóbulos rojos de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa están predispuestos a la aparición de hemólisis y se incrementa el riesgo de experimentar anemia hemolítica severa. Durante la hepatitis se incrementa el riesgo de efectos adversos^(Parkedavis, pagina de internet, 2003).

En casos de sobredosis se han presentado psicosis tóxicas o convulsiones, en general, estas últimas han ocurrido en enfermos con antecedentes de epilepsia o arteriosclerosis cerebral. En caso de sobredosificación deberán proporcionarse las medidas adecuadas de apoyo, tales como: lavado gástrico, monitoreo estrecho de las condiciones del paciente y proporcionar apoyo cardiorrespiratorio, en caso necesario^(Sanofi-Syntelao, pagina de internet, 2003).

Está contraindicado en enfermedades graves del parénquima hepático, hipersensibilidad a sulfanilamidas, alteraciones de la hematopoyesis, insuficiencia renal grave, cuando no puede determinarse la concentración plasmática de los fármacos, oliguria, glómulo nefritis, uremia. No debería usarse en el tratamiento de faringe amigdalitis por Estreptococo β -hemolítico del grupo A. No se recomienda su uso en mujeres embarazadas (pielonefritis) y nodrizas y trastornos gastrointestinales ni en pacientes con antecedentes de meta-hemoglobinemia por deficiencia enzimática, su administración en menores de 12 años queda bajo la responsabilidad del médico^(Sanofi-Syntelao, pagina de internet, 2003).

k) Precauciones generales: La aparición de un tinte icterico de la piel o de las escleras, puede indicar la acumulación del fármaco producto de algún grado de disfunción renal. Se debe tener presente que los pacientes de edad avanzada tienen una declinación de su función renal. Se debe advertir a los pacientes que este fármaco produce un color anaranjado a rojo en la orina, la que no debe confundirse con hematuria. En pacientes con insuficiencia renal se puede producir acumulación del producto con manifestaciones tóxicas. No debe usarse concomitantemente con sulfacitina^(Parkedavis, y Sanofi-Syntelao, paginas de internet, 2003).

l) Efectos de carcinogénesis, mutagenesis, teratogenesis y fertilidad: En tratamientos largos con CF, deben realizarse periódicamente recuentos sanguíneos y pruebas de función hepática y renal, debe usarse con precaución en pacientes con enfermedad hepática, epilepsia o aterosclerosis cerebral severa. No exponerse a los rayos solares durante el tratamiento con CF para evitar reacciones de fotosensibilidad^(Sanofi-Syntelao; pagina de internet, 2003).

En animales, se ha demostrado que la fenazopiridina tiene efectos carcinogénicos. No existe evidencia de carcinogenicidad en seres humanos^(Sanofi-Syntelao; pagina de internet. 2003)

Carcinogénesis mutagenesis, alteración de la fertilidad. La administración por períodos prolongados o a largo plazo del CF, ha inducido neoplasias en ratas (a nivel intestinal) y ratones (a nivel hepático)^(Tecnofarma; pagina de internet. 2003). Aun cuando en el ser humano no ha sido demostrado ningún tipo de asociación entre este fármaco y la aparición de algún tipo de neoplasia, es conveniente destacar que no se han realizado estudios epidemiológicos en humanos^(Parkedavis; pagina de internet. 2003)

Reproducción gestación y embarazo: Este es un Fármaco que se encuentra en categoría b. Estudios realizados sobre el patrón reproductivo de ratas, usando dosis de hasta 50 mg/kg/día, y no se ha comprobado ningún tipo de alteración sobre la fertilidad o sobre los fetos en aquellas ratas preñadas sin embargo el CF no se deberá administrar durante los primeros dos trimestres de la gestación. Sin embargo, no han sido realizados estudios bien controlados en mujeres embarazadas, y ya que no siempre los estudios en animales están en directa relación con el potencial daño sobre el feto humano, sólo se usará en el embarazo bajo una estricta necesidad y cuando los potenciales beneficios superen los potenciales riesgos. El producto ha sido utilizado durante el tercer trimestre del embarazo sin producir daños aparentes ni en el producto, ni en la madre. Con todo, el médico deberá evaluar el beneficio de la administración de fenazopiridina contra los posibles riesgos que ello implique^(Tecnofarma, pagina de internet. 2003)

II) Manifestaciones y manejo (sobredosificación o ingesta accidental):

En pacientes con función renal normal, en los cuales se administre una dosis superior a la recomendada, o en pacientes con función renal alterada, con dosis terapéuticas normales, se puede presentar un aumento en las concentraciones séricas del fármaco y llevar a reacciones tóxicas. La metahemoglobinemia puede presentarse después de una sobredosis masiva del Fco.

La administración de azul de metileno (1 a 2 mg/kg de peso corporal administrado por vía intravenosa) o 100 a 200 mg de ácido ascórbico por vía oral, pueden causar una rápida reducción de la metahemoglobinemia con una disminución importante de la cianosis, lo cual ayuda a su vez a un adecuado diagnóstico^(Tecnofarma; pagina de internet, 2003).

Otras: en raras ocasiones se han presentado colestasis, acidosis metabólica, trombocitopenia, leucopenia o anemia hemolítica.

Lactancia: no existe información disponible sobre la aparición del CF o algunos de sus metabolitos en la leche. En consecuencia su utilización durante esta etapa deberá evaluarse. No se han documentado problemas en humanos (Parke-Davis, y Sanofi-Syntelabo, paginas de internet, 2003)

Pediatría: no se han llevado a cabo estudios apropiados en la población pediátrica. Por consiguiente no se ha documentado problemas pediátricos específicos a la fecha^(Tecnofarma; pagina de internet, 2003).

Geriátria: no se han efectuado estudios apropiados en la población geriátrica; no se han documentado problemas geriátricos específicos a la fecha. Sin embargo, los ancianos son más susceptibles de tener la función renal afectada relacionada con la edad, lo que puede aumentar el riesgo de acumulación y toxicidad en pacientes que reciben fenazopiridina^(Tecnofarma; pagina de internet, 2003).

La orina puede tornarse de color naranja pudiendo manchar la ropa. Evitar el uso de lentes de contacto durante la terapia ya que puede producir tinción permanente de los mismos.

En pacientes diabéticos puede causar resultados falsos en la determinación de azúcares y cetonas urinarias. Por la posible interferencia en los resultados de ciertas pruebas de laboratorio deberá notificarse a la persona encargada que se está utilizando esta medicación^(Sanofi-Syntelabo; pagina de internet, 2003).

III METODOLOGIA

A.- Material, Aparatos y Reactivos

- REACTIVOS:

Clorhidrato de Fenazopiridina (Sanofi Synthelabo)

Etolanol absoluto 99.9% (Fermont®, Monterrey N. L. México).

Octanol 99.9% (Fermont®, Monterrey N. L. México).

Agua destilada (obtenida del equipo Milli-Q, Millipore)

Fosfatos monobásico de potasio (PQM, S.A. Méx.)

Cloruro de Sodio 100.3% (J.T. Baker Edo. de México)

- MATERIALES.

Vidriería y material común de laboratorio.

Cinta adhesiva (Scotch # 845, 3 M, USA).

Material Biológico (piel de cerdo)

- APARATOS Y EQUIPOS:

Balanza analítica (BOECO, mod. BBC 32, Alemania)

Potenciómetro (modelo 430, UK).

Espectrofotómetro (Varian, mod. Cary IE 95031003, Australia).

Parrilla eléctrica con agitación (Multi 15 Stirrer, Mod. VELP CIENTÍFICA, USA)

Dermatoma (Zimmer, mod. 901, USA)

Centrífuga (Hettich ZENTRIFUGEN, EBA 12, Mod. D78532 Tulttlingen).

B.- Obtención de la Piel y Almacenamiento

Se utilizó la piel de cerdo de la región dorsal, la cual se obtuvo directamente del rastro, evitando el paso por vapor y agua caliente. La piel no debe de estar tratada, es decir debe de ser cortada recién sacrificado el animal y almacenarse.

Para ello, la piel se rasuró con una navaja de bisturí eliminando el pelo, también se le quitó el exceso de grasa subyacente que pudiera contener utilizando el dermatoma, y luego se procedió a cortar la piel en pedazos cuadrados de 16 cm². Durante este proceso se hidrató con solución salina fisiológica para evitar que se resecaran. Se cubrieron con plástico autoadherible para protegerlos y ponerlos en refrigeración a 0°, procurando no dejar pasar más de treinta días en congelación. Se desechó todo el tejido adiposo y muscular en exceso.

C.- Determinación de la pureza del CF

Se realizó de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos de México 2001. (Anexo No.1)

D.- Determinación de la solubilidad del CF

En viales pequeños se colocaron 2 ml de una mezcla de buffer de fosfatos pH 7.4 (preparada de acuerdo a la USP 2000) y etanol puro (50:50 respectivamente) y se agregó suficiente CF para saturar el medio.

Se mantuvieron los viales a una temperatura de 37° C en baño María durante 24 hrs.

Las suspensiones se centrifugaron a 2500 rpm por 15 min, tomando el sobrenadante para hacer las diluciones necesarias con solución Buffer de fosfatos a pH 7.4. Las soluciones se leyeron a la longitud de onda de máxima absorción (425 nm) utilizando un espectrofotómetro.

La concentración se obtuvo interpolando en la curva de calibración correspondiente.

E.- Determinación del Coeficiente de Partición octanol/Buffer pH 7.4

En un embudo de separación se colocaron 20 ml de Buffer de fosfatos pH 7.4 y 20 ml de octanol.

El embudo se agitó durante una hora con el fin de saturar ambas fases.

En recipientes de 50 ml se colocaron 5 ml de la solución acuosa y 5 ml de octanol, añadiendo una cantidad del PA exactamente pesado y se disolvió en la fase orgánica.

La experiencia se realizó por triplicado corriendo un blanco. Los sistemas se mantuvieron en agitación constante durante 24 h.

Transcurrido el tiempo de agitación, se separaron ambas fases. La fase acuosa se diluyó con un volumen igual de etanol y se leyó en el espectrofotómetro a 425 nm.

La concentración de la fase oleosa se determinó por diferencia con respecto a la concentración inicial.

F.- Curva de Calibración para CF

Se preparó una curva de calibración en solución Buffer pH 7.4: etanol (50 : 50), misma que se leyó a 425 nm. Por otro lado, con el fin de determinar la interferencia del SC en la cuantificación, se realizó una curva de calibración por triplicado para el CF, en Buffer pH 7.4: etanol (50:50) en presencia de pequeñas porciones de piel. Esto se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se tomó piel de cerdo congelada y se descongeló a temperatura ambiente utilizando solución salina 0.9 %. Una vez descongelada se secó con toallas de papel para quitar el exceso de solución.

Un área de piel de 16 cm² se sometió a veinte "stripping" consecutivos con cinta adhesiva (como se explica posteriormente) las cintas se colocaron juntas en un vaso de precipitados de 250 ml con la mezcla de Buffer de fosfatos pH 7.4: etanol (50:50), con agitación, utilizando una barra magnética, en una parrilla de agitación durante una hora.

Transcurrido este tiempo se filtró la mezcla a vacío utilizando un embudo Kitazato, recolectando la mezcla en un vaso de precipitado y por último se guardó en un recipiente hermético para evitar la evaporación. Esta solución se utilizó para disolver la CF y hacer las diluciones pertinentes para la curva. Así mismo se empleó como blanco para la curva de calibración y para leer las muestras en el Espectrofotómetro.

G.- Estudios de Penetración

Estos estudios se realizaron en piel de cerdo, empleando celdas de perfusión de vidrio con área de 13.2026 cm^2 .

A un área de piel de cerdo descongelada, se le fijó la celda de vidrio por medio de grasa de silicón de tal manera que se adhiriera todo el contorno de la base de la celda, para evitar que hubiera fugas.

Cuando se tuvo ya preparada la celda en la piel, se pesó en un papel parafina una cantidad conocida de Fenazopiridina (0.050 g aproximadamente), se agregó en la piel esparciendo el principio activo sobre toda la superficie que abarca la celda, se le agregó 1 ml en gotas de buffer de fosfatos pH 7.4 con el fin solamente de humedecer el CF (aquí se puede comprobar si está bien adherida la celda a la piel ya que la suspensión no debe traspasar la base de la celda, para que no haya pérdida del principio activo).

Después de humedecer el PA se dejó en contacto con la piel el tiempo estipulado (40 minutos, 100 minutos y 180 minutos).

Transcurrido el tiempo de exposición se procedió a retirar la celda y a enjuagar con 200 ml. de solución salina la superficie de la piel, frotando suavemente, quitando perfectamente el exceso de principio activo y nuevamente se secó la piel con una toalla de papel.

H.- Técnica de muestreo del estrato córneo (tape stripping)

Una vez transcurrido el tiempo de contacto del CF con la piel, se procedió a retirar el SC mediante Tape Stripping, de acuerdo a la siguiente metodología: Se cortaron los pedazos de cinta adhesiva del tamaño del área de exposición de la celda, se pesaron de manera individual, y luego se procedió a hacer el stripping, el cual consistió en colocar la cinta de tal manera que cubriera la superficie de exposición y con un objeto como la parte posterior de una espátula se hizo presión uniforme. Se desprendió la cinta, se volvió a pesar y por último se colocó en una caja Petrí bien identificada. Se repitió el procedimiento sucesivamente hasta terminar todos los "stripping", desprendiendo de manera alternada de un lado a otro, como lo indica la figura No. 8.

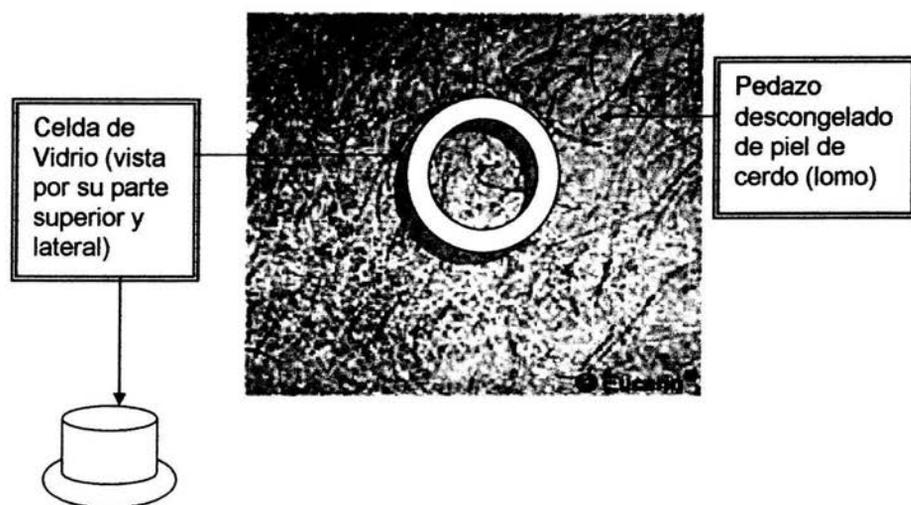


Fig. No. 8 *Ilustración del procedimiento de la "Técnica de Tape Stripping".*

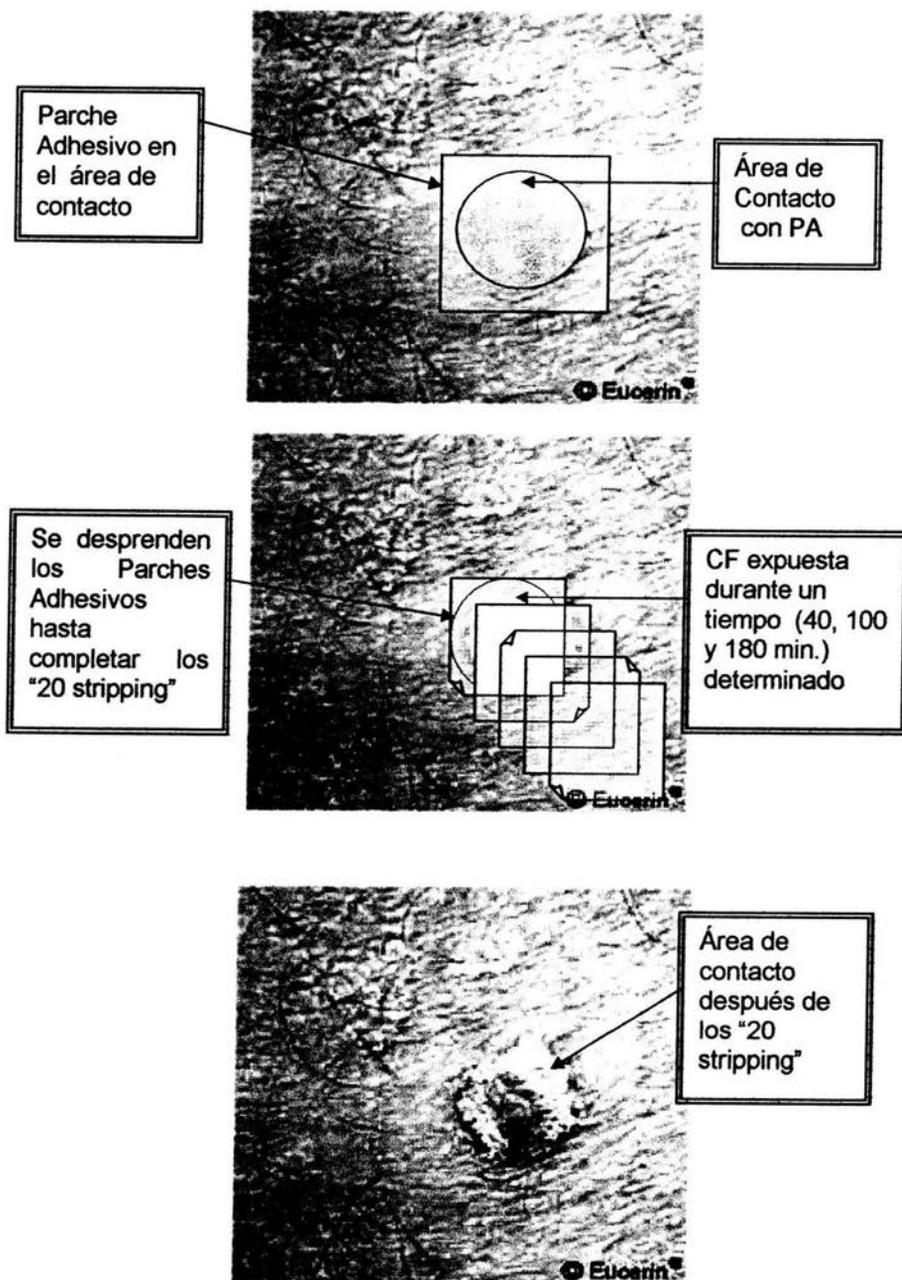


Fig. No. 8 (Continuación).

Una vez realizados todos los "stripping" (20 cintas), las cintas se cortaron en cuatro partes y se depositaron en frascos de vidrio con tapa, agregando 3 ml de la solución Buffer pH 7.4: etanol (50:50) antes mencionada para extraer el principio activo de las cintas. Se taparon herméticamente cada uno de los frascos, para evitar que se evaporara el disolvente y se dejaron reposar un día, sin agitación.

I.- Cuantificación del CF por Espectrofotometría

Transcurrido el tiempo de extracción se procedió a leer las muestras obtenidas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 425 nm (longitud de onda de máxima absorción para la fenazopiridina), utilizando como blanco buffer de fosfatos: etanol (50:50) para ajustar a cero el equipo.

Se comenzaron a leer las muestras de la menos concentrada (es decir la muestra 20) a la más concentrada (primer muestra).

Después de leer las muestras se procedió a realizar los cálculos pertinentes para obtener los perfiles de penetración y determinar la cantidad y la distancia máxima de penetración.

Se hizo el tratamiento estadístico adecuado para establecer si había diferencia entre los tiempos de contacto trabajados (Anexo No. II).

V.- RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

V 1.- Determinación de la Pureza de CF

La pureza del CF fue de 94.45%; esta fue evaluada de acuerdo al procedimiento indicado en la Farmacopea de los Estados Unidos de México 2001, (Ver anexo I).

V 2.- Determinación de la Solubilidad del CF en mezcla de Buffer de Fosfatos y Etanol.

Se decidió utilizar esta mezcla y a pH 7.4 ya que este valor se acerca a las condiciones fisiológicas corporales, añadiendo etanol debido a la baja solubilidad acuosa del CF. El valor de solubilidad obtenido es importante pues con esta mezcla se prepararon las curvas de calibración y se extrajo el CF de las cintas.

El valor de solubilidad obtenido en esta solución fue de **198.85[±]3.50 µg/ml**. (Ver anexo I).

V 3.- Determinación del Coeficiente de Partición del CF en Buffer de Fosfatos y Octanol.

El coeficiente de partición se determinó experimentalmente utilizando como medio acuoso Buffer de fosfatos pH 7.4 y como fase oleosa octanol puro. La fase oleosa se leyó a 425 nm. El espectro de absorción del CF en octanol se muestra en la figura 9.

El valor del coeficiente de partición es indicativo de la afinidad del fármaco por un medio lipofílico (octanol), el cual se toma como referencia considerando que el SC es una estructura de naturaleza lipofílica.

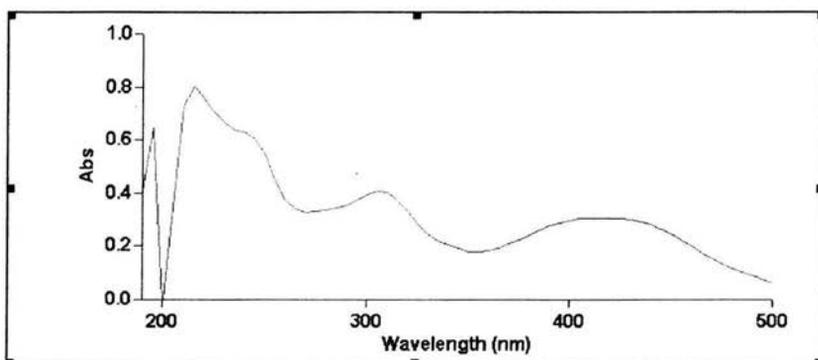
De acuerdo a los resultados obtenidos y mostrados en la Tabla 3, a pH 7.4 el coeficiente de reparto es ligeramente superior a 7, lo cual indica que tiene una gran afinidad por el medio lipofílico. Esto es adecuado si se espera que el P.A. se absorba pues una lipofilia alta favorece la partición del fármaco con el SC (lipofílico). Un coeficiente de reparto igual a la unidad, indica que la molécula se reparte de manera muy parecida entre el SC y el vehículo, (Ver anexo I).

Se puede calcular el coeficiente de partición con la siguiente formula:

$$CP = [Fase\ lipídica] / [Fase\ acuosa]$$

Tabla No. 3 Coeficiente de Partición del CF (octanol y Buffer de fosfatos pH=7.4)

Coeficiente de Partición por Triplicado		
7.73	7.13	7.76



Graph 1 - sample1

X: 424.9353, Y: 0.3004484

Figura No. 9 Espectro del CF en octanol.

V 4.- Curva de Calibración de CF en Buffer de Fosfatos:Etanol(50:50).

El CF se analizó por espectrofotometría UV-Vis. Los espectros de absorción obtenidos, muestran un máximo a 425 nm. A esta longitud de onda se leyeron las curvas de calibración, cabe hacer notar que se prepararon curvas con piel y sin piel (ver metodología), con el fin de determinar si se tenía alguna interferencia por parte del estrato corneo que se estaba retirando o bien por el adhesivo empleado en la técnica de tape stripping. Las Figuras de las curvas de calibración obtenidas se muestran en el Anexo II.

Para evaluar la linealidad del método se determinó la respuesta analítica (absorbancia), para cada cantidad de PA analizada en Buffer de Fosfatos con Etanol (50:50), con piel y sin piel. Las curvas de calibración obtenidas se muestran en la Figura 10.

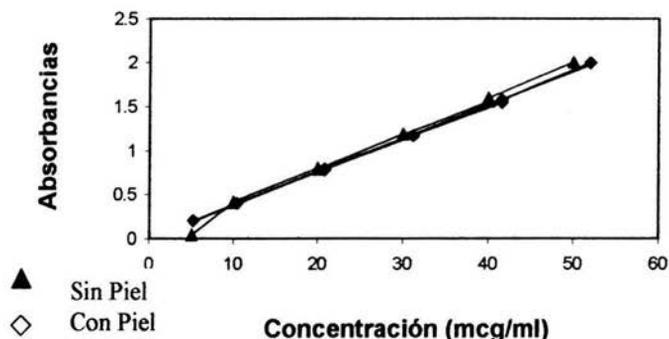


Figura No. 10 Curvas de Calibración del CF ($\lambda = 425 \text{ nm}$), en Mezcla de Buffer de Fosfatos con Etanol (50:50) con piel y sin piel.

En la Figura No. 10 Se muestra que ambas curvas (con piel y sin piel) siguen la misma tendencia, no obstante el coeficiente de variación (CV) es mucho mayor para la curva con piel (36.98) que para aquella sin piel (1.46). Esto era de esperarse considerando que la presencia de material biológico aumenta la variabilidad.

Se hizo una comparación de pendientes ($t_{\text{exp.}}$: $m_1 = 0.041$ y $m_2 = 0.038$ y $t_{\text{tab.}}$: 2.306) confirmando que no hay diferencia entre las pendientes.

Ambas curvas presentan coeficientes de determinación (r^2) superiores a 0.99, como se muestra en la tabla 4.

Tabla No. 4 Resultados de Regresión Lineal de las Curvas de Calibración del CF sin piel y con piel (Ver anexo II).

Parámetros Estadísticos	Curva de Calibración Con Piel	Curva de Calibración Sin Piel
m	0.0403	0.0380
B	-0.0787	-0.0011
r^2	0.9944	0.9997

V 5.- Limite de Detección del CF

Se determinó el limite de detección del método a partir de los datos de la curva de calibración del CF con piel. La ecuación obtenida a partir del análisis de regresión lineal de la respuesta analítica en función de la cantidad de CF es la siguiente:

$$Y = [\text{Cantidad del CF } (\mu\text{g})] * 0.0379823 + (0.001684) \dots (iv)$$

Tabla No. 5 Límite de detección de las muestras del CF

[CF] mcg	Respuesta Analítica	LCI al 95% De la Abs	LCS al 95% de la Abs
0.0	0.0017	-0.1393	0.1427
5.2	0.1960	-0.1960	1.4233
10.4	0.3936	-0.6695	1.4564
20.8	0.7880	-0.2743	1.8517
31.2	1.1840	0.1209	2.2469
41.6	1.5792	0.5657	2.5925
52	1.9744	0.6272	3.3215

El valor de la respuesta analítica es **0.1427** correspondiente al LCS de la cantidad de **0.0 μg** de PA, se interpoló en la curva de calibración anterior. Como sabemos el límite de detección, en éste caso, es la cantidad estimada del LCS del intercepto en la recta de regresión. **El límite de detección obtenido fue 3.8 μg .**

V 6.- Estudios de Penetración

Se realizó el estudio de permeación del CF a través de la piel del lomo de cerdo a diferente tiempo de exposición y por triplicado; se utilizó como modelo animal piel de cerdo ya que en estudios realizados In Vitro se ha visto que tiene propiedades histológicas y biológicas similares a la piel humana^(Auton, 1990; Feldmann et al, 1969 y 1974 y Pershing, 1992). En el Anexo III se pueden observar los perfiles de penetración obtenidos para los diferentes tiempos de contacto. Las Figuras No. 11 a la No.14, como era de esperarse a mayor profundidad del SC, menor cantidad del CF, por lo que la mayor parte se encuentra en la superficie de la piel.

Este análisis nos permite conocer la cantidad de PA que penetra en el SC después de las permeaciones, sometidas a diferentes tiempos de exposición y por triplicado.

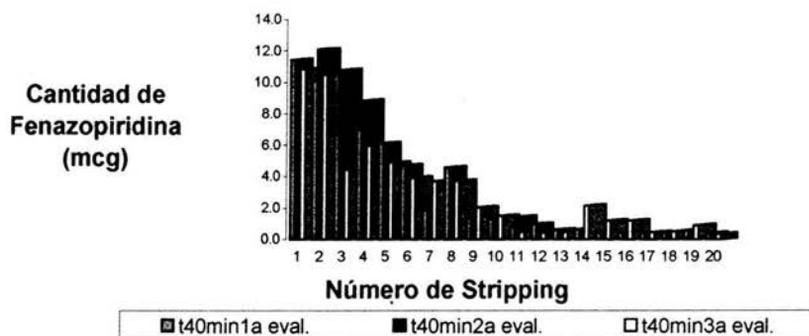


Fig. No. 11 *Histogramas de las cantidades del CF (μ g) en un tiempo de exposición de 40 min.*

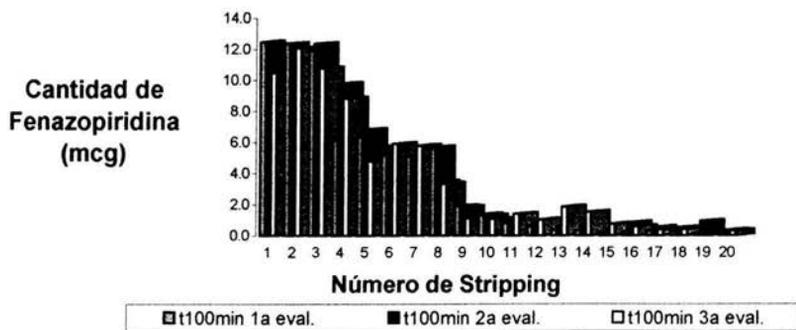


Fig. No. 12 *Histogramas de las cantidades del CF (μg) en un tiempo de exposición de 100 min.*

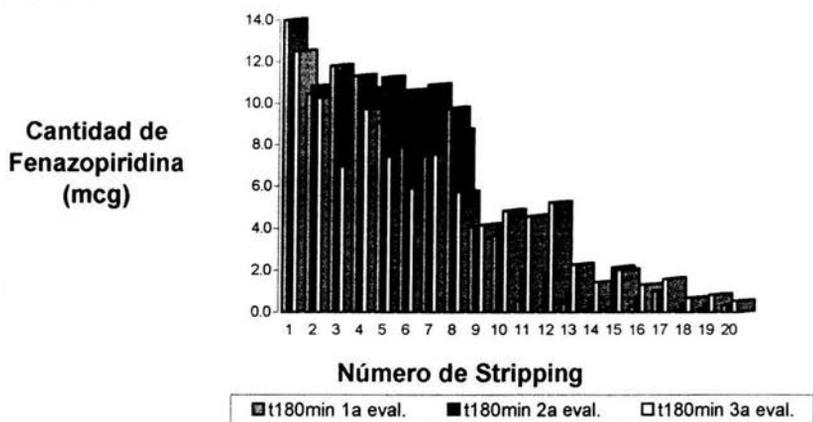


Figura No. 13 *Histogramas de las cantidades del CF (μg) en un tiempo de exposición de 180 min.*

En la metodología seguida para los tiempos de contacto probados se indica que en todos los casos la piel se lavó con 200 ml de solución salina, frotando (sin dañar la superficie).

Se realizó una prueba adicional para evaluar el efecto de intensidad del lavado, tomando el tiempo de contacto de 3hr, con la diferencia del lavado más intensamente (con más cantidad de solución salina y directamente con el chorro del agua potable).

Los resultados de esta prueba (Fig. No. 14) muestran que la cantidad retenida y la distancia de penetración se redujeron hasta valores menores a los observados en las pruebas iniciales con un tiempo de contacto de 40 min. Esto evidencia la importancia de la forma de lavado para retirar el exceso de fármaco contenido en la piel.

No obstante, es importante mencionar que aunque la cantidad permeada y la distancia de penetración se redujeron considerablemente, el CF no fue eliminado completamente de la piel.

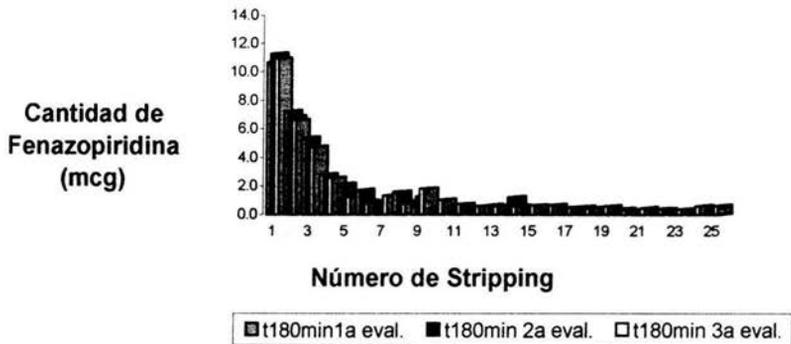


Figura No. 14 Histogramas de las cantidades del CF (μg) en un tiempo de exposición de 180 min, para la prueba de lavado drástico.

En cuanto a la cantidad máxima acumulada en la piel de cerdo podemos observar que aparentemente hay una dependencia con respecto al tiempo de contacto. Como se muestra en la Fig. 15 a mayor tiempo de contacto mayor es la cantidad de CF acumulada en el SC.

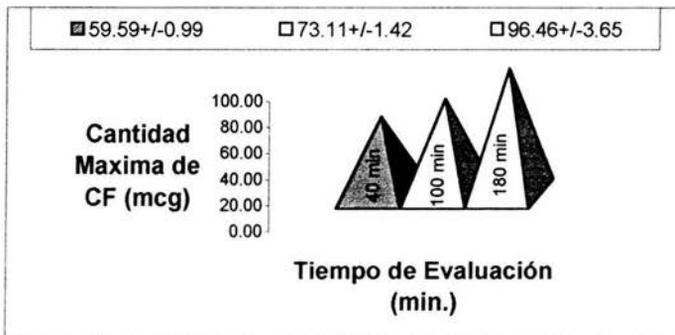


Fig. No. 15 Cantidades Máximas permeadas de CF a los tiempos de contacto evaluados.

Como se observa en la fig. 16, la distancia máxima promedio a la que penetra el CF en el SC aparentemente también aumenta al incrementarse el tiempo de contacto.

Para determinar si hay diferencias significativas entre cantidades permeadas y las distancias de penetración en relación de los diferentes tiempos de contacto, se realizaron análisis de varianza.

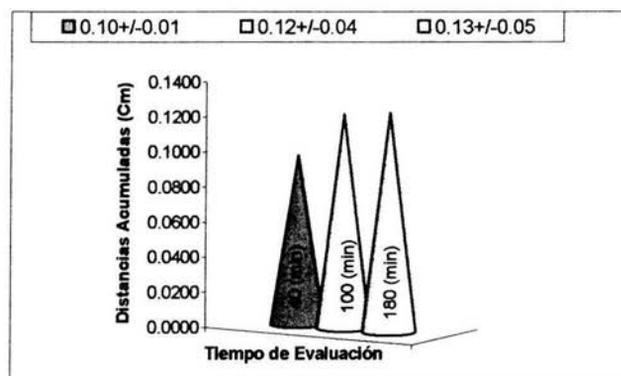


Fig. No. 16 *Distancias máximas de penetración del SC a los diferentes tiempos de contacto.*

Para la distancia de penetración se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho. Que la distancia es igual para diferentes tiempos de exposición por lo que ningún factor importa.

Ha: Hay diferencia entre las distancias por lo que si importa el factor tiempo de exposición.

Criterios de Aceptación:

Si $F_{cal.} < F_{crítica}$ no se rechaza Ho.

Si $F_{cal.} > F_{crítica}$ se rechaza Ho.

Tabla No. 6 Análisis de Varianza para Distancias Acumuladas

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA					
FUENTE	GI	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F CAL.	F TABLAS F 95,2,6
CANTIDAD (columnas)	$i-1=(3-1)=2$	0.0032	0.0016	0.9249	4.76
ERROR (filas)	$N-j=(9-3)=6$	0.0102	0.0017		
TOTAL	$N-1=(9-1)=8$	0.0134			

Se puede observar en la tabla anterior que no existen diferencias significativas en cuanto a las distancias acumuladas de penetración (ya que el valor de $F_{exp} = 0.92$ y $F_{tablas} = 4.76$), para los tres tiempos de contacto probados. Por lo tanto se puede decir que la distancia de penetración no se vio afectada por el tiempo de contacto (Ver Anexo II).

Para las cantidades permeadas se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho. Las cantidades son iguales a diferentes tiempos de exposición.

Ha: Las cantidades son diferentes a los diferentes tiempos por lo que sí importa el factor tiempo de exposición.

Criterios de Aceptación:

Si $F_{cal.} < F_{crítica}$ no se rechaza Ho.

Si $F_{cal.} > F_{crítica}$ se rechaza Ho.

Tabla No. 7 Análisis de Varianza para Cantidades

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA					
FUENTE	GI	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F CAL.	F TABLAS F 95,2,6
CANTIDAD (columnas)	$i-1=(3-1)=2$	2095.8941	1047.9470	105.9012	4.757
ERROR (filas)	$N-j=(9-3)=6$	59.3731	9.8955		
TOTAL	$N-1=(9-1)=8$	2155.2675			

El análisis de varianza para la cantidad total permeada (Tabla No. 7) muestra que hay diferencias significativas entre los tres tiempos de contacto (ya que sus valores son: $F_{exp.} = 105.90$ y $F_{tablas} = 4.75$). Para demostrar entre qué tiempos existían diferencias, se realizó la prueba de Duncan. Como se muestra en el Cuadro 1, de acuerdo a esta prueba, existen diferencias entre los tres tiempos de contacto (Ver Anexo II).

Cuadro 1

Media	Media	Media
1	2	3
59.417	73.113	96.457

Medias	Diferencias de Medias
M2 - M1 =	13.6955 > 6.2665
M3 - M1 =	37.0400 > 6.4946
M3 - M2 =	23.3445 > 6.2665

De acuerdo a las pruebas realizadas, nos permite afirmar que a mayor tiempo de contacto mayor es la cantidad permeada del CF. Este es un resultado importante por la cantidad que puede irse acumulando en piel si el tiempo de contacto es prolongado, sobre todo considerando los efectos tóxicos, entre ellos de fotosensibilidad que potencialmente puede presentarse.

VI.- CONCLUSIONES

El tiempo de contacto no tiene influencia sobre la distancia de penetración del CF, no habiéndose encontrado diferencias significativas para las distancias de penetración obtenidas con los tres tiempos de contactos evaluados.

El tiempo de contacto si tiene influencia sobre la cantidad total permeada del CF, habiéndose encontrado diferencias significativas para las cantidades obtenidas con los tres tiempos de contactos evaluados, ya que al aumentar el tiempo de contacto se incrementa la cantidad total permeada.

La técnica de lavado (intensidad y tiempo) influye en la cantidad permeada y en las distancias de penetración. En este trabajo se constató que un lavado más intenso disminuye notablemente la concentración y distancia de penetración. No obstante, esto debe ser objeto de posteriores estudios.

La técnica de "tape stripping" resulta ser útil para estudiar la penetración "Ex Vivo" no sólo de agentes terapéuticos, sino de sustancias potencialmente tóxicas.

Es importante realizar este tipo de estudios a sustancias como el CF cuyo contacto por periodos de tiempo prolongados o repetidos pueden favorecer su penetración y/o absorción a través de la piel.

VII.- PERSPECTIVAS:

- Evaluar el efecto de aplicaciones repetidas de CF, sobre el grado de penetración y acumulación en piel.
- Realizar el mismo estudio pero con concentraciones diferentes del CF.
- Evaluar la penetración en condiciones de oclusión.
- Evaluar el grado de penetración de principios activos en personas expuestas bajo condiciones reales mediante la técnica de tape stripping.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo brindado por CONACYT (J32593-M) y PAPIIT (IN214000) para la realización de este trabajo. Así mismo, hacemos extensivo nuestro agradecimiento al Ing. Draucin Jiménez por la elaboración de las celdas de perfusión.

VIII.- ANEXOS

Anexo I

Cálculos para la obtención de:

- Pureza del Clorhidrato de Fenazopiridina
- Solubilidad del PA en la Mezcla de Buffer de Fosfatos p H 7.4 y Etanol
- Determinación del Coeficiente de Partición (octanol / buffer de fosfatos pH 7.4) para el Clorhidrato de Fenazopiridina.

- Pureza del Clorhidrato de Fenazopiridina

Conc. H₂SO₄= 0.1 N

Muestra	Cant. Pesada de CF (mcg)	Vol. Gastado de H ₂ SO ₄	Cant. Recuperada de CF (mcg)	Pureza (%)
Blanco	0.01			
A	500.20	28.1	488.93	94.38
B	500.00	27.5	488.62	94.50
C	500.10	27.7	499.66	94.46

Pureza (%) = **94.4478**

- Solubilidad del PA en la Mezcla de Buffer de Fosfatos p H 7.4 y Etanol (50:50).

Curva de Calibración: $y = 0.02484 x + (-0.1238)$

$r^2 = 0.99938$

Diluciones: 1:100, 1:50 para las muestras de pH 7.4

pH	Muestra 1 (Abs)	Muestra 2 (Abs)	Muestra 3 (Abs)	Concentración (mcg/ml)	Desviación Estándar
7.4	0.3626	0.367	0.365	198.85	3.505

- **Determinación del Coeficiente de Partición (etanol vs buffer de fosfatos pH 7.4) para el Clorhidrato de Fenazopiridina.**

Formula:	Valor obt. De la interp. De la curva cal.(Mcg/ml	Cantidad P.A. En Mcg en la soln. Buffer/EtOH	Cantidad de P.A. En Mcg en el vol. total	concent interp en Mg/ml
$y=(abs-b)/m$	7.2723	29.0891	58.1783	14.5446
	7.2460	28.9839	57.9677	14.4919
	7.8146	31.2586	62.5176	15.6293
Mtra. No. 1	Conc.inic.	127	Mg/ml	
Mtra. No. 2	Conc.inic.	127	Mg/ml	
Mtra. No. 3	Conc.inic.	127	Mg/ml	
Mtra. No. 1	conc.octanol	112.4555	Mg/ml	
Mtra. No. 2	conc.octanol	112.5081	Mg/ml	
Mtra. No. 3	conc.octanol	111.3707	Mg/ml	
Mtra. No. 1	Coef.Part.	7.7318		
Mtra. No. 2	Coef.Part.	7.7635		
Mtra. No. 3	Coef.Part.	7.12577		
			Coef.Part. Promedio	7.5403

Valores de la Curvas de Calibración

PENDIENTE	ORD.ORIG.
0.0380	-0.0011

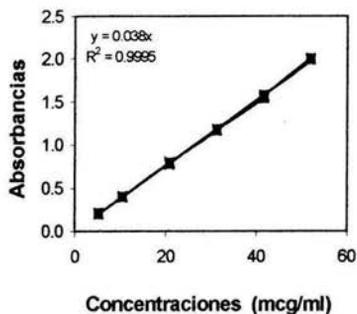
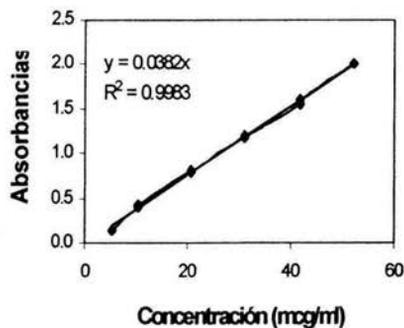
Anexo II

Curvas de Calibración de Clorhidrato de Fenazopiridina:

- **Curvas de Calibración**
- **Prueba de “t” Student para las Pendientes**
- **Comparación Estadística de las Curvas de Calibración Con Piel y Sin Piel.**

- Curvas de Calibración.

CON PIEL				SIN PIEL			
Conc. mcg/ml	Abs.	Abs/Conc.	Parámetros	Parámetros	Conc. mcg/ml	Abs	Abs/Conc
5.2	0.1443	0.0277			5.2	0.2062	0.0397
5.2	0.1414	0.0271	Promedio	promedio	5.2	0.2006	0.0386
5.2	0.1391	0.0268	0.0366	0.0381	5.2	0.2005	0.0386
10.4	0.4123	0.0396			10.4	0.3975	0.0382
10.4	0.4050	0.0389	Desv.std.	Desv.std.	10.4	0.3977	0.0382
10.4	0.4198	0.0404	0.0044	0.0006	10.4	0.4022	0.0387
20.8	0.8018	0.0385			20.8	0.7921	0.0381
20.8	0.7868	0.0378	Coefic.Var.	Coefic.Var.	20.8	0.777	0.0374
20.8	0.7894	0.0380	11.9359	1.5924	20.8	0.7896	0.0380
31.2	1.1913	0.0382			31.2	1.1665	0.0374
31.2	1.1912	0.0382	Pendiente	Pendiente	31.2	1.1776	0.0377
31.2	1.1850	0.0380	0.0390	0.0380	31.2	1.1768	0.0377
41.6	1.5529	0.0373			41.6	1.541	0.0370
41.6	1.5976	0.0384	Ord.Orig.	Ord.Orig.	41.6	1.5628	0.0376
41.6	1.5943	0.0383	-0.0273	-0.0011	41.6	1.5745	0.0378
52	2.0042	0.0385			52	1.9991	0.0384
52	2.0008	0.0385	Coef. Corr.	Coef. Corr.	52	1.993	0.0383
52	2.0027	0.0385	0.9993	0.9997	52	1.9934	0.0383
							3
							3



Prueba de t student para las pendientes

Se planteó la siguiente hipótesis:

Ho: Las pendientes es igual a cero
 Ha: Las pendientes es diferente a cero

Criterio de aceptación:

Si tcal. < tcrítica no se rechaza Ho.
 Si tcal. > tcrítica no se rechaza Ho.

Pendiente	Con Piel	Sin Piel
m1	0.052071	0.037827
m2	0.036567	0.037221
m3	0.038125	0.03725
m4	0.037734	0.037096
m5	0.040478	0.041897
Promedio	0.040995	0.038258
S.D.	0.005682	0.001837

2) Calcular Ey, Ey2 y determinar n, para c/metodo

Ey	0.204974	0.191292
Ey2	0.010277	0.008802
n	5	5

3) Calcular la Varianza de c/método

$$S1/2 = \frac{n1Ey2/1 - (Ey1)^2}{n1(n1-1)}$$

$$S1/2 = \frac{(5)(0.01027715) - (0.2049742)^2}{(5)(5-1)}$$

$$S1/2 = \frac{0.061663 - 0.042014}{20}$$

$$S1/2 = \frac{0.019649}{20} = \boxed{0.000982}$$

$$S2/2 = \frac{n2Ey2/2 - (Ey2)^2}{n2(n2-1)}$$

$$S2/2 = \frac{(5)(0.00880244) - (0.1912916)^2}{(5)(5-1)}$$

$$S2/2 = \frac{0.052815 - 0.036592}{20}$$

$$S2/2 = \frac{0.016222}{20} = \boxed{0.000811}$$

4) Determinar la varianza mayor (S2/2) y la varianza menor (S1/2)

$$S1/2 = 0.000982$$

$$S2/2 = 0.000811$$

5) Determinar F0.025, n2-1, n1-1 y F0.975, n2-1, n1-1:

$$F0.025, 5-1, 5-1 = 0.1$$

$$F0.975, 5-1, 5-1 = 9.6$$

6) Calcular el intervalo de confianza para la razón de las varianzas:

$$\frac{0.000982}{0.000811} \times 0.1 \quad \frac{0.000982}{0.000811} \times 9.6$$

Nota: El intervalo de confianza incluye el valor 1

7) Calcular las medias de y1, y2

$$y1 = \frac{0.204974}{5} = \boxed{0.040995}$$

$$y2 = \frac{0.191292}{5} = \boxed{0.038258}$$

8) Determinar la $t_{0.975, n-1}$ y calcular IC (M1 - M2).

$$t_{0.975, 8} = \underline{\underline{2.306}}$$

$$IC(M1 - M2) = \left(\frac{0.04099484 - 0.03825832}{8} \right) \pm 2.306 \sqrt{\left(\frac{0.04099484 + 4 \times 0.03825832}{8} \right) \left(\frac{1 + 1}{5 + 5} \right)}$$

$$= \frac{0.163979}{8} \pm \frac{0.153033}{8} \times 0.4$$

$$= \frac{0.317013}{8} \times 0.4$$

$$= 0.039627 \times 0.4$$

$$= 0.015851$$

$$= 0.002737 \pm 2.306 \times 0.125699$$

$$= 2.308737 - 2.303263$$

-0.289518	0.290205872
-----------	-------------

Nota: El intervalo de confianza incluye el valor 0

Comparación Estadística

Análisis de Varianza (FENAZOPIRIDINA)

CANT. ADIC (Mcg)	CANT. ADIC (Mcg)	CANT. ADIC (Mcg)	T=
59.4970	74.7136	93.2680	
63.1430	71.9971	100.4338	
55.6130	72.6268	95.4570	
178.253	219.3375	289.1588	686.7493
59.4177	73.1125	96.3863	

$$SSc = \frac{T_{cj}^2}{n} - \frac{T^2}{N} = \frac{31774.1320}{3} + \frac{48108.939}{3} + \frac{83612.812}{3} - \frac{471624.6011}{9}$$

$$SSc = \frac{163495.8825}{3} - \frac{471624.6011}{9} = 54498.6275 - 52402.733 =$$

$$SSc = \underline{2095.8941}$$

$$SSw = X_{ij}^2 - \frac{T_{cj}^2}{n} =$$

$$SSw = 3539.8930 + 3987.0384 + 3092.8058 + 5582.1220 + 5183.5824 + 5274.6521 + 8698.9198 + 10086.9482 + 9112.0388 =$$

$$SSw = 54558.00059 - 54498.62751 = \underline{59.3731}$$

$$SST = X_{ij}^2 - \frac{T^2}{N} = 54558.0006 - 52402.733 = \underline{2155.2671}$$

$$SSw = SST - SSc = 2155.2671 - 2095.8941 = \underline{59.3731}$$

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA					
FUENTE	gl	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	FCAL	FTABLAS
CANTIDAD (columnas)	i-1=(3-1)=2	2095.8941	1047.9470	105.9012	F95.2.6 4.7570
ERROR (filas)	N-j=(9-3)=6	59.3731	9.8955		
TOTAL	N-1=(9-1)=8	2155.2671			

Ho = C1=C2=C3 Que lo que ponemos es igual a lo que obtenemos sin importar que factor afecte

Hi = C1≠C2=C3 Todas son diferentes por lo que si importa el factor tiempo de exposición

A mayor tiempo de exposición mayor absorción

Comparación Estadística

Análisis de Varianza (FENAZOPIRIDINA)

	DIST. AC E C	(Cm)	DIST. AC E C	(Cm)	DIST. AC E C	(Cm)	
40min	0.1136		0.1486		0.0994		
	0.0417		0.1420		0.1792		
	0.0970		0.0849		0.0881		
	0.2523		0.3756		0.3667		
					T= 0.9946		
$SSc = \frac{T_{cj}^2}{n} - \frac{T^2}{N} = \frac{0.0637}{3} + \frac{0.1411}{3} + \frac{0.1345}{3} - \frac{0.9893}{9}$							
$SSc = \frac{0.3392}{3} - \frac{0.9893}{9} = 0.1131 - 0.1099 =$							
$SSc = \underline{0.0032}$							
$SSw = X_{ij}^2 - \frac{T_{cj}^2}{n} =$							
$SSw = 0.0129 + 0.0017 + 0.0094 + 0.0221 + 0.0072 + 0.0321 + 0.0078 = 0.0202 +$							
$SSw = 0.1233 - 0.1131 = \underline{0.0102}$							
$SST = X_{ij}^2 - \frac{T^2}{N} = 0.123 - 0.110 = \underline{0.013}$							
$SSw = SST - SSc = 0.013 - 0.003 = \underline{0.010}$							

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA					
FUENTE	gl	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	FCAL	FTABLAS F95,2,6
CANTIDAD (columnas)	i-1=(3-1)=2	0.0032	0.0016	0.9249	4.7570
ERROR (filas)	N-j=(9-3)=6	0.0102	0.0017		
TOTAL	N-1=(9-1)=8	0.0134			

Ho = C1=C2=C3 Que la distancia es igual en diferente tiempo de exposicion sin importar que factor afecte

Hi = C1≠C2=C3 Todas las distancias son diferentes por lo que si importa el factor tiempo de exposicion

A mayor tiempo de exposición mayor distancia

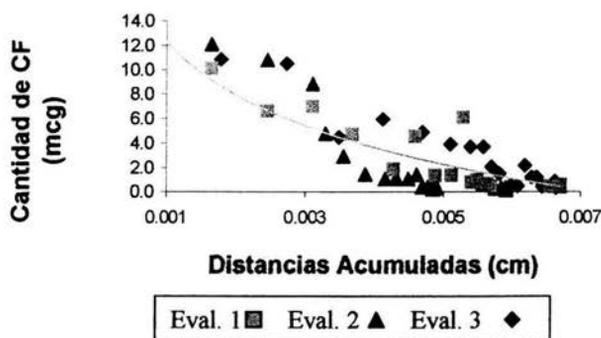
Anexo III

Perfiles de Absorción Obtenidos:

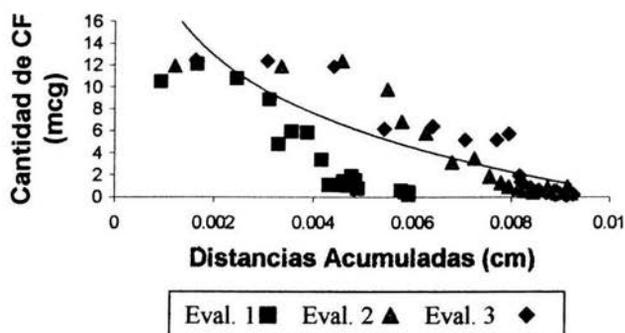
- **Perfiles de Absorción de las Cantidades de CF Contenida en Piel de Cerdo en un tiempo de Exposición de 40 min.**
- **Perfiles de Absorción de las Cantidades de CF Contenida en Piel de Cerdo en un tiempo de Exposición de 100 min.**
- **Perfiles de Absorción de las Cantidades de CF Contenida en Piel de Cerdo en un tiempo de Exposición de 180 min.**
- **Perfiles de Absorción de las Cantidades de CF Contenida en Piel de Cerdo en un tiempo de Exposición de 180 min. para la Prueba de lavado drástico.**

- **Perfiles de Absorción de las Cantidades de CF Contendida en Piel de Cerdo en un tiempo de Exposición de 40 min.**

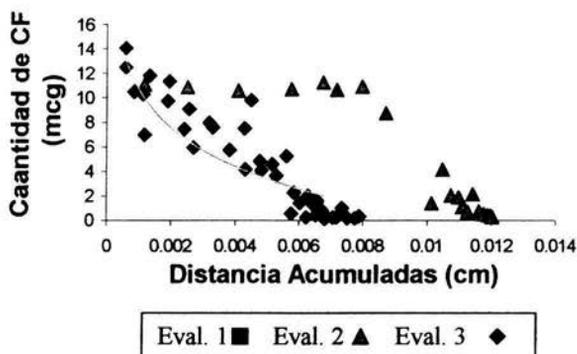
Estos perfiles de absorción nos permite conocer el porcentaje del PA que se puede extraer de la piel después de las permeaciones. Se utilizo el etanol; aunque PA es poco soluble en este disolvente, pero se eligió por no ser tan tóxico como lo es el benceno y el cloroformo.



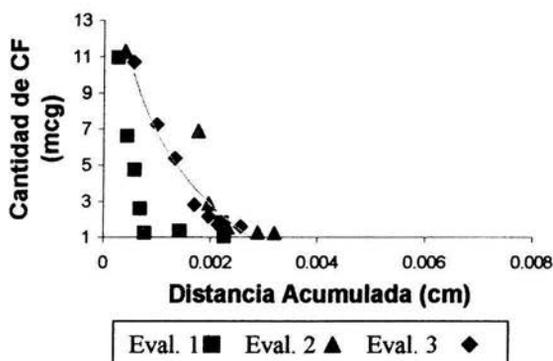
- **Perfiles de Absorción de las Cantidades de CF Contendida en Piel de Cerdo en un tiempo de Exposición de 100 min.**



- **Perfiles de Absorción de las Cantidades de CF Contenida en Piel de Cerdo en un tiempo de Exposición de 180 min.**



- **Perfiles de Absorción de las Cantidades de CF Contenida en Piel de Cerdo en un tiempo de Exposición de 180 min. para la Prueba de lavado drástico.**



IX.- REFERENCIAS:

- Acevedo P.J., Estudio del efecto promotor de azona y 4-deciloazolidin-2-ona sobre la absorción percutánea de tres fármacos con diferentes características de lipofilia, Tesis FES-C, UNAM, pp: 9, México, 1999.
- Aiache J.M., J. PH. Devissaguet.J.Ph. Guyot-Hermann A.M. Biofarmacia, Segunda Edición. Editorial el Manual Moderno, pp: 380-391, México D.F. 1983.
- Aguilar M.L.(MVZ) y colaboradores especialistas, "Manual de Veterinaria". pp: 23-42, UNAM.1993.
- Amado S. (Dr). Lecciones de Dermatología, 9ª Edición, Editorial Francisco Méndez Cervantes. pp: 8-35, México 7, D.F. 1979.
- Andrea C.L. Percutaneous Drug Delivery to the Hair Follicle. In: Topical Absorption of Dermatological Products. pp: 93-100. 2002.
- Auflage. S.V.H., et al.: Haut, Haar und Kosmetik - Eine Chemische Wechselwirkung. Eucerin; Vol. 123, pp: 65-78.1994.
- Auton T.R., Skin stripping and science: a mechanistic interpretation using mathematical modelling of skin deposition as a predictor of total absorption. pp: 558-576. London: IBC Technical Services, 1990.
- Barry B. W. Dermatological Formulations Percutaneous Absorption. In: Drug and Pharmaceutical Sciences, Vol. 18. pp: 395-408. Ed. Dekker. New York, 1983.
- Barry B. W. Lipid Protein partitioning theory of skin penetration enhancement, J. Cont. Rel. 15, pp: 237-248, New York, 1991.
- Barry B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. J. Cont. Rel. 6, pp: 85-97, New York, 1987.
- Bernard Idson. Percutaneous Absorption. J. Pharmaceutical Sciences. pp: 231-250.1975.
- Bieberstein y Zee, "Adaptado de Review of Veterinary Microbiology", Vol.51, pp: 103-123.1992.

- Biberstein, E.I., Yuan, C.Z. Tratado de Microbiología Veterinaria. Editorial Acribia, España. (Provet), Vol. 88, pp: 13-23.1994.
- Bronaugh R.L. and Maibach H.I., Topical Absorption of Dermatological Products, MarcelDekker, Inc., U.S.A. Vol.101, pp: 35-52.1994.
- Buxton R.S., Magee A.I. Structure and interaction s of desmosomal and cadherins. Semin Cell Biol. Vol. 3, pp: 157-167. 1992.
- Clarke E.G.C. Isolation and identification of drugs. The pharmaceutical Press. 2ª Edition. pp: 160-167, 705-706. London, 1986.
- Cristian S., Fabian P., Schwarb and Tatiana T. Drug Concentration in the Skin. In: Topical absorption of Dermatological Products. pp. 233-237. New York. 2002.
- Dawning D.T., Lipid and Protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. J. Lipid Res, Vol. 33, pp: 301-313. 1992.
- Dick I.P., and Scott R.C. Pig ear skin as an in vitro model for human skin permeability. J. Pharma. Pharmacol. Vol. 44, pp: 640-644. 1992.
- Dupuis D., Rougier A. Roguet R., Lotte C. Kalopissis G. In vivo relationship between horny layer reservoir effect and percutaneous absorption in human and rat. Invest Dermatol, Vol. 115, pp: 353-356. 1984.
- Dupuis D., Rougier A. Roguet R., Lotte C. The measurement of the stratum corneum reservoir: a simple method to predict the influence of the vehicles on in vivo percutaneous absorption. Br J Dermatol, vol. 115, pp: 233-238.1986.
- Escalona E. Dermatología, Segunda Edición, Editorial Impresiones Modernas. pp: 32-64. México 1989.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Sesta Edición, 2001.
- Feldmann R.J., Maibach H. I. Percutaneous penetration of steroids in man. J. Invest Dermatol, Vol. 109. pp: 58-59. 1969.
- Feldmann R.J., Maibach H. I. Absorption of some organic compounds through the skin in man. J Invest Dermatol, Vol. 54. pp: 399-404. 1970.

- Feldmann R.J., Maibach H. I. Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man. *Toxicol Appl Pharmacol*, Vol. 28. pp: 126-132. 1974a.
- Feldmann R.J., Maibach H. I. Percutaneous penetration of hydrocortisone with urea. *Arch Dermatol*, Vol. 109. pp: 58-59. 1974b.
- Fischer G.V.S., Govi-Verlag Frankfurt · Schreiner, v., Maerker, u., Hoppe: Dependence of barrier repair in human skin on intra- and extracellular ph (poster). gordon conference, New York City. Eucerin, pp: 128-133.1995.
- Fischer R.G., Tyler M. Severe contact dermatitis due to nitroglycerin patches. *South Med J* pp: 28-61.1985.
- Fishbein M., (M.D.), "Enciclopedia de la medicina y salud". pp:56-75. Ediciones New York 1995.
- Friberg S.E., Kayali I., Rhein L.D., Simon F.A., Cagan R.H. The importance of lipids for water uptake in stratum corneum. *Int. J. Cosmet Sci.* Vol. 12, pp: 5-12. 1990.
- Hadgraft J. And Walter K.A. Skin Penetration enhancement. In: Boer A.G. Ed. *Drug Absortion Enhancement*. Harwood. pp: 177-198, Switzerland, 1994.
- Haftek M, Hansen M.U., Kaiser H.W, Krysel H.W., Schmitt D. Interkeratinocyte adherens junctions: immunocytochemical visualization of cell-cell junctional structures, distinct from desmosomes, in human epidermis. *J. Invest Dermatol*, Vol. 106, pp: 498-504. 1996.
- Ham A.W., M.B. *Histology*. Sexta Edición J.B. Lippincott Company, Philadelphia. (Provet), pp: 123-140.1969.
- Hirzel V.S.M, et al.: Extracellular pH Controls Barrier Repair. pp: 52-66. Eucerin, 1995.
- Hurkmans J.F.G.M, Bodle He, Van Driel LMJ, Van Doorne H, Junginger He. skin irritation caused by transdermal drug delivery systems during long-term (5 days) Application. *BR J Dermatol*, Vol.111, pp: 15-21.1985.
- Jacop S.W. *Anatomia y fisiologia humana*. Ed. Interamericana. 4ª edición. pp: 78-83. México, 1982.

- Kaiser H.W.,z Ness W., Offers M., O'Keefe E.J., Kreysel H.W., Talin: adherens junction proteín is localized at epidermal-dermal interfase in skin. *J. Invest Dermatol*, Vol. 101, pp: 789-793, 1993.
- Kitagawa S., Yokochi N and Murooka N. pH Dependence of Phase Transition of the Lipid bilayer of liposomes of Stratum Corneum Lipids. *Int. J. Pharm.* Vol. 126, pp: 49-56, 1995.
- Lehninger A.L. Nelson D.L. Cox M.M., *Principles of Biochemistry*. Ed. Worth Publishers, 2a edition. pp: 242, 254, 272, 284. USA. 1993.
- Loth H. Percutaneous absorption and conventional penetration. en: enhancers o, Braun-F.H.C., Korting HI. *Maibach Liposome Dermatics*. New York: Springer-Verlag; pp: 80-112. 1992.
- Lücker P.W., et al., Retention time and concentration in human skin bifonazole and clotrimazole. *Dermatologica*, Vol. 169, pp: 51-56.1984.
- Magnusson, B.M. Walters, K.A., Roberts, M.S. *Veterinary Drug Delivery: Potential for skin penetration enhancement*. *Adv. drug delivery rew.* (Provet).pp: 75-89. 2001.
- Madison K.C., Hozward E.J., Ceramides are transported through de Golgi apparatus in human keratinocytes in vitro. *J. Invest Dermatol*, Vol. 106, pp: 1030-1035. 1996.
- Malkinson F.D. and Ferguson E.H. Percutaneous absorption of hydrocortisone-4-Cl-4 in two human subjets. *J. Invest Dermatol*, Vol. 25, pp. 281-285, 1990.
- Mario R.P.(Dr.), "Anatomía, fisiología e higiene". 8ª Edición. Edit. Progreso, S.A.pp: 75-88. 1990.
- Marjukka S.T. et al, Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J. Cont. Rel.*59, pp: 149-161. 1999.
- Mealey, K. Systemic absorption of topically administered drugs. *compendium on continuing education for the practicing veterinarian*. volumen 22, pp: 7, (Provet) julio. 2000.
- Merck Manual de Veterinaria. Quinta Edición, Océano Grupo Editorial, Barcelona- España. (Provet), pp: 115-123. 2000.

- Meyer, J., Grundmann, H., Knabenhans, S. Properties of acid phosphatase in human stratum corneum. *Eucerin J Invest Dermatol* Vol. 104: pp: 687-97. 1990.
- Michael S., Roberts and Kenneth A. Walter. The relationship Between Structure and Barrier Function of Skin. In: *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. Vol. 91, pp: 1-32. 1998.
- Mikhail M. et al. Modeling of percutaneous drug transport in vivo using skin imitating Carbosil membrane. *J. Controlled Release*. pp: 123-132. 1998.
- Molen R.G. Tape stripping of human stratum corneum yields cell layers that originate various depths because of furrows in the skin, *Arch Dermatol*, pp: 45-56.1997.
- Moncial I.Q., *Cosmética Dermatológica Práctica*, 5ª Edición. Editorial el Ateneo. Buenos Aires, República de Argentina, pp: 49-62.1987.
- Munro D.D. the relation ship between percutaneous absorption and stratum corneum retention. *Br. J. Dermatol*, vol. 81, pp. 92-97. 1990.
- Naik A. and Guy R.H. Infrared Spectroscopic and Differential Scanning Calorimetric Investigations of Stratum Corneum Barrier Function. In: Potts, R.O. and Guy R.H. *Mechanisms of Transdermal Drug Delivery*. Ed. Dekker. Vol. 83. pp: 87-92. USA, 1997.
- Ortiz, H y I. Rodríguez. 3er Seminario Nacional e Internacional de Dermatología Canina. (Provet), pp: 12-45.1999.
- Osborne D.W. and Friberg, S.E. *Dermatológica Role of stratum corneum lipids as moisture retaining agent*. Vol. 180:pp: 24-29. *Eucerin*, 1987.
- Pellett M.A., MS Roberts, J. Hadgratt "Super saturated solutions evaluated with and in vitro stratum corneum tape a tripping technique *International Journal of Pharmaceutics*, pp: 112-118.1997.
- Pershing L.K., et al., Feasibility of measuring the bioavailability of topical betamethasone dipropionate in commercial formulations using drug content in skin and a skin blanching bioassay. Vol. 9 pp:45-51 1992a.

- Pershing L.K., New approaches to assess topical corticosteroid bioequivalence: Pharmacokinetic evaluation. *Int J. Dermatol Suppl*, pp: 16. 1992b.
- Pershing L.K., et.al., Topical betamethasone dipropionate: pharmacokinetic and pharmacodynamic dose-response studies in humans *Arch Dermatol*, vol. 130. pp. 740-747.1994.
- Prota G. Melanins and melanogenesis. *Cosmet Toiletries*. Vol. 111, pp: 43-51. 1996.
- Raab, W., K., and J. Disp. S.C a Tech: *Pflegekosmetik -In Leitfaden. Eucerin*, Vol. 8 (2): pp:173-179.1991.
- Remington. *Farmacia* , 7ª Edición . Tomo I, Ed. Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina, pp: 233-240.1995.
- Remington's, *Pharmaceutical Sciences*. 18 Ed. Easton: Mack; pp: 203-215.1990.
- Rietschel R.L. and Spencer T.S. Skin permeation: In vitro Techniques. In: *Methods for cutaneous investigation*. Ed. Dekker. Vol. 9, pp: 171-183. USA, 1990.
- Roberts L.B. Current Issues in the In Vitro Measurement of Percutaneous Absorption. In: *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. Vol. 91, pp: 155-159. 1998.
- Robert L.B., Harolyn L.H., Margaret E.K. K. And Jeffrey J.Y. Determination of Percutaneous Absorption by In Vitro Techniques. In: *Topical Absorption of Dermatological Products*. pp: 157-160. New York. 2002.
- Robert L.B., Harolyn L.H., Margaret E.K. K. And Jeffrey J.Y. Systemic Absorption Cutaneous Material. In: *Topical Absorption of Dermatological Products*. pp: 163-167. New York. 2002
- Ronal C. Wester and Howard I. Maibach. Regional Variation in Percutaneous Absorption. In: *Topical Absorption of Dermatological Products*. pp: 33-41, New York. 2002.

- Ronal C. Wester and Howard I. Maibach In Vivo Methods for Percutaneous Absorption Measurement. In: Topical Absorption of Dermatological Products. pp: 149, New York. 2002.
- Rougier A., Lotte C, Dupuis D. An original predictive method for in vivo percutaneous absorption studies. J. Soc. Cosmet Chem. Vol. 38, 397-417. 1987a.
- Rougier A., Lotte C, Maibach H.I. The hairless rat: a relevant animal model to predict in vivo percutaneous absorption in humans. J. Invest Dermatol Vol. 88, pp: 577-581.1987b.
- Rougier A., Rallis M., Krien P., Lotte C. In Vivo percutaneous absorption: a key role for stratum corneum/vehicle partitioning. Arch Dermatol, Vol. 52, pp: 89-94. 1990.
- Scott. R.C., Prediction of Percutaneous Penetration. London: IBC Technical Services, pp: 59-89.1990.
- Shah V.P., The stripping technique to assess bioequivalence of topical applied formulations. In: Brain K.R., et al., Prediction of Percutaneous Penetration, London: IBC Technical Services, pp. 167-171.1990.
- Shah V.P., Bioequivalence of topical dermatological dosage forms- methods of evaluation of bioequivalence. Vol. 4. pp. 588-592. 1998.
- Sharon A.M.H. Dermal Metabolismo. In: Dermal Absorption and Toxicity Assessment. Vol. 91, pp: 84-86 1998.
- Smith E.W. and Maibach H.F. Percutaneous Penetration Enhancers. CRC Press. USA. pp: 2-14 1995.
- Surber C., D-squame adhesive tapes for standardized stratum corneum stripping. In: Brain K.R., Prediction of Percutaneous Penetration, London: STS Publishing, pp: 21-40.1993.
- Susan B., Maryadele J.O. Merck Index the Drug, an Encyclopedia of Chemicals, Drug and Biologicals. 20^a Ed. pp:1242. 1997.
- Taro O, Masahiro I, Paku T. Effect of various enhancers on transdermal penetration of indomethacin and urea, and relationship between penetration parameters and enhancement factors. J Pharm SCI, pp: 98-115.1995.

- Teunissen M.B.M. Dynamic nature and function of epidermal Langerhans cell in vivo and in vitro: areview, with emphasis on human Langerhans cell. *Histochem J.* Vol. 24, pp: 967-716. 1992.
- Touitou E. et al. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *J. Controlled Release.* pp: 159-166. 1998.
- Tumer N.G. and Nonato L.B. Visualization of Stratum Corneum and Transdermal Permeation Phatways. In: Potts R.O. and Guy R.H. *Mechanisms of Transdermal Drug Delivery.* Ed. Dekker. Vol. 83, pp: 34-35. USA, 1997.
- Vickers C.F.H.. Existence of reservoir in the stratum corneum. *Arch Dermatol,* vol. 88, pp: 20-23. 1990.
- Von H.H.M. and Brockmeier D. Drug concentration control and pharmacokinetic analysis during long term therapy with desk top computers In: Gladtk E, Heimann G. eds. *Pharmacokinetics: A 25-year-old Discipline.* Stuttgart. pp: 165-179. New York: Fischer, 1980.
- Wilkinson J.B. and More R.J. *Cosmetología de Harry.* Ed. Díaz de Santos, pp: 5-18. México, 1990.
- Wintrobe M.M., et al, *Harrison's Principles of Internal Medicine,* 7a Edition, McGram Hill, New York.pp: 1023-1028. 1974.
- Yie W.C.R.. Developmental concepts and practice in transdermal therapeutic systems. *Transdermal controlled systemic medication.* Swarbrick J, Ed. Marcel Dekker. Vol 31, pp: 45-56. New York. 1987.

Páginas de Internet:

- **Bago** uromicinovo fenazopiridina sulfametoxazol trimetoprima aparato genitourinario : antiinfecciosos de acción local antiinflamatorios, 2003.
- Enciclopedia **Encarta** Microsoft, 2003.
- **Eucerín**. Fritsch, P.: Dermatologie. 1990.
- **Geocities**. 2003.
- **Parkedavis** pyridium fenazopiridina Aparato Genitourinario; antiinfecciosos de acción local antiinflamatorios, 2003.
- **Portal Veterinaria**, 2003.
- **Sanofi-Synthelabo de México**, Antiinfecciosos de uso sistémico: antibióticos: sulfonamidas y asociaciones aparato genitourinario: antiespasmódicos urinarios denominación distintiva pirimir® denominación genérica fenazopiridina forma farmacéutica y formulación nombre, 2003.
- **Técnofarma** nordox fenazopiridina Farmacias humada, 2003.