



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

***ESTUDIO DE LA PENETRACIÓN A TRAVÉS DE LA PIEL DE
NAPROXENO SÓDICO UTILIZANDO AGENTES PROMOTORES DE
PENETRACIÓN (AZONA® Y TRANSCUTOL®), Y DE DIGLUCONATO
DE CLORHEXIDINA MEDIANTE IONTOFORESIS***

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. JOSÉ JUAN ESCOBAR CHÁVEZ



TUTOR: DRA. ADRIANA GANEM RONDERO AÑO: 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Con muchísimo amor y agradecimiento: A Dios, mis padres Sofía y Agustín, mis adorados hermanos Angeles y Agustín y queridísimos sobrinos Rodrigo y Diego Alfonso.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy en especial a mi tutora Dra. F. Adriana Ganem Rondero y al Dr. David Quintanar Guerrero por todo el apoyo que siempre recibí y porque creyeron en mi persona y en mi trabajo. Infinitas gracias.

Gracias también a todos y cada uno de los integrantes de mi honorable jurado y de mi comité tutelar por sus valiosas aportaciones, así como a mis muy queridos amigos Karina Pacheco, Juan Manuel Tapia, Mercedes Sánchez, Dalia Bonilla, Angelica Villegas, Teresa Martínez, Miriam López, Zaida Urbán, José Carlos Rodríguez y Rocio Rivera ha sido un verdadero placer los momentos que hemos compartido juntos.

Agradezco también el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca a crédito que se me otorgo.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. José Manuel Saniger Blesa
Primer Vocal:	Dra. María Josefa Bernad Bernad
Segundo Vocal:	Dr. Enrique Ramón Angeles Anguiano
Tercer Vocal:	Dra. Luz María Melgoza Contreras
Secretario:	Dra. Helgi Jung Cook
Primer Suplente:	Dra. Susana Patricia Miranda Castro
Segundo Suplente:	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Tutor:	Dra. F. Adriana Ganem Rondero
Sustentante:	Q.F.B. José Juan Escobar Chávez

**Sitio donde se desarrollo el tema: Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán, UNAM.**

ÍNDICE

Índice general	V
Índice de figuras	VIII
Índice de tablas	X
Lista de abreviaturas	XI
Abstract	XII
Resumen	XIII
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
2.1 La Piel	3
2.2 Actividad enzimática	6
2.3 Inmunología	6
2.4 Propiedades eléctricas	7
2.5 Absorción percutánea	8
2.6 Bases teóricas	9
2.7 Mecanismos para incrementar la absorción percutánea:	10
2.7.1 Promotores químicos de penetración	10
2.7.1.1 Azona [®]	12
2.7.1.2 Transcutol [®]	18
2.7.2 Mecanismos físicos para favorecer la penetración de activos a través de la piel	22
2.7.3 Combinación de agentes promotores de la penetración e iontoforesis	23
2.8 Poloxamer 407 (Pluronic F-127 [®])	24
2.8.1 Clasificación de geles	24
2.8.2 Características y propiedades del PF-127	25
2.8.3 Aplicaciones del PF-127 en formulaciones farmacéuticas	28
2.9 Métodos para cuantificar fármacos a través de la piel	35
2.9.1 Métodos <i>in vivo</i>	35
2.9.2 Métodos <i>in vitro</i>	37
III. Justificación e Hipótesis	40
IV. Objetivos	42
V. Parte experimental	43
5.1 Materiales	43
5.1.1 Reactivos	43
5.1.2 Material	43
5.1.3 Equipos	44
5.1.4 Material biológico	44
5.2 Formulaciones evaluadas	45
5.2.1 Naproxeno sódico en geles de PF-127 con agentes	46

promotores de penetración (azona [®] y transcutol [®])	
5.2.2 Digluconato de clorhexidina usando iontoforesis	46
5.3 Métodos	47
Uso de promotores de penetración (azona [®] y transcutol [®])	
5.3.1 Métodos analíticos usados	47
5.3.2 Estudios de viscosidad	48
5.3.3 Estudios de penetración <i>in vivo</i>	49
5.3.4 Pérdida de agua transepidermal (TEWL)	49
5.3.5 Espectroscopía de infrarrojo por TF/RTA	50
Uso de iontoforesis	
5.3.6 Estudios microbiológicos	51
5.3.7 Estudios de permeación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	51
5.3.8 Estudios de repoblación de microorganismos en las zonas a las que se les aplicaron las formulaciones de digluconato de clorhexidina	52
VI. Resultados y Discusión	53
6.1 Naproxeno sódico en geles de PF-127 con agentes promotores de penetración (azona [®] y transcutol [®])	53
6.1.1 Viscosidad de las formulaciones de naproxeno sódico	53
6.1.2 Estudios de penetración (Perfiles de concentración de naproxeno sódico vs profundidad de estrato córneo <i>in vivo</i>).	54
6.1.3 Determinaciones de TEWL	56
6.1.4 Infrarrojos TF/RTA	58
6.2 Digluconato de clorhexidina usando iontoforesis	61
6.2.1 Estudios de penetración <i>in vitro</i>	61
6.2.2 Estudios de penetración <i>in vivo</i>	62
6.2.3 Estudios microbiológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	64
VII. Conclusiones	69
VIII. Perspectivas	70
IX. Referencias	71
X. Anexos	87
10.1 Monografías de los fármacos evaluados	87
10.1.1 Naproxeno sódico	87
10.1.2 Digluconato de clorhexidina	87
10.2 Análisis estadístico	89
10.2.1 Estudios de penetración de naproxeno sódico	89
10.2.2 TEWL	94
10.2.3 Infrarrojo TF/RTA	97
10.2.4 Estudios de penetración de digluconato de clorhexidina	103
10.2.5 Estudios microbiológicos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las capas de la piel	4
Figura 2. Modelo de “cemento y ladrillos” de la piel	7
Figura 3. Estructura química de la azona [®] (Laurocapram)	13
Figura 4. Estructura química del transcuto [®] (Carbitol)	18
Figura 5. Dispositivo iontoforético	23
Figura 6. Rearreglo micelar del pluronic F-127 al incrementarse la temperatura (fenómeno de gelación térmica reversa).	26
Figura 7. Arquitecturas de copolímeros	27
Figura 8. Pluronic F-127	28
Figura 9. Técnica del “ <i>tape stripping</i> ”	38
Figura 10. Foresor Iomed [®] , y electrodos TransQE [®]	45
Figura 11. Viscosímetro digital Brookfield CAP 2000	48
Figura 12. Tewameter Courage-Khazaka TM 210 [®] .	49
Figura 13. Espectro de infrarrojo característico del estrato córneo	50
Figura 14. Resultados de las medidas de viscosidad del gel PF-127 (27% p/v), Formulación I, II y III, y efecto de los componentes (transcuto [®] 24.8 %, y azona [®] 1.7 %/transcuto [®] 24.8 %) sobre la viscosidad del gel PF-127	54
Figura 15. Perfiles de penetración a través de estrato córneo humano de naproxeno sódico formulado en geles de PF-127 aplicando: Una dosis infinita (Formulación II, Formulación III) y una capa (Formulación II, Formulación III)	55
Figura 16. Distancia de penetración y cantidad total recuperada de naproxeno sódico en estrato corneo humano para las formulaciones II y III con una dosis infinita y aplicando una capa en la piel	56
Figura 17. Valores de TEWL obtenidos después de aplicar naproxeno sódico formulado en geles de PF-127: Control, Formulación II y Formulación III	57
Figura 18. Valores absolutos de TEWL (cada valor de la formulación menos el control) después de aplicar naproxeno sódico formulado en geles de PF-127. Formulación II y Formulación III	57
Figura 19. Espectros de infrarrojo de EC humano de 3 voluntarios después de haber aplicado las formulaciones II y III	59
Figura 20. Cambios absolutos de frecuencia de las vibraciones de estiramiento simétrica y asimétrica de las cadenas alquílicas de los lípidos de estrato corneo después de la aplicación de las formulaciones	60
Figura 21. Cambios de número de onda para las vibraciones simétricas (2850cm^{-1}) de las cadenas alquílicas de los lípidos del EC	60
Figura 22. Cambios de número de onda para las vibraciones asimétricas a (2920cm^{-1}) de las cadenas alquílicas de los lípidos del EC.	60
Figura 23. Perfiles de penetración a través de piel de oreja de cerdo de soluciones acuosas de digluconato de clorhexidina (0.1%, y 1%) y de una solución de hibitane [®] en etanol al 70% por difusión pasiva e iontoforesis	61
Figura 24. Cantidad total permeada de DGC a través de piel de oreja de cerdo para soluciones de DGC (0.1 y 1%) y la solución de hibitane [®] al 0.5% en	62

etanol al 70% por difusión pasiva e iontoforesis	
Figura 25. Perfiles de concentración para la solución de hibitane [®] al 0.5% en etanol al 70 % etanol por difusión pasiva e iontoforesis, y una solución acuosa de DGC 0.5% aplicada por iontoforesis a través de estrato corneo humano.	63
Figura 26. Cantidad total de DGC permeada a través de estrato córneo humano para la solución acuosa de DGC al 0.5% y de la solución de hibitane [®] al 0.5% en etanol al 70% por Difusión pasiva e iontoforesis	64
Figura 27. Estructura química del digluconato de clorhexidina	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de agentes promotores de la penetración percutánea y mecanismos de acción	12
Cuadro 2. Mecanismos de acción propuestos para la azona [®]	14
Cuadro 3. Formulaciones tópicas desarrolladas con azona [®]	14
Cuadro 4. Mecanismos de acción propuestos para transcuto [®]	19
Cuadro 5. Formulaciones tópicas desarrolladas con transcuto [®]	19
Cuadro 6. Clasificación general de geles y descripción	24
Cuadro 7. Formulaciones con pluronic F-127 (PF-127) en el área farmacéutica	28
Cuadro 8. Información a considerar para evaluar la penetración percutánea <i>in vitro</i>	38
Cuadro 9. Composición de las formulaciones de naproxeno sódico en PF-127 y promotores de penetración evaluados en el estudio (azona [®] y azona [®] /transcuto [®])	46
Cuadro 10. Soluciones de DGC evaluadas <i>in vitro</i> por difusión pasiva e iontoforesis	47
Cuadro 11. Soluciones de DGC evaluadas <i>in vivo</i> por difusión pasiva e iontoforesis	47
Cuadro 12. Media de las UFC obtenidas para los experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> cuando soluciones de DGC (0.1, 1 y 0.5%) y de hibitane [®] al 0.5% en etanol al 70% se aplicaron en la piel por difusión pasiva	67
Cuadro 13. Media de las UFC obtenidas para los experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> cuando soluciones de DGC (0.1, 1 y 0.5%) y de hibitane [®] al 0.5% en etanol al 70% fueron aplicados en la piel mediante iontoforesis a 0.2 mA/cm ² durante 10 minutos.	68

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
EC	Estrato córneo
PF-127	Pluronic F-127
HPTLC	Cromatografía de capa fina de alta resolución
IRTF/RTA	Espectroscopia de Infrarrojo con transformadas de Fourier y reflectancia total atenuada
TEWL	Pérdida de agua transepidermal
IR	Infrarrojo
EE	Estrato espinoso
EG	Estrato germinativo
EL	Estrato lúcido
APP	Agentes promotores de la penetración
DMSO	Dimetil sulfóxido
PG	Propilenglicol
PEG	Polietilenglicol
FCE	Factor de crecimiento epidermal
AAL	Ácido amino levulínico
TT	Toxoide tetánico
CD	Ciclodextrina
AUC	Área bajo la curva
ATC	Acetónido de triamcinolona
MIP	Miristato de isopropilo
SEs	Sucroésteres
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ISACi	Infecciones sanguíneas asociadas al uso de catéteres intravasculares
UFC	Unidades formadoras de colonias
DGC	Digluconato de clorhexidina
CIV	Catéteres intravasculares
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
DP	Difusión pasiva
ANOVA	Análisis de varianza
mA	miliAmper

ABSTRACT

This work is divided in two parts. The objective of the first part of this study was to determine the penetration of sodium naproxen, formulated in pluronic F-127 (PF-127) gels containing azone[®] and transcutof[®] as penetration enhancers, through human skin *in vivo*. It was found that the combination of azone[®] and transcutof[®] in PF-127 gels enhanced sodium naproxen penetration, with enhancement ratios of up to two-fold compared with the formulation containing only transcutof[®]. These results were confirmed by TEWL and ATR-FTIR spectroscopy, suggesting a synergic action for azone[®] and transcutof[®]. Due to the thermo-reversible behavior of pluronic gels, the influence of the components added to the gel formulations on viscosity, as a function of temperature, was also studied.

The second part of this study is related to the importance of an efficacious skin antiseptis prior to invasive procedures such as an intravascular catheter insertion. The purpose was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* efficacy of an antiseptic product (chlorhexidine digluconate, CDG), comparing a passive vs. an iontophoretic application. Two aspects were analyzed: *i*) *Eradication* of the microflora underlying the stratum corneum; *ii*) Penetration capability of CDG across the stratum corneum.

The antiseptic efficacy of topically applied CDG was examined *in vitro* (porcine ear skin) and *in vivo* (midventral forearm surface), using the detergent scrub technique. CDG aqueous solutions (0.1, 0.5 or 1 %) were compared with a solution of hibitane⁷ (0.5% in 70% ethanol).

The results showed that CDG permeates far better with iontophoresis than by passive diffusion, offering a better alternative for skin disinfection.

RESUMEN

La principal barrera de permeación está constituida por los lípidos intercelulares del estrato corneo (EC), por lo que ingredientes activos de naturaleza hidrofílica van a presentar una pobre penetración. Sin embargo la permeación de este tipo de ingredientes, así como la de otros de tipo lipofílico, se ha mejorado gracias al surgimiento de nuevas tecnologías tales como el uso de la iontoforesis (que consiste en aplicar corriente eléctrica fisiológicamente tolerable para favorecer el paso de activos a través de la piel) y al uso de promotores de absorción. El término promotores de absorción ha sido generalmente aplicado a aquellas sustancias químicas que incrementan la partición y difusión de agentes activos hacia y a través de la barrera de permeabilidad.

Cada vez es mayor la necesidad de utilizar diferentes mecanismos de penetración de activos en medicamentos tópicos y transdérmicos, ya sea por medios físicos (iontoforesis) o químicos (agentes promotores de penetración), dado que sin la ayuda de éstos, sería casi imposible el paso de la mayoría de fármacos a través de nuestra piel.

La presente disertación se divide en dos grandes secciones, la primera dedicada al estudio de los medios químicos de promoción, empleando *naproxeno sódico* como principio activo; y la segunda al uso de la iontoforesis para promover la penetración de *digluconato de clorhexidina* (DGC). A continuación se describe brevemente lo realizado en cada una de ellas.

Se evaluó la penetración *in vivo* de dos formulaciones de *naproxeno sódico* preparado en geles de Pluronic F-127 (PF-127); uno de ellos conteniendo *transcutol*[®] y el otro una combinación de *azona*[®]/*transcutol*[®] como promotores de penetración. Dicho gel tiene la peculiaridad de que soluciones de PF-127 con concentraciones mayores al 20% p/v se transforman de soluciones transparentes de baja viscosidad a geles a la temperatura corporal. El grado de penetración *in vivo* del *naproxeno sódico* se evaluó mediante la técnica del “*tape stripping*”. La cuantificación del principio activo se realizó mediante cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC), encontrándose que la formulación que contiene la mezcla de promotores *azona*[®]/*transcutol*[®] es la que favorece en mayor grado la penetración de *naproxeno sódico* a través de la piel.

El efecto de las formulaciones sobre la barrera de permeabilidad de la piel se evaluó mediante estudios de infrarrojo con transformadas de Fourier y reflectancia total atenuada (FTIR/ATR) y determinaciones de pérdida de agua transepidermal (TEWL).

Por otro lado, se evaluó la penetración *in vitro* e *in vivo* de *digluconato de clorhexidina* (DGC) en orejas de cerdo y en EC humano, respectivamente. En ambos casos el DGC se administró por difusión pasiva e iontoforesis en voluntarios sanos y en piel de orejas de cerdo aplicando corriente eléctrica fisiológicamente aceptable en la piel para favorecer su paso a través de la misma, demostrándose que el uso de la iontoforesis favorece la penetración del DGC a capas profundas del EC y genera una mejor desinfección de la piel. Mediante la técnica del “*tape stripping*” se demostró la presencia de microorganismos presentes en capas profundas del EC, que potencialmente pueden generar infecciones asociadas al uso de catéteres intravasculares, lo cual se ha convertido en un serio problema de salud pública asociado con altos índices de mortalidad y morbilidad en todo el mundo, de ahí la importancia de realizar investigación en este sentido.

I. INTRODUCCIÓN

Siempre que se aplica alguna sustancia sobre la piel (la cual cubre una superficie de 1.8 a 2 m² en promedio en un hombre adulto y que además es irrigada por un tercio de la circulación sanguínea), ya sea con fines cosméticos o farmacológicos, la primera barrera de permeación que encuentra es el estrato córneo (EC), que forma parte de la epidermis y que a pesar de ser la capa más delgada de la piel, ofrece la mayor resistencia al transporte de sustancias.

De ahí, que el principal problema con la administración en forma tópica o transdérmica, es la barrera formada por la matriz de lípidos intercelulares que constituyen al EC. De tal manera que muchos esfuerzos han sido llevados a cabo para mejorar el desarrollo de sistemas de liberación transdérmica con la finalidad de modificar la barrera de permeabilidad de manera local y temporal.

Se ha planteado que el éxito de todo sistema terapéutico transdérmico depende de la capacidad de la sustancia para difundirse a través de la piel en cantidades suficientes y 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 polímero y del tamaño molecular del principio activo, 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 de 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. Dos de las formas que han sido estudiadas con mayor rigor es la del uso de *agentes promotores de penetración* (APP), que son sustancias químicas capaces de disminuir la resistencia difusional que ofrece la piel, y el uso de un mecanismo de tipo físico de penetración en el que se aplica corriente eléctrica fisiológicamente tolerable a la piel para incrementar la penetración de activos a través de la piel llamado *iontoforesis*. Estas son opciones importantes para aquellas sustancias con dificultad para atravesar el EC.

En el presente estudio se evaluó el uso del mecanismo de tipo químico (usando los promotores de penetración: *transcutol*[®] y *azona*[®]) para favorecer la penetración de naproxeno sódico formulado en geles de PF-127 a través de la piel *in vivo*; así como de un mecanismo físico, la administración *in vitro* e *in vivo del* digluconato de clorhexidina (DGC) mediante iontoforesis.

En esta tesis doctoral, en primera instancia se presenta una sección de antecedentes en el que se ofrece un panorama general de la fisiología de la piel. Posteriormente, como este trabajo está enfocado a la vía tópica, se incluye todo un apartado de cómo se da la absorción percutánea mediante el uso de mecanismos de tipo químico y físico. Se incluye, así también una sección de los usos del PF-127 en el área farmacéutica, dado que en este estudio se formuló al naproxeno sódico en geles de PF-127 y promotores de absorción y, por último, sin menor importancia que las anteriores, una sección de los métodos más comúnmente utilizados para cuantificar fármacos en piel, destacando que para este estudio, se empleó la técnica del *"tape stripping"* para determinar la cantidad de naproxeno sódico y digluconato de clorhexidina (DGC) que penetraron a capas profundas del EC. Después de los antecedentes, se

encuentra la justificación, objetivos, parte experimental y resultados, estas dos últimas divididas en dos secciones importantes: i) Uso de promotores de penetración (azona[®] y transcutol[®]) para el caso del naproxeno sódico, para lo cual se incluyen los estudios de penetración en voluntarios sanos, medidas de pérdida de agua transepidermal (TEWL) e infrarrojos de la piel, ii) Uso de iontoforesis para la administración de DGC comparada con la difusión pasiva de la misma a través de la piel, en el que se muestran los estudios de penetración *in vitro* (piel de oreja de cerdo) e *in vivo* (EC humano) y estudios microbiológicos *in vitro* e *in vivo*. Por último, se presentan las conclusiones y las perspectivas en cada caso. Se incluye también una sección de anexos en el que se muestran las pruebas estadísticas realizadas a los resultados obtenidos durante todo el desarrollo del proyecto.

II. ANTECEDENTES

2.1 LA PIEL

La piel cubre una superficie aproximada de 2m^2 en promedio en un hombre adulto (Forslind, 1994) y está formada de tres capas principales de funciones y estructuras diferentes. Del exterior al interior del organismo, encontramos a la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo o hipodermis (Fig.1).

Epidermis

La epidermis está constituida por dos capas: el EC o también llamada epidermis no viable, y la epidermis viable formada por el estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato germinativo.

Estrato córneo (Epidermis no viable)

Dentro de toda la gama de biomembranas de mamíferos, la composición y estructura del estrato córneo (EC) se considera única. Esta delgada membrana ($10\text{-}100\mu\text{m}$ de espesor) está compuesta de células completamente queratinizadas, embebidas en una matriz lipídica ordenada y continua (Elias, 1991).

El EC se reconoce como la primera barrera al paso de compuestos ionizados (Potts *et al.*, 1990, 1991), de esta manera fármacos que son altamente polares o cargados al pH de la fase aplicada son frecuentemente incapaces de penetrar a través de la piel en cantidades terapéuticas. Los apéndices de la piel (folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas) pueden ser responsables de comportarse como rutas de acceso (Barry, 1983), sin embargo:

- a) el área superficial total ocupada por los poros de estos órganos es muy pequeña;
- b) el material lipofílico descargado de algunos de estos apéndices puede, impedir el fácil acceso a estos órganos (Selwyn *et al.*, 1972).

El EC o capa córnea está constituida de células muertas queratinizadas, los corneocitos. Estas células son ricas en proteínas fibrosas y son de forma aplanada. Una célula de EC mide en promedio $1\mu\text{m}$ de espesor y su superficie varía entre 700 y $1200\mu\text{m}^2$ (Woolfson, 1993). Esta fase proteica discontinua está rodeada por una fase lipídica continua (Elias *et al.*, 1991). Muy a menudo comparadas a “ladrillos”, están rodeadas de lípidos intercelulares: “el cemento” (Fig. 2).

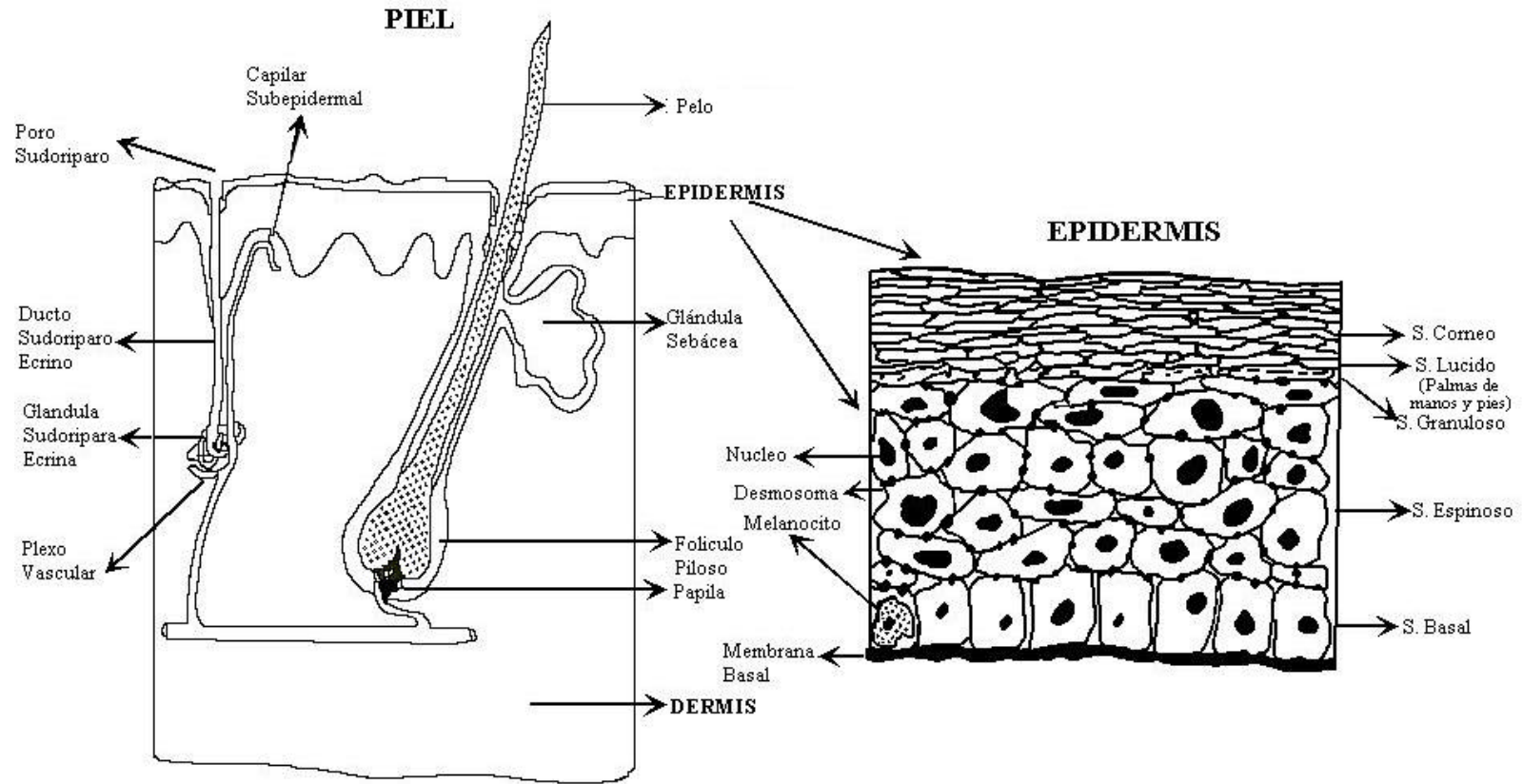


Figura 1. Representación esquemática de las capas de la piel.

El EC es un tejido relativamente poco hidratado, que contiene solamente un 20% del agua en condiciones normales. El espesor promedio de la capa córnea es de 10 a 50 μm , pudiendo ser de entre 300-400 μm sobre la palma de las manos o plantas de los pies bajo condiciones de hidratación máxima, el espesor puede alcanzar los 500 μm . La capa córnea tiene una densidad de 1.55 g/cm^3 (Shing *et al.*, 1993).

La epidermis viable

Es en la epidermis viable, a nivel del estrato germinativo (EG) que nacen las células epidérmicas. Las células provienen de la división celular migrando a través de la epidermis, en donde se diferencian. Inicialmente, son de forma cúbica o cilíndrica. Estas células migran del estrato espinoso (EE), donde se vuelven más alargadas, al EG y posteriormente al estrato lúcido (EL). Es precisamente en esta capa de la epidermis viable donde ocurre la queratinización y pérdida del núcleo, para finalmente completarse el proceso de queratinización en el EC.

El tejido viable de la epidermis tiene una densidad muy cercana a la del agua y está formado por células ricas en proteínas bañadas en una solución acuosa. El porcentaje de hidratación del EG es del 70%.

La Dermis

De un espesor que varía entre 0.2-0.3 cm (Woolfson *et al.*, 1993), esta parte de nuestra piel esta constituida por fibras proteicas: colágeno, elastina y reticulina, insertadas en una matriz semisólida (Pruniéras, 1981) compuesta de polisacáridos (Singh *et al.*, 1993). En esta capa de la piel encontramos también vasos sanguíneos, linfáticos y terminaciones nerviosas (Pruniéras, 1981, Singh *et al.*, 1993 Woolfson *et al.*, 1993). Los apéndices cutáneos se encuentran igualmente en la dermis y comprenden a las glándulas sudoríparas apócrinas y écrinas, los folículos pilosos y los vellos, así como las uñas.

El Tejido Subcutáneo (hipodermis)

Es tejido adiposo, en el que tiene lugar la producción y almacenamiento de compuestos lipídicos. Este tejido subcutáneo no participa en la absorción percutánea y tiene la función de amortiguar los golpes externos y de regular la temperatura corporal.

2.2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PIEL

La piel es un órgano que tiene considerable actividad enzimática, que incluyen isozimas citocromo P-450, las cuales pueden estar localizadas en células específicas de la epidermis y del sistema pilosebáceo. Enzimas identificadas en el estrato córneo incluyen: lipasas, proteasas, fosfatasas y glicosidasas. Toda sustancia aplicada sobre la piel se activa en forma química mediante la oxidación realizada por las isozimas P-450. Estas enzimas están localizadas principalmente en el retículo endoplásmico y la actividad es más alta en la fracción microsomal de homogeneizados de piel. La actividad catabólica de las enzimas en los folículos pilosos es particularmente grande. Mientras la actividad epidermal de la citocromo P 450 en la piel es de alrededor del 1-5% comparada con la del hígado, la actividad de transferasas puede ser 10 veces más alta que la de valores hepáticos (Merk *et al.*, 1996). La actividad enzimática varía con el sitio anatómico de nuestra piel. Por ejemplo, la actividad de la hidrocortisona 5 α -reductasa se detectó únicamente en la piel de la frente mientras que altos niveles de testosterona 5 α -reductasa se encontraron en la piel escrotal. La distribución de la actividad enzimática en las diferentes capas de la piel no se conoce con precisión y, por lo tanto, provoca dificultades en el desarrollo de experimentos. Como los capilares sanguíneos se encuentran localizados entre el punto de unión de la epidermis con la dermis, muchos fármacos tienen mínimo contacto con las enzimas de la dermis antes de alcanzar la circulación sistémica. De esta manera, la actividad enzimática de la epidermis será la más importante barrera para la absorción de fármacos (Streinstrasser *et al.*, 1995). La hidrólisis enzimática de fármacos en la piel también se ha descrito (Valia, *et al.*, 1985) y pueden diferir los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro*, en el caso de los resultados *in vitro*, algunas veces hay un mayor metabolismo por incremento de la actividad enzimática y por la falta de la acción removedora de los capilares (Guzek *et al.*, 1989; Potts *et al.*, 1989).

2.3 INMUNOLOGÍA DE LA PIEL

La piel lleva a cabo también una compleja función de defensa. La capacidad de la piel para distinguir lo propio de lo que no es resulta verdaderamente impresionante, si consideramos la vasta variedad de sustancias exógenas a las cuales está continuamente expuesta.

Al ambiente inmunológico de nuestra piel incluyendo los componentes humorales y celulares se le ha dado el nombre de sistema inmunológico de la piel. Problemas en este sistema pueden manifestarse como enfermedades inmunodermatológicas, incluyendo eczema atópico, soriasis, lupus eritematoso cutáneo, escleroderma, (Zierhut *et al.*, 1996; Bos, 1997), etc. Se sabe que las células de Langerhans habitan en la epidermis y expresan un alto nivel de moléculas de complejo de histocompatibilidad clase II y fuertes funciones estimuladoras para la activación de los linfocitos T. Las células de Langerhans comprenden del 2 al 4% de las células que constituyen la epidermis y también las encontramos en los nodos linfáticos. Estas actúan sobre los antígenos y los presentan a los linfocitos, para de esta manera proveer al organismo de un medio de control contra virus y bacterias. Los queratinocitos también juegan un papel importante en el sistema inmune de la piel (Melski, 1996). Otros compuestos adicionales

relevantes en cuanto a la inmunología de la piel son los eicosanoides, metabolitos oxigenados de ácidos grasos de 20 carbonos, especialmente del ácido araquidónico, que juegan un rol importante en la fisiopatología del proceso inflamatorio y de los desordenes inmunológicos de la piel. Por ejemplo, los leucotrienos juegan un papel muy importante y central en patógenesis asociadas a la soriasis.

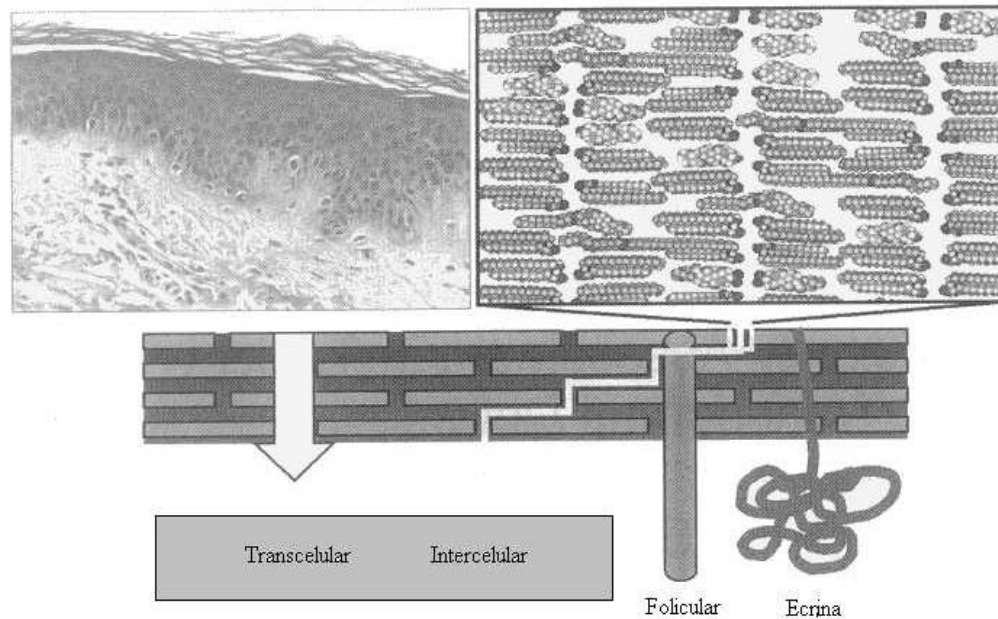


Figura 2. Representación esquemática de la piel. Arriba a la izquierda observamos una micrografía de la piel en la que podemos apreciar claramente el EC, epidermis viable y la dermis. Arriba a la derecha y abajo se ilustra una representación del modelo de ladrillo y cemento del EC.

2.4 PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE LA PIEL

Las propiedades eléctricas del estrato córneo fueron investigadas mediante la técnica del “tape stripping”, cuando se observó que la remoción del EC dramáticamente reducía la resistencia observada (Yammamoto *et al.*, 1976). Estos estudios sugirieron que es el EC la capa de resistencia eléctrica más alta y es además un elemento importante para la impedancia de la piel. La alta resistencia de esta capa se debe en gran parte a su bajo contenido de agua (alrededor del 20%) comparado con el valor fisiológico normal (cerca del 70%). Para entender el concepto de impedancia en términos simples, primeramente necesitamos entender el término de capacitancia. Un arreglo en paralelo separado por una distancia muy pequeña y

conectado a una batería permite a los electrones distribuirse en el plato bajo. Los electrones en el plato bajo entonces inducen una carga positiva en el plato superior de forma tal que más electrones pueden fluir dentro del plato bajo de la batería. Este arreglo de platos en paralelo actúa como un capacitor o condensador y es precisamente a esta propiedad a la que se le denomina capacitancia. La capacitancia de un capacitor es la habilidad que tiene para almacenar carga eléctrica, fluyendo dentro de éste en forma de carga. Los tejidos biológicos, como la piel, tienen esta propiedad debido a que presentan la capacidad de almacenar carga eléctrica de ahí que pueda ser considerada como un capacitor eléctrico. Cuando un circuito eléctrico posee tanto elementos capacitantes como resistivos, se dice que es reactivo, a diferencia de aquellos que únicamente poseen elementos resistivos. El modelo de circuito para el EC utiliza un arreglo en paralelo de un resistor y un capacitor o un resistor en serie con una combinación en paralelo de un resistor y un capacitor (Yammamoto *et al.*, 1976). Un sistema que es muy reactivo presenta mucho más impedancia que resistencia. La impedancia representa la oposición total eléctrica del circuito al paso de corriente a través de él. Medidas de la impedancia eléctrica de la piel son importantes para entender la liberación transdérmica de fármacos eléctricamente asistidos. La pérdida de resistencia de la piel por aplicación de corriente puede ser debida a una reorientación de moléculas entre los caminos por los que se transportan los iones, como es el posible rearrreglo de moléculas de lípidos en folículos pilosos y glándulas sebáceas (Kalia y Guy, 1995). La iontoforesis incrementa la concentración de fármaco en la parte de la piel que es la barrera limitante durante la difusión pasiva. Esto implica, que para fármacos lipofílicos como el fentanil la concentración en piel aumentará, mientras que para fármacos hidrofílicos como la hormona liberadora de tirotrópina, incrementará su concentración en el EC (Jadoul *et al.*, 1995). Esto es una consecuencia de que los fármacos hidrofílicos tienen dificultad en repartirse dentro del EC, mientras que los fármacos lipofílicos tienen dificultad en repartirse fuera del EC.

2.5 ABSORCIÓN PERCUTÁNEA

El EC es una barrera predominantemente lipofílica que minimiza la pérdida de agua transepidermal (TEWL). De igual manera, es la principal barrera de permeación para la absorción percutánea. La liberación transdérmica de pequeñas moléculas ha sido considerada como un proceso de partición interfacial y de difusión molecular a través de esta barrera. Un modelo matemático simple muestra al EC como una membrana heterogénea de dos fases lípido-proteínas, siendo la matriz lipídica la fase continua (Michaels *et al.*, 1975; Elias, 1983,1988). Numerosos modelos teóricos de permeación se han propuesto para predecir el flujo transdérmico de un fármaco basado en algunas de las propiedades fisicoquímicas del fármaco (Tojo, 1988; Potts *et al.*, 1992; Pugh *et al.*, 1994; Kirchner *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997). Estos modelos generalmente hacen consideraciones acerca de las propiedades de barrera de la piel y predicen el flujo transdérmico de un fármaco con soluciones acuosas saturadas, proporcionando información sobre su solubilidad en agua, peso molecular del fármaco y su coeficiente de partición lípido-proteínas. La mayoría de estos modelos teóricos asumen que el EC se comporta como un modelo de dos compartimentos, basado en un sistema de dos compartimentos heterogéneos de células ricas en proteínas embebidas en los lípidos intercelulares. Una analogía con ladrillos y cemento es una representación frecuentemente dada para este modelo (Fig. 2). Basado en este modelo, los fármacos pueden difundir a través

del EC vía transepidermal o a través de los apéndices presentes en la piel (folículos pilosos y glándulas sudoríparas). La penetración transepidermal de fármacos a través del EC puede tener lugar por la matriz lipídica en la cual se encuentran embebidos los corneocitos (vía intercelular) o a través de los corneocitos (vía transcelular). La contribución relativa de estas vías depende de la solubilidad, el coeficiente de partición y la difusividad del fármaco entre las proteínas y las fases lipídicas. La vía a través de los apéndices normalmente contribuye solamente con un porcentaje limitado del perfil cinético de liberación transdérmico de un fármaco. Recientemente, se mostró que la penetración de ácido retinóico fue más elevada a través de piel de cobayos rasurada, demostrando que la estructura y composición del EC es más importante que la densidad folicular para la difusión pasiva (Hisoire *et al.*, 1997). Sin embargo, los folículos pilosos y los ductos sudoríparos pueden actuar como caminos para moléculas iónicas mediante un transporte iontoforético.

2.6 BASES TEÓRICAS DE LA ABSORCIÓN PERCUTÁNEA

La difusión pasiva de un no electrolito en ausencia de un flujo estacionario se expresa mediante la primera ley de difusión Fick como:

$$J = -D \, dC/dx$$

Donde J es el flujo, D es el coeficiente de difusión y dC/dx es el gradiente de concentración a través de una distancia x . Esta primera ley de la difusión de Fick puede usarse para describir la permeación de fármacos a través de la piel. Sin embargo, el gradiente de concentración no puede medirse con facilidad, pero puede aproximarse mediante el producto del coeficiente de permeabilidad (P_s) y la diferencia de concentración a través de la piel (C_s) (Alberty y Hadgraft, 1979). El flujo transdérmico en el estado estacionario J_s a través de la barrera de la piel estará expresado como:

$$J_s = P_s C_s$$

Donde P_s , el coeficiente de permeabilidad, se define como:

$$P_s = K.D/h$$

Donde K es el coeficiente de partición y h es el espesor de la piel. La cantidad acumulada de fármaco a través de la piel (Q_t) queda dado por:

$$Q_t = K.D. C_s/h (t-h^2/6D)$$

Donde C_s es la concentración del reservorio saturado cuando las condiciones “sink” se mantienen en la solución receptora. La diferenciación de la ecuación anterior con respecto al tiempo nos lleva a la ecuación obtenida anteriormente que describe el flujo estacionario transdérmico ($J_s = P_s C_s$). Cuando se extrapola la línea del estado estacionario al eje del tiempo, el valor de tiempo de latencia, t_L se obtiene por el intercepto a $Q = 0$.

$$t_L = h^2/6D$$

El intercepto, t_L es una medida del tiempo que le toma al fármaco alcanzar un gradiente de concentración constante a través de la piel. El tiempo de latencia comúnmente se utiliza para el análisis de datos de permeación de experimentos *in vitro* con la técnica de dosis infinita, donde la piel separa un reservorio de dosis infinita de fármaco en el lado donador y las condiciones sink en el receptor. El flujo en el estado estacionario se calcula a partir de la pendiente del perfil de permeación lineal, mientras que el intercepto provee el tiempo de latencia de difusión. El coeficiente de difusión puede calcularse, entonces, de la ecuación $Q_t = K.D. C_s / h (t-h^2/6D)$, conociendo la concentración en la fase donadora, el espesor de la barrera de permeabilidad de la piel y midiendo el coeficiente de partición.

2.7 MECANISMOS PARA INCREMENTAR LA ABSORCIÓN PERCUTÁNEA

Debido a que nuestra piel por sus características propias opone resistencia natural al paso de sustancias exógenas se hace necesario incluir en el vehículo de formulaciones tópicas o transdérmicas sustancias que incrementen la partición y difusión de sustancias lipofílicas o hidrofílicas hacia y a través de la barrera de permeabilidad de la piel conocidas como ***agentes promotores o moduladores de la penetración***.

También, existe la necesidad de administrar fármacos de peso molecular muy grande e ionizados (péptidos) que por presentar estas características no pasarían a través de la piel. El uso de ***promotores de absorción físicos*** como son la iontoforesis, la sonoforesis y la electroporación ofrecen una buena alternativa para favorecer el paso de estos.

2.7.1. Promotores de absorción químicos

Entre las entidades químicas que han sido estudiadas como promotores de absorción y que han sido efectivas, se tienen aquellas que cuentan con una cadena alquílica larga (12-18 carbonos) y una cabeza polar. Esta cabeza polar interactúa con los grupos polares de los lípidos que conforman la barrera de permeabilidad de la piel, mientras que la cadena alquílica se inserta entre las cadenas de la bicapa, rompiendo su orden, lo que ocasiona mayor fluidización entre ellos, y un aumento en la difusión del activo a través de la membrana. El ácido oléico es uno de estos casos, el cual posee un doble enlace cis, que se inserta dentro de los lípidos modificando su empaquetamiento y consecuentemente incrementando la fluidez. La azona[®], por su parte, no tiene carbonos con insaturaciones; sin embargo actúa de la misma manera. Estos dos promotores son no polares, pero también existen promotores de baja polaridad (pirrolidonas, dimetilformamidas), de polaridad media (dimetilsulfóxido, DMSO) y de alta polaridad (propilenglicol, PG) los cuales tienen diferentes mecanismos de acción (Barry, 1987).

Los mecanismos de acción de los agentes promotores o moduladores de la penetración se resumen en los siguientes y se muestran en el cuadro 1:

1) *Incremento de la fluidez de las bicapas lipídicas de la barrera de permeabilidad de la piel.*

El transporte intercelular es la ruta más probable para el paso de sustancias a través de la piel. La disrupción del paquete lipídico intercelular, ya sea por la interacción del promotor con los lípidos o con componentes protéicos, incrementa la permeabilidad cutánea. Mediante diversas técnicas biofísicas, se ha demostrado que existe una correlación entre la fluidez lipídica y la permeabilidad. Este incremento de la fluidez se debe a una disminución en la temperatura de la transición vítrea que se genera cuando los lípidos sufren una transición de una fase gel (rígida) a una fase líquida cristalina más fluida. Un incremento reversible de la fluidez de los lípidos intercelulares puede considerarse como un efecto no tóxico (Ganem *et al.*, 1998).

2) *Extracción de lípidos intercelulares.*

Algunos de los promotores pueden incrementar la permeabilidad de la piel al extraer los lípidos intercelulares de la barrera de permeabilidad, sin embargo este efecto es drástico comparado con el anterior ya que las modificaciones en la barrera de permeabilidad dejan de ser reversibles. Esta extracción de lípidos permite incrementar la velocidad de permeación de sustancias polares y no polares (Ganem *et al.*, 1998).

3) *Interacción con componentes protéicos.*

Otros promotores incrementan la permeabilidad de la piel al cambiar la conformación, desnaturalizar e incluso extraer las proteínas de la membrana (Ganem *et al.*, 1998).

4) *Alteración de la barrera enzimática.*

Los inhibidores enzimáticos pueden también considerarse como promotores de absorción, si se considera que la capacidad metabólica de la piel puede actuar como una barrera enzimática (Ganem *et al.*, 1998).

5) *Incremento de la actividad termodinámica.*

Se encuentra estrechamente relacionada con la composición del vehículo, la cual puede influir directamente en la solubilidad del penetrante. Una forma de aumentar el coeficiente de partición piel/formulación, consiste en el uso de sistemas saturados de fármacos, lo cual puede lograrse eligiendo adecuadamente los componentes de la formulación.

6) *Co-difusión del promotor y del soluto.*

Se ha demostrado que ciertos promotores como el transcuto[®], PG, y DMSO, son capaces de difundir a través de la piel, arrastrando junto con él, al penetrante (Ganem *et al.*, 1998).

7) *Incremento de la hidratación del estrato córneo.*

Aunque no existen teorías firmes sobre cómo el agua afecta el transporte de una sustancia, parece ser que actúa por solvatación de las cabezas polares de los lípidos principalmente glicosfingolípidos y ceramidas (Ganem *et al.*, 1998).

Cuadro 1. Promotores de penetración cutánea^a

Agente promotor	Ejemplos	Mecanismo de acción
A. Disolventes		
Agua		7
Alcoholes	Metanol, etanol	1
Alquilmetilsulfóxidos	Dimetilsulfóxido, dimetilformamida	2
Pirrolidonas	2-Pirrolidona, N-metil-2 pirrolidona	7
Azona [®] y derivados		1
Otros	Propilenglicol	6,3
B. Surfactantes		
Aniónicos	Dodecil sulfato de sodio	1,2 y 3
Catiónicos	Bromuro de cetiltrimetilamonio	1,2 y 3
No iónicos	Tweens, brijs, poloxámeros	1,2 y 3
Ácidos y alcoholes grasos	Ácido oléico, ácido láurico	1
Sales biliares	Tioglicolato de calcio	1,2 y 3
C. Otros		
Urea		7
Terpenos y aceites esenciales	Mentol, limoneno	1
Ciclodextrinas		5

^a (Datos modificados de Ganem et al, 1998)

2.7.1.1 Laurocapram (azona[®])

De entre los promotores de absorción química, la azona[®] (Laurocapram) ha sido posiblemente uno de los más efectivos tanto para sustancias de naturaleza lipofílica como hidrofílica. Los nombres químicos para este promotor son los siguientes:

- 1-dodecil azacicloheptan-2-ona (IUPAC)
- 1-dodecil hexahidro-2H-azepin-2-ona
- N-dodecil-3-caprolactam

Es un derivado del caprolactam y tiene uso como agente promotor de la penetración percutánea, es un agente activo fisiológico y presenta actividad intrínseca antiinflamatoria (Manual Merck, 1996).

La azona[®] (Fig. 3) fue patentada en 1976 como un agente promotor de la penetración (Rajadhyaksa, 1976-1984). Ha sido ampliamente estudiada desde la década de los ochenta, es un líquido claro color ámbar, con un peso molecular de 281.49 Da, un punto de fusión de -7 °C, y un punto de ebullición de 160 °C. El coeficiente de partición octanol/agua es de 6.21 (Allan, 1995), demostrando que es un material con un carácter altamente lipofílico, con un valor de pKa = 0.43 (Escobar-Chávez *et al.*, 2005).

La azona[®] es miscible prácticamente en todos los solventes orgánicos por lo que tiene una gran capacidad para disolver un número importante de fármacos. Se incorpora fácil y rápidamente en diferentes formulaciones, mostrando una alta estabilidad y compatibilidad con los excipientes de las formulaciones (Allan, 1995).

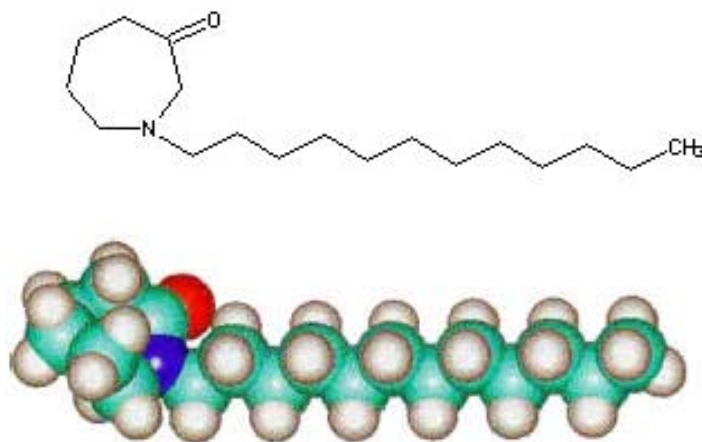


Figura 3. Estructura química de la azona[®], primera molécula sintetizada para actuar como agente promotor de la penetración percutánea.

La azona[®] que posee en su estructura una cadena alquílica larga (Fig. 3) de doce carbonos limitada por un ciclo polar (azacicloheptan-2-ona) (Potts, 1992), es un promotor efectivo para fármacos lipofílicos e hidrofílicos, usado a concentraciones bajas (1-5% v/v) con una actividad promotora que puede incrementarse por el uso de cosolventes como PG (Wiechers *et al.*, 1990; Hadgraft, 1996) y transcuto[®] (Escobar-Chávez *et al.*, 2005). Con todas estas características la azona[®] puede considerarse como un promotor universal, aunque esta acción también dependerá de diferentes factores, tales como el nivel de hidratación de la piel, la solubilidad del fármaco en el vehículo, etc. (Allan, 1995).

Mecanismo de acción

En los últimos años, se han propuesto diversos mecanismos a través de los cuales la azona[®] puede favorecer el paso de activos a través de la barrera de permeabilidad de la piel. Sin embargo, todos llevan una misma directriz y está es que interacciona con los lípidos del EC, desordenándolos y formando huecos entre ellos haciendo que se incremente la permeación de sustancias a través de la piel.

El cuadro 2 muestra los tres mecanismos propuestos por diversos grupos de investigadores a través de los cuales la azona[®] permite el paso de sustancias a través de la piel.

Cuadro 2. Mecanismos de acción para azona[®] según diversos investigadores

Mecanismo de Acción	Investigadores
Disrupción de la bicapa lipídica	Barry, 1987
Penetración de la azona [®] a las bicapas lipídicas incrementando el movimiento de las cadenas acil de los lípidos, debido al grupo dodecil. El anillo caprolactámico empuja las cabezas polares de los lípidos deformándolos, generando un incremento en la permeabilidad.	Katsu <i>et al.</i> , 1989
Aumento de la fluidez y la permeación en las regiones lipídicas de la piel humana. Generación de fluidez de las regiones hidrofóbicas de la estructura lamelar.	Beastall <i>et al.</i> , 1988 Schückel <i>et al.</i> , 1991 Allan, 1995 Hadgraft <i>et al.</i> , 1996

Formulaciones tópicas con azona[®]

En los últimos años se han realizado un gran número de estudios empleando formulaciones con azona[®], con diversos vehículos y fármacos, a fin de evaluar su acción promotora. En el cuadro 3 se resumen los resultados obtenidos por diferentes investigadores al usar este promotor de la penetración.

Cuadro 3. Formulaciones tópicas desarrolladas con azona[®] y sus resultados^a

Formulación	Estudios	Membrana utilizada	Resultados	Autor/Año
Película de flurbiprofeno en acetona, adicionada con dimetilsorbida, propilenglicol o Solketal, posteriormente se adicionó azona [®] al 2%	<i>In vitro</i> mediante celdas de difusión	Piel humana	Se incrementaron los flujos, excepto Solketal y azona [®]	Akhter <i>et al.</i> , 1984

Benzoato de betametasona-propilenglicol-azona [®] al 2% ó dimetilformamida-azona al 2.5%	Estudios de vasoconstricción y biodisponibilidad	Piel Humana	Solo la mezcla propilenglicol-azona [®] incrementa la biodisponibilidad	Bennet <i>et al.</i> , 1984
Salicilato de sodio en azona [®]	<i>In vitro</i> usando celdas de difusión tipo Franz	Membrana con lípidos artificiales	Formación de par iónico entre salicilato y azona [®] promoviendo su transporte	Hadgraft <i>et al.</i> , 1985
PG y azona [®]	DSC	EC humano	La mezcla PG-azona [®] es más efectiva que usar únicamente azona [®]	Barry, 1987
Acetonido de triamcinolona al 0.05% y azona [®] al 1.6% en vaselina	Evaluación del efecto terapéutico	Piel humana con enfermedad tópica	Mejóro notablemente la eficiencia del ATC	Wie chers <i>et al.</i> , 1990
Melanotropina y azona [®]	<i>In vitro</i> mediante celdas de difusión	Piel humana y piel de ratón	Se incrementa la penetración de melanotropina	Ruland <i>et al.</i> , 1994
Azona [®] en alcohol etílico	<i>In vitro</i> usando celdas de difusión	Mucosa bucal humana	Promueve la penetración	Turunen <i>et al.</i> , 1994
Crema tópica con PG y azona [®] al 1.6%	<i>In vivo</i> aplicando en 21 sujetos sanos, y cuantificando en orina mediante radiomarcadores	Piel humana	La azona [®] se absorbió muy poco recuperándose menos del 3%	Allan 1995
Gel de metotrexato al 0.1,0.5 y 1% con azona [®] al 3%	Evaluación de la enfermedad y cuantificación en suero	Humanos afectados	Se promovió la penetración	Allan, 1995
5-fluorouracilo, cafeína, ibuprofeno, ácido salicílico y acetónido de triamcinolona en PG, pretratamiento de la piel con azona [®] 0.4M en PG	Celdas de difusión	Piel de ratón	Se incrementa el flujo de activo a través de la membrana	Phillips <i>et al.</i> , 1995
Tartrato de metoprolol y azona [®] en dispositivo iontoforético	Celdas de difusión y microscopía electrónica de barrido	Piel humana de cadáveres	El uso de azona [®] incrementa hasta 130 veces más el flujo de activo combinándolo con iontoforesis	Ganga <i>et al.</i> , 1996
Indometacina en alcohol etílico y azona [®]	<i>In vitro</i> mediante celdas de difusión	Piel de ratón	Hubo daño en piel	Akimoto <i>et al.</i> , 1996

Metronidazol en alcohol etílico y azona [®]	<i>In vitro</i> mediante celdas de difusión	EC humano	Se promueve la penetración	Hadgraft <i>et al.</i> , 1996
Testosterona, estradiol, progesterona, acetato de norentidrona en alcohol etílico y azona [®]	<i>In vitro</i> mediante celdas de difusión	Piel de cerdo	Se promueve la penetración	Morgan <i>et al.</i> , 1998
Nifedipina con alcanos, ácidos alcanóicos, azona [®] y MIP	<i>In vitro</i> mediante celdas de difusión	Piel de rata	El flujo se incrementó 4 veces más comparado con la administración oral del activo	Squillante <i>et al.</i> , 1998
Hidrocortisona en PG, pretratamiento en piel con azona [®] 0.4M en PG	<i>In vitro</i> mediante celdas de difusión	Piel de ratón	El uso de azona [®] incrementa la penetración	Michniak <i>et al.</i> , 1998
Clorhidrato de morfina, transporte iontoforético con y sin azona [®]	<i>In vitro</i> mediante celdas de difusión	Piel de rata	Combinado el uso de azona [®] con iontoforesis no incrementa la penetración de activo	Numajiri <i>et al.</i> , 1998
Solución saturada de naproxeno, piel pretratada con azona [®] al 3% en alcohol etílico	<i>In vitro</i> mediante celdas de difusión. <i>Ex vivo</i> : perfusión	<i>In vitro</i> : piel abdominal de humano. <i>Ex vivo</i> : piel de oreja de conejo	Se promueve la penetración	Degim <i>et al.</i> , 1999
Gel con 5-fluorouracilo en piel pretratada con azona [®] al 1% en alcohol etílico	Se midió el efecto de la penetración mediante ultrasonido en celdas de difusión	Piel de rata	Azona [®] aumentó la penetración comparada con el uso de ultrasonido	Meidan <i>et al.</i> , 1999
Hidrogel de enoxacina con Azona [®]	<i>In vitro</i> : celdas de difusión horizontales <i>In vivo</i> : microdiálisis	Piel de rata	Se incrementaron los residuos de enoxacina en piel	Fang <i>et al.</i> , 1999
Solución saturada de benazeprilo e hidrocortisona con azona [®] al 3% y PG Maleato de timolol administrado iontoforéticamente en piel pretratada con azona [®] al 3% y 0.11%	<i>In vitro</i> mediante celdas de difusión tipo Franz <i>In vitro</i> : inducción de taquicardia y medición del sulfato de isoprelina inhibido por electrocardiograma	Piel de ratón Conejos albinos	El uso de azona [®] incrementa la penetración del activo Se incrementó la liberación transdérmica	Tenjarla <i>et al.</i> , 1999 Kanikkannan <i>et al.</i> , 2000
Antipirina, 5-fluoruracilo y 4-fenil butanol (soluciones saturadas a pH=6), en piel pretratada con azona [®] al 1 y 5%	<i>In vitro</i> : celdas de difusión verticales	Piel de ratas	Promueve la penetración	Lopez <i>et al.</i> , 2000

12 mezclas de lípidos de piel adicionados con azona [®] a varias concentraciones	Se midió el flujo de agua mediante evaporímetro y difracción de rayos X	Mezcla de lípidos (derivados del colesterol y ceramidas)	Reducción del flujo de agua y efecto oclusivo	Norlen <i>et al.</i> , 2000
Solución y suspensión de ácido salicílico y salicilato de sodio, en piel pretratada con azona [®] 0.5M en PG	<i>In vitro</i> : celdas de difusión	Piel de humano y membrana de caucho silastic [®]	Se aumentó la penetración del activo siendo mayor a pH 4 y 7.2	Smith <i>et al.</i> , 2000
Indometacina al 1% en alcohol etílico a pH=7.4, en piel pretratada con azona [®] al 3% en PG y alcohol etílico	<i>In vitro</i> : celdas de difusión y examen histológico de la piel	Piel de ratón	La azona [®] incrementa la penetración y fue mayor cuando se utilizó en PG	Fang <i>et al.</i> , 2001
Geles hidroalcolícos de benzodiazepinas (clonazepam y lorazepam) (1%) con azona [®] y PG	<i>In vitro</i> : celdas de difusión tipo Franz	Piel humana de pacientes que se sometieron a proceso quirúrgico de reducción de senos	La azona [®] combinada con PG incrementan la penetración de ambas benzodiazepinas	Puglia <i>et al.</i> , 2001
Soluciones de cidofovir y aciclovir con o sin azona [®]	<i>In vitro</i> : celdas de difusión tipo Franz <i>In vivo</i> : ratones infectados con virus de herpes simples tipo I para evaluar la eficacia de la aplicación tópica de los activos	Piel de ratón para los experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Cidofovir formulado con azona [®] presentó una mayor eficacia en el tratamiento y prevención de infecciones asociadas a herpes simples tipo I, no así para el caso del aciclovir	Afouna <i>et al.</i> , 2003
Geles de furosemida en hidroxipropil celulosa con azona [®] (5-6.5%)	<i>In vitro</i> : celdas de difusión tipo Franz	Piel humana de cadáveres	La cantidad permeada de activo es mayor cuando se usa azona [®] en un intervalo de concentraciones del 5-6.5%	Agyralides <i>et al.</i> , 2004
Soluciones de 5.fluorouracilo conteniendo azona [®] , lauril alcohol y miristato de isopropilo por separado	<i>In vitro</i> : celdas de difusión	EC humano de abdómenes de cadáveres	La azona [®] resultó ser el mejor promotor al incrementar hasta 24 veces el flujo de activo	Singh <i>et al.</i> , 2005

Kenalong [®] (ATC) adicionado con azona [®]	<i>In vitro</i> : celdas de difusión	Mucosa bucal porcina	Gran acumulación de acetónido en el tejido	Nicolazzo <i>et al.</i> , 2005
Naproxeno sódico formulado en geles de PF-127 y promotores de penetración (transcutol [®] y azona [®])	<i>In vivo</i> : aplicación de las formulaciones en antebrazo de voluntarios sanos y evaluación de cambios en la barrera de permeabilidad mediante determinaciones de TEWL e infrarrojos de la piel	Piel humana de voluntarios sanos	El naproxeno sódico penetró más a través de la piel con el gel que contenía la mezcla de ambos promotores (azona [®] /transcutol [®])	Escobar-Chávez <i>et al.</i> , 2005

^a(Datos modificados de López-Cervantes *et al.*, 2005)

Abreviaturas:

(DSC) Calorimetría diferencial de barrido, (PG) Propilenglicol, (ATC) Acetónido de triamcinolona, (MIP) Miristato de isopropilo, (EC) Estrato córneo, (TEWL) Pérdida de agua transepidermal.

Como se puede observar en los resultados presentados en el cuadro 3 en todos los estudios realizados se pone de manifiesto que la azona[®] efectivamente tiene una acción promotora para una gran variedad de fármacos al incrementar su paso a través de la piel y en muchos casos esa acción promotora se puede ver incrementada por la combinación de esta con otros agentes promotores de penetración (Bennet *et al.*, 1984; Barry, 1987; Squillante *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2001; Escobar-Chávez *et al.*, 2005).

2.7.1.2 Transcutol[®] (Carbitol)

Dentro del extenso grupo de promotores de penetración el éter monoetilico de dietilen glicol (transcutol[®]) (Fig. 4) mostró una clara influencia en la absorción percutánea de muchos fármacos, principalmente en combinación con otros agentes promotores de la penetración (Rieg-Falson *et al.*, 1989; Touitou *et al.*, 1991; Watkinson *et al.*, 1991). También se ha demostrado que se incrementa el paso de varios fármacos a través de la piel sólo por el hecho de estar disueltos en transcutol[®].



Figura 4. Estructura química del transcutol[®]

Mecanismo de acción

Los mecanismos que han sido propuestos para explicar la acción promotora de la penetración percutánea del transcuto[®] se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Mecanismos de acción para transcuto[®] según diversos investigadores

Mecanismo de Acción	Investigadores
Incremento de la solubilidad del fármaco que genera cambios en el coeficiente de partición del fármaco.	Ganem-Quintanar <i>et al.</i> , 1997 Torrado <i>et al.</i> , 1997
Acumulación de activos en capas superficiales de la piel, por formación de un “depósito intracutáneo” debido al hinchamiento de los lípidos intercelulares.	Panachagnula <i>et al.</i> , 1991 Touitou <i>et al.</i> , 1991 Godwin <i>et al.</i> , 2002
Cambios en la composición del vehículo, por absorción de agua no sólo del ambiente sino de la misma piel.	Ritschel <i>et al.</i> , 1988 Bialik <i>et al.</i> , 1993 Ganem-Quintanar <i>et al.</i> , 1997

Formulaciones tópicas con transcuto[®]

De más reciente investigación y utilización como agente promotor de la penetración en formulaciones tópicas y transdérmicas, el transcuto[®] (monoetil éter de dietilen glicol), se ha venido utilizando en los últimos años para un número considerable de estudios, con diversos vehículos y fármacos, a fin de evaluar su acción promotora. En el cuadro 5 se muestran los resultados obtenidos por diferentes investigadores al usar este promotor de la penetración.

Cuadro 5. Formulaciones tópicas desarrolladas con transcuto[®] y sus resultados

Formulación	Estudios	Membrana utilizada	Resultados	Autor/Año
4 Formulaciones: gel, crema, aceite y solución de polietilenglicol con ácido oléico 10% y transcuto [®] 20%	<i>In vitro</i> mediante celdas de difusión tipo Franz	Piel de ratón rasurado	Se incrementó la permeación de teofilina a través de la piel con la solución de polietilenglicol con ácido oleico y transcuto [®] .	Touitou <i>et al.</i> , 1991
Soluciones de ibuprofeno (5%) con Brij's y transcuto [®]	<i>In vitro</i> mediante celdas de difusión tipo Franz	Piel humana de abdomen o senos	Se incrementó la permeación de activo	Bialik <i>et al.</i> , 1993

Solución acuosa de cafeína con transcutol [®] (20%) y ácido oleico (10%)	<i>In vitro</i> mediante celdas de difusión tipo Franz	Piel de ratón	Se incremento 40 veces más el flujo de cafeína	Touitou et al., 1994
Soluciones de metil nicotinato con PG, Labrafac [®] o transcutol [®]	<i>In vitro</i> mediante celdas de difusión	Piel de abdomen de rata	No se incrementa el flujo a través de la piel	Lafforgue et al., 1995
Solución de albendazol en transcutol [®] (40%) y buffer pH=1.2	Análisis de activo en muestras de plasma, estudios de toxicidad aguda	Ratones vivos	Incremento en la biodisponibilidad relativa	Torrado et al., 1997
Soluciones de diclofenaco y piroxicam (0.5%) con mezclas de ácidos grasos insaturados, oleato de potasio, limoneno y transcutol [®] en diferentes proporciones	<i>In vitro</i> : celdas de difusión tipo Franz	Piel abdominal humana	Posibilidad de generar vehículos adecuados que contengan promotores de penetración y componentes de estrato córneo para fármacos antiinflamatorios	Parra et al., 1997
Velocidad de intercambio transcutol [®] -agua a través de la piel	<i>In vitro</i> : celdas de difusión tipo Franz modificadas	Piel de rata removida de estrato córneo mediante <i>tape stripping</i>	Transcutol [®] incrementó la hidratación de la piel al aumentar la salida de agua	Ganem-Quintanar et al., 1997
Microemulsiones de ciclosporina con transcutol [®] y surfactantes	C _{max} de ciclosporina en sangre y AUC después de administración oral	Ratas macho Spague-Dawley	Se incrementó la biodisponibilidad del activo	Zhong-Gao et al., 1998
Microemulsiones de aceite esencial de Atzei & Picci salvia desoleana con transcutol [®]	<i>In vitro</i> : celdas de difusión tipo Franz	Mucosa bucal porcina	Se incrementó la permeación a través de la mucosa bucal	Ceschel et al., 2000
Hidrogeles de clonazepam (1.5%)	<i>In vitro</i> : celdas de difusión tipo Franz y estudios de liberación de clonazepam mediante un simulador de absorción	Piel de oreja de conejo y membrana de nitrato de celulosa impregnada con alcohol laurílico	La combinación transcutol/PG incrementa el flujo de activo por piel	Mura et al., 2000

Geles hidroalcohólicos de benzodiazepinas (clonazepam y lonazepam) al 1% y promotores de penetración	<i>In vitro</i> : celdas de difusión tipo Franz	Piel humana de pacientes que se sometieron a proceso quirúrgico de reducción de senos	El uso de transcutol [®] incrementó el coeficiente de partición estrato córneo/vehículo	Puglia <i>et al.</i> , 2001
2-Octil-4-metoxicinamato y oxibenzona en miristato de isopropilo y transcutol [®] (0-50%)	<i>In vitro</i> : celdas de difusión tipo Franz modificadas	Piel abdominal de ratón	Incremento de la acumulación de los bloqueadores de rayos UV en la piel y sin incremento en la penetración transdérmica	Godwin <i>et al.</i> , 2001
Parches adhesivos a base de hidrogeles con triclosan y transcutol [®] al 5%	<i>In vitro</i> : celdas de difusión tipo Franz	Piel de ratón	A concentraciones mayores al 5% de transcutol [®] la permeación de activo a través de la piel se incrementó	Tae-Wan <i>et al.</i> , 2003
Microemulsiones de diclofenaco sódico (1%) con transcutol [®] , ácido oleico y limoneno	<i>In vitro</i> : celdas de difusión tipo Franz, estudios de actividad antiinflamatorio y de irritación en piel en animales (ratas y conejos)	Piel humana de cirugía plástica	Se incrementó el coeficiente de permeabilidad, el flujo de fármaco	Escribano <i>et al.</i> , 2003
Soluciones al 2% de sucroésteres (SEs) en transcutol [®] o agua	<i>In vivo</i> : determinación de la cantidad penetrada a través de la piel mediante IRTE/RTA	Piel voluntarios sanos	Los SEs en transcutol [®] alteraron la barrera de permeabilidad de la piel promoviendo la penetración del activo	Ayala-Bravo <i>et al.</i> , 2003
Soluciones de lidocaína y SEs con transcutol [®] a diferentes pH's	<i>In vitro</i> : celdas de difusión tipo Franz	Piel de orejas de cerdo	La difusión del activo se incrementa cuando la piel es pretratada con SEs y transcutol [®]	Cazares-Delgadillo <i>et al.</i> , 2005
Naproxeno sódico formulado en geles de PF-127 y promotores de penetración (transcutol [®] y azona [®])	<i>In vivo</i> : aplicación de las formulaciones en antebrazo de voluntarios sanos y evaluación de cambios en la barrera de permeabilidad mediante determinaciones de TEWL e infrarrojos de la piel	Piel humana de voluntarios sanos	El naproxeno sódico penetró más a través de la piel con el gel que contenía la mezcla de ambos promotores (azona [®] /transcutol [®]), sin embargo el uso de transcutol [®] sin azona [®] también favorece el paso de activo a través de la piel	Escobar-Chávez <i>et al.</i> , 2005

Abreviaturas:

(AUC) Área bajo la curva, (IRTE/RTA) Espectroscopía de infrarrojo, (UV) Ultravioleta, (PG) Propilenglicol, (SEs) Sucroésteres, (TEWL) Pérdida de agua transepidermal

En el cuadro 5 se muestra que el transcutol[®] además de ser un excelente cosolvente para un gran número de fármacos, también incrementa el paso de un activo a través de la barrera de permeabilidad de la piel manifestandose su acción promotora. Esta acción se debe principalmente a una acumulación de activo en capas de la piel (Godwin *et al.*, 2001) y a un incremento en la hidratación de la piel (Ganem-Quintanar *et al.*, 1997).

2.7.2 Promotores de absorción físicos

El desarrollo de fármacos biotecnológicos, tales como péptidos y oligonucleótidos ha ocurrido al mismo tiempo que se incrementan los estudios de liberación transdérmica. Muchos de estos agentes biotecnológicos no pueden ser administrados por vía oral por la degradación gastrointestinal y por el efecto del primer paso hepático. Por otra parte, sus propiedades como elevado peso molecular y carga son desfavorables para la penetración transdérmica, de ahí que el uso de la iontoforesis haya retomado gran importancia en cuanto a sistemas de liberación transdérmica.

La iontoforesis es un método eléctrico para promover la absorción de fármacos que consiste en hacer pasar corriente eléctrica fisiológicamente tolerable ($=0.5 \text{ mA/cm}^2$) a través de un electrodo que contiene el fármaco en contacto con la piel y un electrodo conectado en tierra, el cual completa el circuito eléctrico en otra parte del cuerpo (Ver Fig. 5). La iontoforesis favorece el paso de sustancias a través de la piel mediante los siguientes mecanismos:

- 1) Repulsión eléctrica generada por el electrodo al contener un activo de la misma polaridad.
- 2) Flujo de corriente eléctrica que puede incrementar la permeabilidad.
- 3) Electroósmosis al lograr que moléculas sin carga y péptidos polares de gran tamaño penetren a través de la piel.

La eficacia del transporte depende principalmente de la polaridad, la valencia y la movilidad de las especies cargadas, así como de los ciclos eléctricos y componentes de la formulación.

Existen otras técnicas de promoción física; sin embargo no han sido desarrolladas como la iontoforesis, entre ellas destacan la sonoforesis y la electroporación. La electroporación consiste en la aplicación de voltajes muy altos en tiempos muy cortos (milisegundos) creando una región transitoria de permeabilidad formando canales en la estructura de los lípidos intercelulares.

En cuanto a la sonoforesis, el mecanismo de acción aún no está perfectamente esclarecido por lo que algunos autores (Mitragroti *et al.*, 1996) sugieren que se induce la fluidización de lípidos de la barrera de permeabilidad de la piel o que también se generan cavidades entre ellos; favoreciendo el paso de sustancias a través de la piel.

2.7.3 Uso combinado de agentes promotores de penetración e iontoforesis

La promoción química (promotores de penetración) y eléctrica (iontoforesis) son las dos principales técnicas que facilitan la liberación transdérmica de fármacos y su uso combinado puede ofrecer algunas ventajas adicionales (Ganga *et al.*, 1996). La combinación de varios promotores en conjunto con iontoforesis ha sido investigada para la liberación transdérmica de acetato de nonivamida a través de piel de rata. El cloruro de cetilpiridinio y el miristato de isopropilo fueron los más efectivos, sin embargo su potencial uso clínico estará limitado debido a que induce cambios severos en la estructura histológica de la piel (Fang *et al.*, 1997). En otro estudio *in vitro* de liberación transdérmica de sotalol, los promotores de penetración fueron tan efectivos como el uso de iontoforesis. La combinación de los promotores y de la iontoforesis no incrementaron la permeación del sotalol, sino que los valores obtenidos fueron menores que los obtenidos al usar promotores e iontoforesis por separado (Hirvonen *et al.*, 1993). El efecto del alcohol etílico sobre el transporte iontoforético *in vitro* de un agonista de la dopamina también ha sido investigado. Se encontró que el uso del etanol incrementó hasta 5 veces la solubilidad del agonista de dopamina, sin embargo esto sólo generó un modesto incremento en la cantidad transportada a través de la piel hacia el compartimento receptor. Una cantidad considerable del agonista fue retenida en la piel (Hager *et al.*, 1993). Cualquier interacción potencial entre la promoción química y eléctrica deberá ser investigada mediante técnicas como son la espectroscopia de impedancia (Kalia y Guy, 1997) o difracción de rayos-X (Chesnoy *et al.*, 1996).

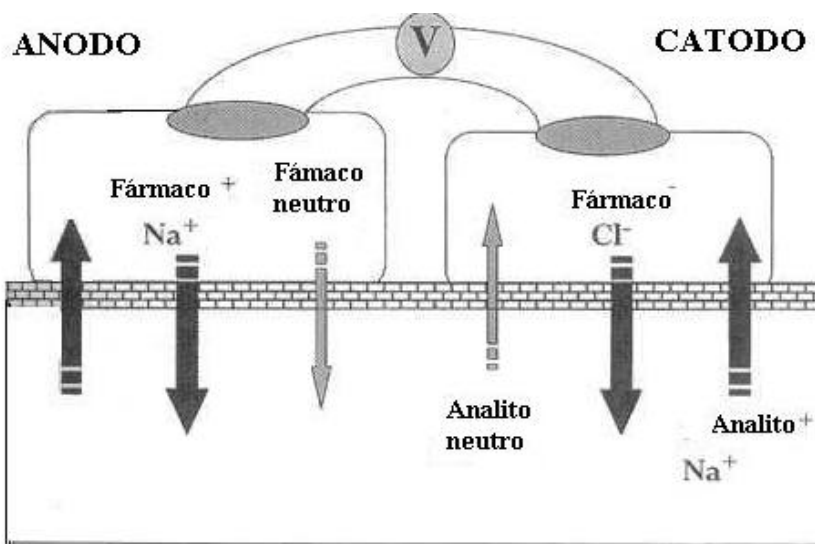


Figura 5. Dispositivo iontoforético que permite el paso de fármacos a través de la piel

2.8 POLOXAMER 407 (PLURONIC F-127®)

2.8.1 Clasificación de geles

Los geles o jaleas son sistemas semisólidos que consisten en suspensiones de pequeñas partículas inorgánicas o grandes moléculas orgánicas interpenetradas por un líquido. Los geles normalmente se clasifican como sistemas de dos fases, si el tamaño de partícula de la fase dispersada es grande, o geles de una fase cuando las macromoléculas orgánicas se distribuyen uniformemente a través del líquido de manera tal que no existe un límite entre las macromoléculas dispersadas y el líquido (USP Pharmacopea, 2000).

Como se muestra en el cuadro 6, el pluronic F-127 (PF-127) se incluye en el grupo de los hidrogeles que tienen la peculiaridad de contener ingredientes que los hacen dispersables como coloides o solubles en agua.

Los geles son redes poliméricas hinchadas que poseen las propiedades cohesivas de un sólido y las características de transporte por difusión de un líquido (Hamley, 1998). Los copolímeros de tres bloques (como el poloxamer 407) se utilizan ampliamente en la industria y son sólidos porosos que tienden a ser ligeramente elásticos y altamente reactivos (Cohen, 1996). Los *geles reversibles*, tal es el caso del pluronic F-127 (PF-127), tienen la capacidad de formar, romper y modificar los enlaces responsables de mantener a la red polimérica unida. Por el contrario, se tiene a los geles que no poseen estas características tan peculiares debido a que la red polimérica se mantiene unida a través de enlaces covalente y reciben el nombre de *geles permanentes*.

Cuadro 6. Clasificación general y descripción de geles ^a

Tipo de gel	Descripción	Ejemplos
Inorgánico	Sistemas de dos fases	Gel de hidróxido de aluminio; magma bentonita
Orgánico	Sistemas de una sola fase	Carbopol [®] ; tragacanto
Organogeles	Tipo hidrocarburo grasas Animal/vegetal Organogeles: Polares No ionicos	Petrolato arcillas, crema de cocoa esterarato de aluminio Carbowax [®]
Hidrogeles	Hidrogeles Orgánicos Gomas naturales y sintéticas Hidrogeles inorgánicos	Pasta de pectina Metilcelulosa, PF-127 [?] Gel de bentonita, Veegum [®]

^{a)} Loyd et al., 1994

El PF-127 es un gel termorreversible (DiBiase *et al.*, 1996; Gilbert *et al.*, 1986; Miyazaki *et al.*, 1984; Yeon *et al.*, 2000), y es precisamente esta característica la que le ha permitido ser utilizado como acarreador de activos por la gran mayoría de vías de administración como son: la vía oral, la tópica (Morikawa *et al.*, 1987., Padilla *et al.*, 2000), la intranasal (Jain *et al.*, 1999), la vaginal, la rectal (Miyazaki *et al.*, 1986; Barichello *et al.*, 1999; Ryu *et al.*, 1999), la ocular (Miller *et al.*, 1982; Saettone *et al.*, 1988; Desai *et al.*, 1998; Lemp *et al.*, 1973; Habib *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2000, Edsmán *et al.*, 1998) y también por la vía parenteral (Koller *et al.*, 1987). Además, se ha encontrado que el PF-127 puede potencialmente actuar como piel artificial (DiBiase *et al.*, 1996).

En años recientes el uso del PF-127 ha sido particularmente importante en el diseño de sistemas de liberación tópicos y transdérmicos, ya sea promoviendo o retardando la permeación de un fármaco a través de la piel, teniendo en mente que para sistemas de liberación tópica, la acumulación del fármaco en la piel con una mínima permeación es lo más deseable, mientras que para los sistemas de liberación transdérmicos se prefiere el comportamiento contrario.

2.8.2 Características y Propiedades del PF-127

El PF-127 es un gel y también un tensoactivo no iónico compuesto de óxido de etileno y óxido de propileno en un intervalo de concentración del 20 al 30%. En general, los poloxámeros están constituidos de gránulos blancos y cerosos de libre flujo que son prácticamente inodoros e insípidos (Loyd *et al.*, 1994). A concentraciones bajas (10^{-4} – 10^{-5} %) forman micelas monomoleculares pero a concentraciones elevadas el resultado es la obtención de agregados multimoleculares formados por un núcleo central con sus cadenas hidrofílicas polioxietilénicas expuestas al medio externo (Guzmán *et al.*, 1994). La micelización ocurre en soluciones diluidas de copolímero de bloque y en solventes selectos por arriba de la concentración micelar crítica (cmc) a una temperatura dada. A concentraciones elevadas arriba de la concentración de gelificación crítica (cgc), las micelas pueden ordenarse en forma de red y como consecuencia incrementar la viscosidad del medio. Estos pasajes en la formación de las micelas y la red micelar se muestran en la figura 6 (Hamley, 1998).

Las soluciones acuosas de poloxámeros son estables en presencia de ácidos, bases e iones metálicos. Los poloxámeros más comúnmente utilizados incluyen al 124 (grado L-44), el 188 (grado F-68), el 237 (grado F-87), el 338 (grado F-108) y el 407 (grado F-127), los cuales son solubles en agua. La designación “F” en cada uno se refiere a su forma de hojuela. PF-127 tiene una muy buena capacidad solubilizante, baja toxicidad y además, se le considera como un buen medio para sistemas tópicos de liberación.

PF-127 es un copolímero con una arquitectura llamada de tres bloques de polioxietileno-polioxipropileno (Fig. 7), comercialmente disponible con una fórmula general $E_{106} P_{70} E_{106}$ y una masa molar promedio de 13,000 (Miyazaki *et al.*, 1995; Hecht *et al.*, 1994). Este contiene aproximadamente un 70% de óxido de etileno, que le confiere las características de hidrofiliidad (Schmolka *et al.*, 1972; 1974; Lunsted *et al.*, 1972). La fórmula química del PF-127 se muestra en la figura 8.

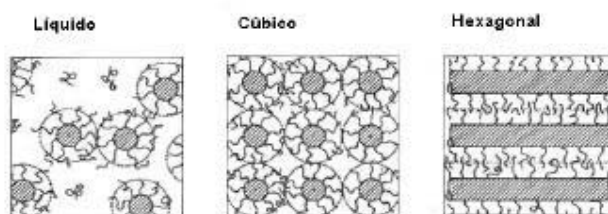


Figura 6. En este esquema podemos apreciar los diferentes arreglos que puede presentar el PF-127 al irse incrementando la temperatura.

Este polímero se produce por la condensación de óxido de etileno y óxido de propileno (Lundsted *et al.*, 1972). El PF-127 es más soluble en agua fría que en agua caliente, como resultado de un incremento en la solvatación y de la formación de puentes de hidrógeno a bajas temperaturas (Gilbert *et al.*, 1986). Soluciones acuosas en un intervalo de concentraciones entre el 20 y 30% p/p poseen una característica que las hace peculiares y es la de presentar gelación térmica reversa (Miyazaki *et al.*, 1984; Lenaerts *et al.*, 1987), es decir, las soluciones en ese intervalo de concentraciones son líquidas a temperaturas entre 4 y 5° C, pero la formación de un gel se observa a temperatura ambiente (Jorgensen *et al.*, 1997). Este proceso en el que se forma el gel es reversible al enfriar el gel.

A bajas temperaturas en soluciones acuosas, las moléculas de PF-127 son rodeadas por una capa de hidratación. Sin embargo, cuando la temperatura se incrementa, las cadenas hidrofílicas del copolímero se desolvatan como resultado del rompimiento de los puentes de hidrógeno que habían sido establecidas entre el solvente y estas cadenas etilénicas. Este fenómeno favorece las interacciones hidrofóbicas entre la región propilénica, lo que generará la formación del gel. Debido a este proceso de deshidratación, los grupos hidroxilo se vuelven más accesibles (Miller *et al.*, 1984; Attwood *et al.*, 1985). Se piensa que el gel es de naturaleza micelar. Un líquido en fase micelar es estable a bajas temperaturas, y es transformado en un arreglo cúbico si se incrementa la temperatura (Chen-Chow *et al.*, 1980), para finalmente formar una fase de cilindros hexagonales a temperaturas elevadas (Fig. 6). Estos compuestos forman micelas generando líquidos liotrópicos de fases cristalinas (Schmolka, 1977; Almgren *et al.*, 1992). Determinaciones ultrasónicas (Rassing *et al.*, 1972; Zhou *et al.*, 1988; Yu *et al.*, 1992), mediante resonancia magnética nuclear (RMN) (Rassing *et al.*, 1976; Malmsten *et al.*,

1992) reología (Brown *et al.*, 1992) y el uso de fluorescencia (Almgren *et al.*, 1991) han sido capaces de mostrar el rearrreglo de estos copolímeros de bloque.

El fenómeno de gelación térmica reversa y su baja toxicidad (Henry *et al.*, 1989) han sido las bases para investigar el uso del PF-127 como un posible sistema de liberación de fármacos (Gilbert *et al.*, 1987). El PF-127 ha sido considerado para la liberación tópica de lidocaína (Chen-Chow *et al.*, 1981), de agentes anticancerígenos (Miyazaki *et al.*, 1984, 1986), y como recubrimientos en la piel asociados a heridas por quemaduras (Nalbandian *et al.*, 1972). Investigaciones para administrar pilocarpina por vía oftálmica empleando al PF-127 como vehículo (Miller *et al.*, 1982). Finalmente, PF-127 ha sido estudiado también como un vehículo potencial para inyectables por vía intramuscular y subcutánea (Hadgraft *et al.*, 1982; Collet *et al.*, 1985).

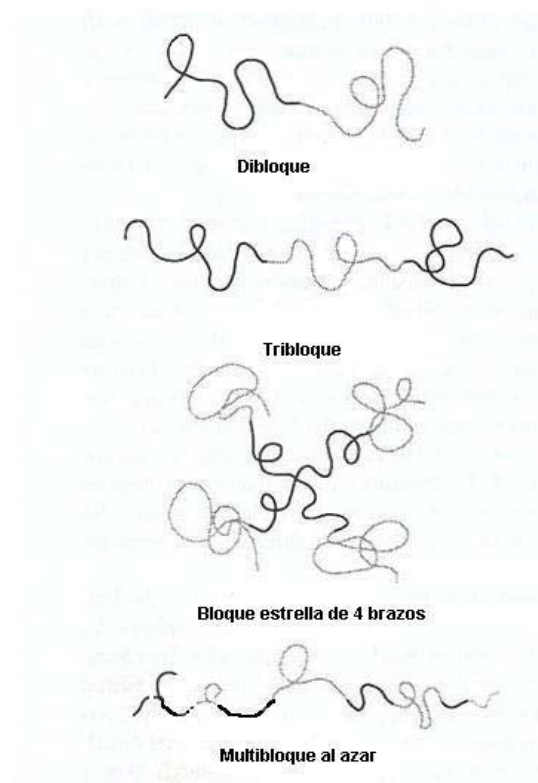


Figura 7. Arquitecturas de diferentes copolímeros, se puede apreciar que el PF-127 es un copolímero de tres bloques.

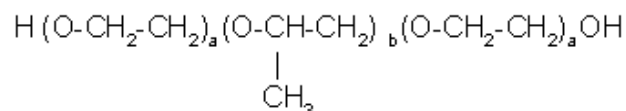


Figura 8. Formula del PF-127. En ella se puede apreciar claramente las regiones etilénicas (a) y la porción central propilénica (b).

El PF-127 es de interés particular dentro del ramo farmacéutico debido a que soluciones concentradas (>20% p/p) de copolímero son transformadas de soluciones transparentes de baja viscosidad a geles sólidos al ser calentados por la temperatura corporal. Este comportamiento de gelación térmica reversa de soluciones diluídas y concentradas ha sido estudiado ampliamente (Jorgensen *et al.*, 1997; Cabana *et al.*, 1997; Jain *et al.*, 1998; Bohorquez *et al.*, 1999). Este fenómeno sugiere que cuando se coloca el PF-127 en la piel o ya sea inyectado en alguna cavidad del cuerpo, este formará una barrera sólida artificial y un reservorio de liberación sostenida. Además, PF-127 está descrito como el copolímero de menor toxicidad disponible en el mercado. (Gilbert *et al.*, 1986).

2.8.3 Aplicaciones del PF-127 en formulaciones farmacéuticas

Las características de termorreversibilidad y prometedor sistema de liberación de fármacos, hace al PF-127 un atractivo candidato como vehículo farmacéutico para sistemas de liberación tópica y transdérmica. Estas propiedades se destacan en el cuadro 7, el cual resume todas las investigaciones realizadas en el ramo farmacéutico con el PF-127 como un vehículo para formulaciones administradas por las diferentes vías de administración.

Cuadro 7. Investigaciones realizadas con el copolímero de tres bloques PF-127 en formulaciones farmacéuticas.

Autor (Ref.)	Investigación	Resultados	Año
Miyazaki, <i>et al.</i>	Indometacina y agentes anticancerígenos, (adriamicina, 5-fluorouracilo), y mitomicina C formulados en PF127.	Se determinó que el PF-127 es un buen vehículo para la administración rectal y tópica de indometacina, además de ser excelente para la liberación sostenida de mitomicina-C y 5-fluorouracilo.	1984 1986 1995

Nalbadian, <i>et al.</i>	Uso del PF-127 en quemaduras térmicas de tercer grado.	Acelerada velocidad de sanación.	1987
Lenaerts, <i>et al.</i>	Estudio reológico del PF-127	Relación exponencial entre la temperatura y la viscosidad.	1987
Di Biase, <i>et al.</i>	FCE en PF-127.	Posible desarrollar un producto tópico que contenga FCE.	1991 1996
Paustin, <i>et al.</i>	Uso de PF-127 administrado intravenosamente en ratas para sanar heridas por quemaduras.	La piel se observa marcadamente menos dañada al usar el PF-127.	1993
Chi, <i>et al.</i>	Gel transdermal a base de PF-127 con poder antiinflamatorio y analgésico.	Prolongada actividad antiinflamatoria y analgésica por su uso.	1994
Barichello, <i>et al.</i>	Uso de geles de PF-127 y de nanopartículas de ácido poliláctico-co-glicólico y la combinación de ellos para la liberación parenteral de péptidos y proteínas con tiempos de vida media cortos, usando la insulina como modelo de péptido.	Las formulaciones de geles de PF127 conteniendo únicamente al fármaco o a las nanopartículas con el fármaco resultaron útiles para la preparación de sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas con tiempos de vida media cortos.	1999
Bentley, <i>et al.</i>	Influencia de la lecitina las propiedades de permeación y reología del gel.	La presencia de lecitina en el gel de PF-127 genera retención en la piel de fármacos lipofílicos.	1999

Kattan, <i>et al.</i>	Efecto de 4 terpenos sobre la permeación percutánea de ketoprofeno	El incremento más grande en cuanto a permeación de ketoprofeno a través de la piel se observó con el uso del limoneno y posteriormente con nerolidol, fenchone y timol.	2000
Liaw, <i>et al.</i>	PF-127 como vehículo para la liberación percutánea de fentanilo.	PF-127 es útil para la liberación percutánea de fentanilo.	2000
Eurokova, <i>et al.</i>	Efecto del PF-127 sobre la permeación a través de membranas de bicapas lipídicas probando ácidos y bases débiles.	El PF-127 facilita la permeación de moléculas grandes a través de bicapas lipídicas.	2000
Kadar, <i>et al.</i>	Tratamiento de heridas en la piel causadas por mostazas sulfúricas con antagonistas de calmodulina, usando como modelo animal piel de cerdo.	La aplicación tópica de bases oleosas con Pluronic conteniendo lidocaína o pentamida, producen efectos benéficos cuando son aplicadas inmediatamente después de tiempos de exposición cortos en piel de cerdo a mostazas sulfúricas.	2000
Desai, <i>et al.</i>	Sistema particulado, biodegradable y coloidal de pilocarpina para incorporación en un sistema de liberación de PF-127 y evaluación de la habilidad de este gel para prolongar la liberación de pilocarpina.	Las nanopartículas obtenidas de pilocarpina dispersadas en el gel de PF-127 fueron adecuadas para una liberación prolongada de activo	2000

Hokket, <i>et al.</i>	Estudio de la velocidad de unión y propagación del fibroblasto gingival humano por uso de PF-127.	PF-127 es benéfico en procesos de sanación de heridas postoperatorias.	2000
Paavola, <i>et al.</i>	Dosis única y de acción prolongada de gel de ibuprofeno para disminuir el dolor epidural, usando un sistema liposomal para controlar la liberación de ibuprofeno <i>in vitro</i> .	El gel liposomal controló la liberación dural de ibuprofeno y permeación <i>in vitro</i> , mostrando patrones favorables para el mantenimiento de niveles constantes de fármaco.	2000
Wang, <i>et al.</i>	Absorción <i>in vitro e in vivo</i> de capsaicin y nonivamida a partir de hidrogeles.	Hubo una correlación media entre los estudios de permeación <i>in vitro</i> y la respuesta eritemática <i>in vivo</i> de la aplicación tópica de capsaicin y nonivamida.	2001
Shin, <i>et al.</i>	Efecto de tensoactivos no iónicos como promotores de penetración sobre la permeación de piroxicam formulada en geles de poloxamer a través de piel de rata.	La piel mostró que se genera un ensanchamiento en los espacios intercelulares de los lípidos de la barrera de permeabilidad del estrato corneo incrementando la permeabilidad del piroxicam por efecto de los tensoactivos	2001
Morishita, <i>et al.</i>	Perfiles de liberación de insulina a partir de geles de PF-127 conteniendo ácidos grasos y efecto hipoglicemiante de la insulina seguida de la administración bucal de los geles formulados en ratas.	Los geles de PF-127 que contenían ácidos grasos insaturados son formulaciones potenciales para la liberación bucal de insulina.	2001
Charreaue, <i>et al.</i>	Geles termoreversibles de PF-1272 para la administración rectal de ácidos grasos de cadena corta.	El gel de PF-127 preparado al 18% (p/v) generó una solución líquida a temperatura ambiente que gelificó a 37°C y ofreció la mejor liberación de los ácidos grasos.	2001

Westerink, <i>et al.</i>	Efecto de la administración mucosal de TT en presencia de PF-127 con quitosan sobre la respuesta inmune mucosal.	PF-127/kitosan representa un nuevo sistema de liberación mucosal para vacunas.	2001
Xia, <i>et al.</i>	Estudio experimental de ingeniería de tejidos cartilagosos mediante el uso de una solución inyectable de poloxamero.	El cartilago puede ser generado con el uso del poloxámero y de ingeniería de tejidos, con características histológicas muy similares a las de cartilago natural.	2001
Fang, <i>et al.</i>	Aplicación tópica <i>in vitro</i> y evaluación farmacodinámica <i>in vivo</i> de hidrogeles de nonivamida usando ratas Wistar como modelo animal.	La nonivamida formulada en hidrogeles liberó más fármaco a través de la piel, además de producir una actividad farmacodinámica mayor comparada con capsaicin formulada a base de cremas.	2002
Amiji, <i>et al.</i>	Desarrollo de una formulación con gelación térmica reversa de PF-127 conteniendo paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb).	Incremento significativo en la eficacia antitumoral se observó después de la aplicación intratumoral de paclitaxel en PF-127. El crecimiento tumoral se disminuyó en un 67%.	2002
Zhang, <i>et al.</i>	Desarrollo y evaluación <i>in vitro</i> de liberación sostenida de ceftiofur formulado en geles de PF-127.	La velocidad de liberación del ceftiofur esta controlada por la disolución en el PF-127.	2002
Fowler, <i>et al.</i>	Efectos <i>in vivo</i> de Pluronicos combinados con injertos en la sanación de defectos críticos en la talla de huesos.	Los Pluronicos pueden ser considerados como acarreadores para materiales para injertos óseos.	2002

Bourre, <i>et al.</i>	Eficacia de un gel termoreversible con AAL para su uso en la terapia fotodinámica de lesiones en el tracto gastrointestinal.	El AAL formulado en geles de PF-127 es una formulación útil en el tratamiento de “Esofago de Barret”, ya que permite una buena adhesión en el esófago con una difusión eficiente dentro de la mucosa tratada.	2002
Kim, <i>et al.</i>	Complejo β -CD-FCE/HP en gel de poloxamer para la liberación oftálmica.	FCE pudo ser retenido en el área precorneal por tiempos prolongados, pudiendo ser útil para el desarrollo de una liberación oftálmica efectiva.	2002
Kabanov, <i>et al.</i>	Estudios clínicos en fase I usando modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para una formulación que contiene doxorubicina y una mezcla de poloxameros (L61 y F127).	Sensibilización drástica de tumores al usar el gel, con respecto a el uso de varios agentes anticancerígenos.	2002
Nair, <i>et al.</i>	Gel de poloxámero como vehículo para la liberación transdérmica iontoforética de vasopresina: Evaluación <i>in vivo</i> en ratas.	Estudios farmacodinámicos y farmacocinéticos enfatizan que la liberación de vasopresina mediante iontoforesis es más rápida	2003
Pillai, <i>et al.</i>	Liberación transdérmica de insulina de un gel de poloxamer: Estudios de penetración <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> a través de piel de rata, usando iontoforesis y promotores de penetración.	El ácido linoléico y mentona en combinación con la iontoforesis mostraron un efecto sinérgico en cuanto a la permeación de insulina.	2003
Moghimi.	Modulación de la distribución linfática de nanoesferas cubiertas con PF-127 inyectadas subcutáneamente: Efecto de la configuración de la cadena de óxido de etileno.	La distribución linfática de las nanoesferas inyectadas es controlada por la configuración superficial del óxido de etileno (configuración de hongo).	2003

Wenzel, <i>et al.</i>	Formulación de deslorelina y GnRH en geles de PF-127 para su aplicación en ganados.	Los geles de PF127 formulados pueden generar liberación sostenida de péptido y reduce la degradación del mismo.	2003
Veyries, <i>et al.</i>	Control de la adhesión de estafilococos al polimetilmetacrilato e incremento a la susceptibilidad a antibióticos por uso de PF-127.	La combinación de PF-127 con antibiótico puede prevenir infecciones ocasionadas por material extraño.	2003
Fawaz, <i>et al.</i>	Desarrollo y evaluación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> en conejos, de dos formulaciones pediátricas rectales de quinina para el tratamiento de la malaria.	La biodisponibilidad de la quinina de los geles mucoadhesivos con PF-127 fue mayor.	2004
Escobar-Chávez <i>et al.</i>	Efecto de azone [®] y transcuto [®] sobre la permeación a través de piel humana de naproxeno sódico formulado en geles de PF-127.	La combinación de azone [®] y transcuto [®] en geles de PF-127 promueve en mayor grado la penetración de naproxeno sódico a través de la piel con incrementos hasta dos veces mayores con respecto a una formulación de naproxeno sódico que únicamente contenía transcuto [®] .	2005

Abreviaturas:

(PF-127), Pluronic F-127, (FCE) Factor de crecimiento epidermal, (CD); Ciclodextrina, (ATC), Acetonido de triamcinolona, (AAL) Ácido aminolevulínico, (TT) Toxoide tetánico

Las propiedades micelares y de gelación térmica reversa han permitido la generación de formulaciones para prácticamente todas las vías de administración de fármacos (cuadro 7), generando sistemas de adecuada solubilidad y con una adecuada liberación. La administración de estos geles en estado líquido los hace de fácil aplicación, permitiendo un contacto íntimo entre la preparación y el tejido biológico antes de la formación de un gel no oclusivo al incrementarse la temperatura. Este fenómeno de gelación térmica reversa es capaz de generar un depósito de fármaco con una prolongada acción farmacológica.

2.9 MÉTODOS PARA CUANTIFICAR FÁRMACOS A TRAVÉS DE LA PIEL

El concepto de que la piel es una membrana pasiva ha llevado al estudio de la absorción percutánea mediante leyes de acción de masas y de difusión física. Es por ello que esto ha permitido que los investigadores utilicen cortes de piel de cadáveres humanos y de animales que pueden ser aislados física y químicamente para obtener cortes muy delgados de piel y de esta manera determinar la difusión química a través de estos tejidos tratados. De ahí que los métodos disponibles para poder evaluar la absorción percutánea se clasifiquen dentro de dos grupos: los métodos *in vivo* y los métodos *in vitro*.

2.9.1 Métodos *in vivo*

A. Radiactividad en excreciones

La absorción percutánea *in vivo* es usualmente determinada mediante el método indirecto de medición de la radiactividad en excreciones después de la aplicación tópica del compuesto marcado. En estudios en humanos los niveles plasmáticos del compuesto son extremadamente bajos después de la aplicación tópica, normalmente muy por debajo de los niveles de detección para el ensayo, por lo que es necesario utilizar una metodología de marcado. El compuesto, normalmente es marcado con ^{14}C o tritio, es aplicado y la cantidad total de radiactividad excretada en orina y heces fecales es determinada. La cantidad de radiactividad retenida en el cuerpo o excretada por otra vía no analizada (CO_2 , sudor) es corregida determinando la cantidad de radiactividad excretada después de la administración parenteral. La cantidad final de radiactividad es entonces expresada como el porcentaje de la dosis aplicada que fue absorbida (Feldmann y Maibach, 1969, 1970, 1974).

La ecuación utilizada para determinar la absorción percutánea es:

$$\% = \frac{\text{Radiactividad total después de la administración tópica} \times 100}{\text{Radiactividad total después de la administración parenteral}}$$

La limitación en determinar la absorción percutánea de la radiactividad urinaria y fecal, o de ambos, es que la metodología no considera el metabolismo que ocurre en la piel. La radiactividad en la orina es una mezcla del compuesto de interés y sus metabolitos. Este tipo de información es útil en definir la disposición total de la dosis aplicada tópicamente.

B. Radiactividad en sangre

La radiactividad en plasma puede ser medida y determinarse la absorción percutánea por relación de las áreas bajo la curva (AUC) del perfil de concentraciones plasmáticas en función del tiempo seguido tópicamente y de una administración intravenosa (Wester y Noonan, 1978). Algo importante a resaltar en este tipo de estudios es que tanto el compuesto aplicado y metabolitos pueden ser determinados. Este método ha generado resultados similares a aquellos obtenidos por excreción urinaria (Werster *et al.*, 1983).

C. Recobro de la Superficie

En este método se determina la pérdida de material de la superficie, así como de la que penetra a través de la piel. El recobro de un activo en un aceite o solución aplicado es difícil debido a que la cantidad total del activo aplicado en dicho vehículo nunca puede determinarse con seguridad. Por ello con la aplicación tópica o transdérmica a través de un dispositivo, permite que este pueda ser removido de la piel y por tanto la cantidad residual de activo en dicho dispositivo pueda ser determinada. Se asume que la diferencia entre la dosis aplicada y la dosis residual es la cantidad de fármaco absorbido.

D. Desaparición de la Superficie

Similar al método de recobro en la superficie, en éste es posible monitorear la desaparición de C_{14} de la superficie de la piel usando la instrumentación adecuada. La limitación de este método radica en el hecho de que la desaparición es debida al movimiento del C_{14} marcado químicamente que va al interior de la piel y al efecto de rebote de los rayos β al incidir en la piel y regresar al instrumento.

E. Método del Tape stripping

Mediante este método se determina la concentración del activo en el estrato córneo, después de períodos cortos de aplicación y por extrapolación lineal se puede predecir la absorción percutánea de un activo para períodos largos de aplicación. La formulación es aplicada sobre la piel de animales o humanos, y después del tiempo de aplicación, el estrato córneo es removido mediante la aplicación sucesiva de cintas adhesivas y remoción de las mismas (Fig. 9). El activo es extraído de las cintas adhesivas, mediante el uso de solventes para su posterior cuantificación mediante algún método analítico (Escobar-Chávez *et al.*, 2005). Rougier, Lotte y colaboradores (1983; 1986) han establecido la existencia de una relación lineal entre el contenido de activo en el estrato córneo y la absorción percutánea usando el método de excreción urinaria. Las ventajas de este método son:

- a) La eliminación de la excreción urinaria (y fecal) para determinar la absorción y,

- b) El hecho de no utilizar marcadores radiactivos para determinar la absorción de un activo a través de la piel, debido a que las cintas adhesivas removidas contienen concentraciones adecuadas que permiten ser cuantificadas sin necesidad de marcadores radiactivos.

F. Biodisponibilidad tópica absoluta

El único medio para determinar la biodisponibilidad absoluta de un activo aplicado tópicamente, es precisamente el medirlo en sangre u orina después de una aplicación intravenosa. Esto es extremadamente difícil de hacer en plasma dado que las concentraciones después de la administración tópica son muy bajas. Sin embargo, avances en la metodología analítica han ido generando ensayos con una mayor sensibilidad, haciendo que la biodisponibilidad tópica pueda llegar a ser determinada

G. Biodisponibilidad en tiempo real *in vivo*

Ahora es posible determinar la biodisponibilidad tópica de un activo tan pronto como sea posible, al obtener mediciones mediante un espectrómetro de masas, cada cuatro segundos en un sujeto.

Este método determina la biodisponibilidad de solventes orgánicos después de ser expuesta la piel a ellos. El análisis de la respiración es usado para obtener mediciones en tiempo real de compuestos orgánicos volátiles en el aire expirado. El sistema usa un espectrómetro de masas equipado.

2.9.2 Métodos *in vitro*

Los métodos de absorción percutánea *in vitro* han sido ampliamente utilizados para medir la absorción de un activo que está en contacto con la piel. Evaluaciones de seguridad y de toxicidad química frecuentemente son efectuadas mediante estudios *in vitro* para obtener datos de permeación. **Datos obtenidos de animales** para estimar la absorción en humanos deben ser usados cautelosamente debido a las diferencias en las propiedades de barrera de permeabilidad de la piel existentes entre animales y humanos (Bronaugh *et al.*, 1982).

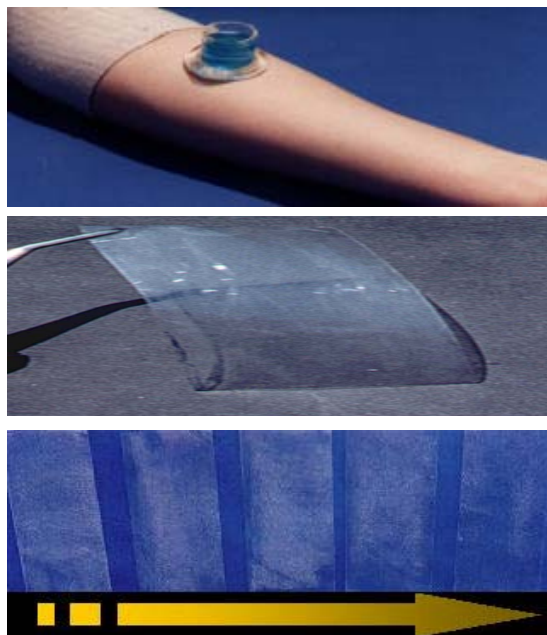


Figura 9. Técnica del *tape stripping*. Una vez aplicada la formulación y pasado el tiempo de contacto, se procede a la remoción de cintas adhesivas para posterior tratamiento y cuantificación del activo.

Estudios de absorción *in vitro* también son usados para medir el metabolismo si piel viable es obtenida para el estudio y si la disponibilidad es mantenida en las *celdas de difusión* (Collier *et al.*, 1989). Los sistemas *in vitro* permiten el aislamiento de la piel de forma tal que el metabolismo del órgano puede ser distinguido del metabolismo sistémico.

Las consideraciones más importantes a tomarse en cuenta para la realización de estudios de absorción percutánea *in vitro* se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 8. Información a considerar para evaluar la absorción percutánea *in vitro* "

Parámetros	Consideraciones
Ensayos del compuesto	Pureza, propiedades fisicoquímicas, características de posibles impurezas
Vehículo	Disolvente o formulación usada para la prueba de liberación de la sustancia
Tipo de celda	Diseño, material de construcción, solución receptora, flujo de celda
Condiciones de exposición	Volumen, duración de contacto, naturaleza oclusiva del compartimiento donador
Piel o membrana	Fuente, procedimientos de separación, almacenamiento, capacidad metabólica, temperatura de la superficie

Solución del receptor	Identidad, propiedades, solubilidad del activo
Procedimiento terminal	Enjuague de la piel, extracción de la sustancia, preparación para el análisis
Procedimiento analítico	Métodos usados para determinar la concentración del activo en los compartimientos donador y receptor
Resultados	Tablas que muestren los datos de las celdas individualmente, sobre la cantidad penetrada por unidad de área, graficas que muestren los cambios del flujo en función del tiempo.

^a(Howes et al, 1994)

III. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

De la necesidad de incluir promotores de tipo químico (agentes promotores de penetración o absorción) o bien de utilizar un medio físico (e.g., iontoforesis), para favorecer el paso de fármacos hacia y a través de la piel, surge la idea de este trabajo. Por un lado, el estudio de la penetración *in vivo* de naproxeno sódico formulado en geles de pluronic F-127, incluyendo transcuto[®] y azona[®] como promotores de penetración; y por otro lado, la evaluación de la penetración *in vitro* e *in vivo* de digluconato de clorhexidina mediante iontoforesis.

El naproxeno sódico es la sal de un potente fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) utilizado para una gran variedad de problemas inflamatorios. Al igual que otros AINEs, el efecto secundario más común es la irritación gastrointestinal. Por ello, la posibilidad de liberar naproxeno sódico a través de la piel para inflamaciones locales es apremiante. Para ello, son necesarios, el uso de agentes promotores de penetración y de adecuados vehículos. Por que sin ellos, sólo muy pequeñas cantidades de naproxeno pasan a través de la piel (Van den Ouweland *et al.*, 1989, Valjakka-Koskela *et al.*, 1998).

De esta manera, la combinación de fármacos AINEs como el naproxeno sódico, con azona[®] y transcuto[®] ofrecen una alternativa interesante para producir un producto farmacéutico por vía tópica más efectivo.

El efecto de las formulaciones se evaluó a nivel molecular (mediante estudios de IRTF/RTA) y a nivel macromolecular mediante determinaciones de pérdida de agua transepidermal (TEWL), esto corresponde al uso de mecanismos de tipo químico para favorecer la penetración de un fármaco a través de la piel.

Por otro lado, el digluconato de clorhexina (DGC) es una bisbiguanida, que es activa contra una gran cantidad de bacterias gram positivas y negativas, hongos y virus. Es uno de los agentes antimicrobianos más ampliamente usados para desinfección rutinaria de la piel previa a la realización de algún proceso invasivo, como es la inserción de un catéter intravascular (CIV).

Algunos estudios han demostrado, que muchos agentes antimicrobianos de uso tópico efectivamente eliminan la microflora presente en la superficie de la piel, sin embargo muchos de ellos son incapaces de eliminar los microorganismos presentes en capas profundas de la piel, permitiendo entonces que se generen reservorios de microorganismos que continúen actuando como fuentes potenciales que generarán un proceso infeccioso durante la inserción de algún aditamento como lo es, un CIV. De forma tal que el implemento de alternativas más eficientes para desinfección de la piel son de suma importancia.

El DGC es presentado a la piel como una entidad química con carga, por lo que es clara la necesidad de desarrollar alguna estrategia que permita promover su paso a través del EC. Por ello la iontoforesis es la alternativa viable que permitirá el transporte de sustancias iónicas y de peso molecular elevado a través de la piel mediante la aplicación de corriente eléctrica fisiológicamente tolerable a la piel. Por esta razón se evaluó la penetración de DGC *in vitro* (piel de orejas de cerdo) e *in vivo* (antebrazo de voluntarios sanos) mediante iontoforesis comparándola con la liberación pasiva de la misma, así como demostrar mediante el uso de la

técnica del “*tape stripping*” la presencia de microorganismos presentes en capas profundas de EC, que potencialmente pueden generar infecciones asociadas al uso de CIV, lo cual se ha convertido en un serio problema de salud pública que se ha extendido en todo el mundo. Todo esto fue posible realizarlo basándose en los siguientes supuestos o hipótesis:

Uso de promotores de penetración (azona[®] y transcutol[®])

- ?? Dado que el transcutol[®] y la azona[®] actúan por diferentes mecanismos (uno por co-difusión y el otro por fluidización de los lípidos intercelulares) alterando la barrera de permeabilidad, se asume que al combinarlos puede lograrse un efecto sinérgico y por lo tanto una mayor penetración de naproxeno sódico a través de la piel, lo que se manifestará como un incremento en la pérdida de agua transepidermal (TEWL) y desplazamientos hacia frecuencias mayores de los picos correspondientes a los lípidos del EC para el caso de los infarrosos de la piel.

Uso de un mecanismo de tipo físico (iontoforésis)

- ?? Debido a que la iontoforésis favorece el paso de moléculas grandes y cargadas a través de la piel como el DGC, la aplicación de ésta mediante este mecanismo permitirá una mejor antisepsia de la piel, al penetrar a capas más profundas de piel comparada con la aplicación pasiva de la misma.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

- ?? Evaluar el efecto de **promotores de penetración químicos y físicos**, sobre la penetración de sustancias a través de la piel *in vivo e in vitro*.

Objetivos Particulares:

- Uso de promotores de penetración química (transcutol[®] y azona[®])
 - ?? Formular naproxeno sódico en geles de pluronic F-127 incluyendo promotores de penetración, en proporciones tales, que se favorezca la penetración a través de la piel a partir de un vehículo de viscosidad adecuada.
 - ?? Evaluar el grado de penetración *in vivo* a través de la piel, de naproxeno sódico formulado en geles de PF-127 mediante cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC), utilizando la técnica del “*tape stripping*” en voluntarios sanos.
 - ?? Determinar cual es la formulación que favorece en mayor grado la penetración de naproxeno sódico por piel.

- Uso de iontoforesis como mecanismo para la penetración a través de la piel.
 - ?? Demostrar la presencia de microorganismos en capas profundas de EC, los cuales pueden potencialmente generar infecciones asociadas al uso de catéteres intravasculares (ISACi).
 - ?? Comparar la liberación pasiva e intoforética de DGC a través de la piel *in vitro e in vivo*.
 - ?? Investigar la eficacia antimicrobiana y duración de la actividad de DGC en capas profundas de la piel.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MATERIALES

5.1.1 Reactivos

Este proyecto de investigación se realizó empleando reactivos de grado analítico que cumplen con especificaciones ACS y son los siguientes:

- ?? Naproxeno sódico (Donado por Syntex, México)
- ?? Azona[®] (Whitby Research, Inc.-Richmond, USA)
- ?? Transcutol[®] (Gattefossé, donado por Multiquim, México)
- ?? Acetona (Fermont, México)
- ?? Acetato de Etilo (Grado HPLC-Fermont, México)
- ?? Agua destilada de calidad Mili-Q (Millipore Inc., Bedford, USA)
- ?? Digluconato de Clorhexidina 20% (Sigma, USA)
- ?? Hibitane[®] (Zeneca, Bélgica)
- ?? Acetonitrilo (Aldrich, Alemania)
- ?? Heptansulfonato de sodio (Fisher chemicals, Reino Unido),
- ?? Trietilamina (Aldrich, Alemania)
- ?? Ácido Fosfórico (Aldrich, Alemania)
- ?? Agua estéril (Laboratorios AES, Francia)
- ?? Alcohol etílico (Aldrich, Alemania)
- ?? Triton X (Sigma, USA)
- ?? Fosfato monoácido de potasio (JT Baker, Alemania)
- ?? Fosfato dibásico de potasio (JT Baker, Alemania)

5.1.2. Material

- ?? Celdas de perfusión de vidrio con un área superficial de 12.56 cm²
- ?? Cámara cromatográfica (CAMAG, Suiza)
- ?? Hisopos estériles (Innovaciones Copan, Italia)
- ?? Platos de contacto (Laboratorios AES, Francia)
- ?? Cinta adhesiva Scotch[®] No. 845 (3M, USA)
- ?? Gasa estéril (Derma Plast[?], Suiza)
- ?? Recubrimiento estéril Medipore[?] +Pad (3M, USA)

5.1.3 Equipos

- **Tewameter TM[®] 210**, Courage-Khazaka (Colonia, Alemania)
- **Infrarrojo de transformadas de Fourier con celdas de ATR**. FTIR-8300. Contiene un cristal ATR de forma trapezoidal de 80 ? 10 ? 4 mm. Con un ángulo de corte de 45°, una resolución de 1 y con una sensibilidad del aparato de 0.1 unidades (Shimadzu, Japón).
- **Aplicador Automatico III** Versión 2.12 para cromatografía en capa fina de alta resolución (CAMAG, Suiza).
- **Scanner 3 y software CATS** Versión 4.06 para cromatografía en capa fina de alta resolución (CAMAG, Suiza).
- **Viscosímetro Digital CAP 2000** con un intervalo para temperaturas entre 10-40°C y aguja circular No. 1 (Brookfield, USA).
- **HPLC**
- **Foresor** (Iomed, USA) conectado a electrodos TransQE TM (Iomed, USA) (Fig. 10).

5.1.4 Material Biológico

En lo que se refiere a los voluntarios para los estudios de penetración realizados *in vivo* con los **promotores de penetración químicos** (transcutol[®] y azona[®]) para el caso del naproxeno sódico formulado en geles de PF-127, se evaluaron seis voluntarios (hombres y mujeres entre 23 y 30 años de edad) sin enfermedad alguna y sin antecedentes de alergias o patologías en piel y que mantuviesen los sitios de aplicación (porción interna de antebrazo derecho e izquierdo) libres de aplicación de medicamento de uso tópico o transdérmico, así como cosmético por lo menos una semana después de iniciado el estudio.

Para el caso de los estudios de penetración *in vivo* de clorhexidina a través de la piel por **iontoforesis** se evaluó en tres voluntarios sanos (2 hombres y una mujer entre 25 y 35 años de edad) sin antecedentes de enfermedades en la piel.

Para los estudios microbiológicos y de penetración *in vitro* para clorhexidina mediante iontoforesis se utilizó piel de oreja de cerdo, obtenida de animales recién sacrificados en el rastro.

Todos los estudios *in vivo* se realizaron con previo consentimiento escrito de los voluntarios, a los que se les dio a conocer previamente el protocolo.

5.2 FORMULACIONES EVALUADAS

a) Uso de agentes promotores de la penetración (azona[®] y transcuto[®])



Fig. 10 Foresor (Iomed, USA) y electrodos TransQE[™]

Naproxeno sódico formulado en geles de PF-127

Los geles fueron preparados usando el método en frío descrito por Schmolka (1972). Se pesó la cantidad requerida de PF-127 para prepararlo al 27% (p/v) y se adicionó al volumen requerido de agua fría manteniéndose con agitación mecánica suave. Se dejó dispersar e hidratar perfectamente el PF-127 por un periodo de 12 horas a 4°C. Una vez garantizada la completa disolución del copolímero, las cantidades apropiadas del gel de PF-127, transcutoI[®], o la mezcla azona[®]/transcutoI[®] y el naproxeno sódico (3% p/v) fueron mezcladas bajo agitación mecánica suave. Finalmente, la mezcla se mantuvo durante 24 horas a temperatura ambiente para facilitar la completa disolución de los solutos.

El cuadro 9 muestra los geles formulados (todos ellos conteniendo naproxeno sódico al 3% p/v). El porcentaje de PF-127 fue ajustado de manera tal que los valores de viscosidad de las formulaciones fueran similares en el intervalo de temperatura de 25-37°C. Los valores de pH de las formulaciones se ubicaron entre 6.1-7.5, asegurando que el naproxeno sódico estaba completamente ionizado (pKa = 4.2). No fue posible preparar una formulación que únicamente tuviera azona[®] como promotor de penetración, debido su naturaleza altamente lipofílica. Sin embargo, una vez que la azona[®] fue disuelta completamente en el transcutoI[®], esta mezcla fue fácilmente incorporada al gel de PF-127. Los geles obtenidos fueron sistemas homogéneos completamente transparentes.

Cuadro 9. Composición de las formulaciones de naproxeno sódico en geles de PF-127 incluyendo promotores de penetración (transcutoI[®] y transcutoI[®]/azona[®])

Componentes	Concentración (% v/v)		
	Formulación I	Formulación II	Formulación III
PF-127 (27%)	100	75.2	73.5
TranscutoI [®]	---	24.8	24.8
Azona [®]	---	---	1.7

b) Uso de iontoforesis

Preparación de soluciones antisépticas

Se prepararon soluciones de DGC al 0.1%, 0.5% and 1% en agua estéril (Laboratorios AES, Francia) para ser comparadas con una solución al 0.5% hibitane⁷ (Zeneca, Bélgica) en etanol al 70% (como se usa en hospitales para desinfección rutinaria de la piel).

Los cuadros 10 y 11 muestran los diferentes tratamientos evaluados *in vitro* e *in vivo* mediante difusión pasiva e iontoforesis.

Cuadro 10. Soluciones de DGC evaluadas *in vitro* por difusión pasiva e iontoforesis

Soluciones
DGC al 0.1% en agua estéril más NaCl (0.5 mg/mL)
DGC al 1% en agua estéril más NaCl (0.5 mg/mL)
Hibitane [®] al 0.5% en solución etanólica al 70% más NaCl (0.5 mg/mL)

Cuadro 11. Soluciones de DGC evaluadas *in vivo* por difusión pasiva e iontoforesis

Soluciones
DGC al 0.5% en agua estéril más NaCl (0.5 mg/mL)
Hibitane [®] al 0.5% en solución etanólica al 70% más NaCl (0.5 mg/mL)

5.3. MÉTODOS

5.3.1 Método analíticos

a) Uso de agentes promotores de la penetración (transcutol[®] y azona[®])

Las muestras para la determinación de naproxeno sódico fueron analizadas por HPTLC (Cromatografía de capa fina de alta resolución). El naproxeno sódico contenido en los tape strippings realizados a los voluntarios sanos, fue extraído en una mezcla agua:acetona (60:40) y aplicado en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (Alugram[®] Sil G/UV₂₅₄, Macherey-Nagel, Alemania) mediante el aplicador automatizado del HPTLC (CAMAG, Suiza; versión 2.12). Soluciones estándares de naproxeno sódico en orden creciente de concentración fueron aplicadas para construir la curva de calibración.

La separación se llevó a cabo en una cámara cromatográfica (CAMAG, Suiza) para revelado de placas, saturada a temperatura ambiente con acetato de etilo. Se permitió que el frente de solvente migrara hasta una distancia de 8 cm (el R_f obtenido para el naproxeno sódico fue de 0.62).

Las placas fueron secadas a temperatura ambiente por un periodo de 10 minutos y escaneadas con el escáner del cromatógrafo (CAMAG, Suiza) a una longitud de onda de 237 nm. Las alturas y áreas de pico se obtuvieron mediante el uso del software CATS (versión 4.06, CAMAG). El ensayo fue lineal ($r^2 > 0.9973$) en el intervalo de cantidades de 40-200 ng, siendo el límite de detección de 20 ng.

b) Uso de Iontoforesis

El DGC fue extraído de las cintas con una solución al 0.1% (v/v) de ácido fosfórico, y la solución se analizó por HPLC a 205nm, utilizando una columna Nucleosil 125-4 C₁₈ con una longitud de 125 mm y un flujo de 1 mL/min. Soluciones estándar de concentración creciente fueron preparadas para la construcción de una curva de calibración en el intervalo de concentraciones de 2.0-10.0 µg/mL. La separación se realizó a temperatura ambiente con una mezcla acetronilo/agua (40:60), 0.1% de ácido fosfórico, 0.1% de trietilamina y heptansulfonato de sodio 10 mM como fase móvil.

a) Uso de promotores de penetración

5.3.2 Estudios de Viscosidad

Las mediciones de viscosidad de los geles de PF-127 se llevaron a cabo colocando 50 µL en el plato del viscosímetro digital CAP 2000 (Brookfield, USA) (Fig. 11) en un intervalo de temperaturas entre 10 °C a 40 °C, a 50 rpm usando la aguja circular No. 1. Los sistemas evaluados fueron los siguientes: gel de PF-127 (27 % w/w), geles de PF-127 conteniendo transcuto[®]l y la mezcla azona[®]/transcuto[®]l y las formulaciones I, II y III del cuadro 9.



Fig. 11 Viscosímetro digital Brookfield CAP 2000

5.3.3 Permeaciones a través de la piel *in vivo*

Los voluntarios fueron dosificados tópicamente en el antebrazo con 5mL (dosis infinita) por medio de una celda de perfusión de vidrio (12.56cm^2) o 0.9 mL (suficiente para formar una capa uniforme sobre la piel) de las formulaciones mostradas en el cuadro 9. Cada voluntario fue tratado con todas las formulaciones. Al final del período de aplicación (90 min.). El exceso de formulación remanente en el antebrazo de los voluntarios se removió con una gasa estéril.

La distribución de naproxeno sódico a través del EC fue determinado por la técnica del *tape stripping* (Fig. 9). 20 cintas adhesivas fueron removidas secuencialmente después de remover el exceso de formulación usando la cinta para libros Scotch[®] No. 845 (3M, USA). La cantidad de naproxeno sódico de cada cinta adhesiva fue extraída en una mezcla agua:acetona (60:40) y cuantificada por cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC).

5.3.4 Pérdida de Agua Transepidermal (TEWL)

La evaluación de la pérdida de agua transepidermal se realizó mediante una técnica instrumental que permite evaluar de forma cuantitativa el gradiente de presión de vapor entre la superficie de la piel y el aire ambiental (debido precisamente a la evaporación de agua de la superficie de la piel), por un sensor. Expresada en g/hm^2 , la pérdida de agua ocurre por un proceso de difusión que obedece la primera ley de Fick.

Para evaluar el efecto de las formulaciones sobre la función de barrera de permeabilidad de la piel, se hicieron mediciones de la pérdida de agua transepidermal (TEWL) con el Tewameter Courage-Khazaka TM 210[®] (Colonia, Alemania). Las determinaciones se realizaron colocando el dispositivo del Tewameter en los sitios de aplicación de las formulaciones (Fig. 12), permitiendo que la lectura se estabilizara hasta obtener un valor de lectura constante (3 min.).

Todas las mediciones se efectuaron en una habitación ventilada con una temperatura ambiente de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa entre 50-70%.



Fig. 12 Tewameter Courage-Khazaka TM 210[®]. En el podemos apreciar el dispositivo que es colocado en el antebrazo de los voluntarios para obtener las medidas de pérdida de agua transepidermal.

5.3.5 Espectroscopia de Infrarrojo con transformadas de Fourier y reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).

Esta técnica se basa en que las moléculas absorben energía infrarroja a ciertas frecuencias específicas para cada grupo funcional lo que en el EC corresponde a los componentes de la membrana, observándose un espectro de absorción característico (Fig. 13)

Los espectros de infrarrojo para los seis voluntarios fueron obtenidos para las formulaciones II y III con el espectrofotómetro de infrarrojo equipado con un detector estándar y un cristal trapezoidal de ZnSe (dimensiones 80 ? 10 ? 4 mm con un ángulo de incidencia de 45°) dispuesto en forma horizontal para un mejor posicionamiento del antebrazo de los voluntarios utilizados para el estudio. Los espectros obtenidos son la representación de un promedio de 45 escaneos, colectados a una resolución de 1cm⁻¹ y una sensibilidad de 0.1 cm⁻¹.

Las frecuencias e intensidades de las bandas asignadas a las vibraciones simétricas C-H₂ y vibraciones asimétricas de las cadenas alquílicas de los lípidos del EC (2850 cm⁻¹ y 2920 cm⁻¹, respectivamente) fueron examinadas.

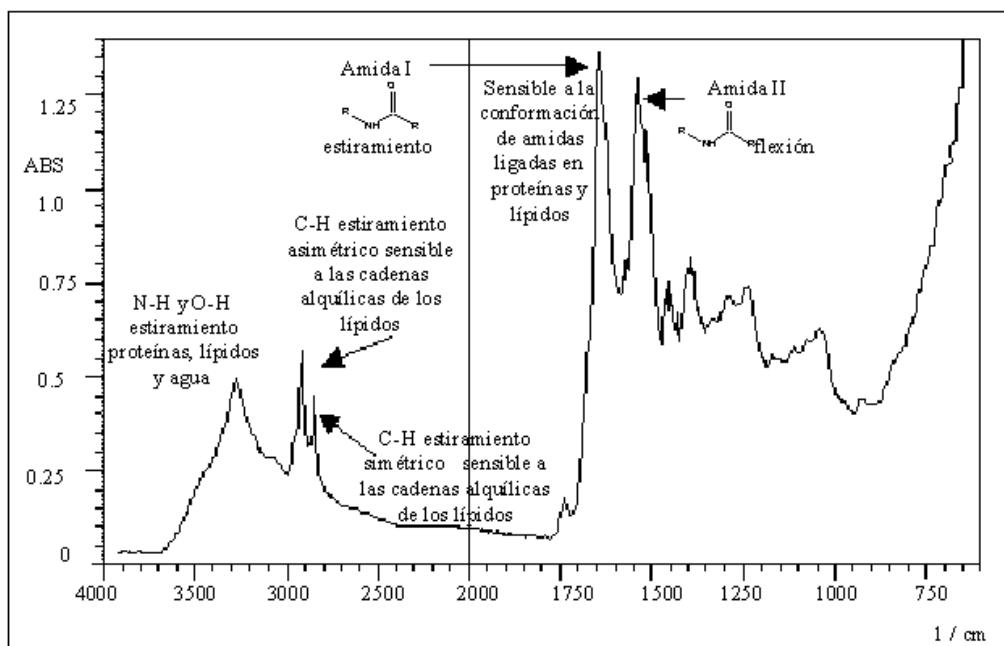


Fig.13 Espectro de infrarrojo característico del estrato córneo.

b) Uso de Iontoforesis

5.3.6 Estudios microbiológicos para determinación de microorganismos presentes en capas profundas de EC

La parte externa de orejas de cerdo para las determinaciones *in vitro* y el antebrazo de voluntarios sanos (4 mujeres y 3 hombres, en un rango de edad entre 26-35) después de haber dado su consentimiento por escrito para los estudios *in vivo*, fueron muestreados para el análisis de la microflora de la piel. A los voluntarios se les prohibió utilizar algún producto tópico o sistémico que pudiese contener como activo algún agente antimicrobiano al menos una semana previa al inicio del estudio. El área de estudio en el antebrazo de los voluntarios no fue muestreada más de una vez por semana con la finalidad de permitir que las propiedades de barrera de la piel regresaran a su estado normal.

El área tratada (7.75cm²) con las soluciones antisépticas de DGC fue delimitada mediante el uso de un dispositivo de plástico flexible con un orificio central para facilitar el muestreo preciso y repetitivo de la zona tratada. Dicha zona de la piel fue sometida a un lavado con una solución buffer de fosfatos pH = 7.7 (fluido de lavado) después de haber aplicado el tratamiento (Cuadros 10 y 11), y después de realizados los 10 *strippings*, mediante el uso de hisopos estériles (Innovaciones Copan, Italia). Los dispositivos plásticos fueron limpiados con una solución etanólica al 70% entre cada muestreo para evitar contaminación cruzada.

La microflora a capas profundas de EC se examinó mediante la técnica del “tape stripping”. 10 cintas adhesivas Scotch[®] No. 845 (3M, USA) se aplicaron sobre la zona de la piel a la que se le aplicó el tratamiento correspondiente (Cuadros 10 y 11), con la finalidad de ir removiendo capas de EC y poder determinar la presencia de microorganismos a capas profundas de EC, que potencialmente pueden generar infecciones asociadas al uso de catéteres intravasculares (CIV). Varias cintas no usadas, fueron cultivadas durante 24 horas a 37 °C en platos de contacto Hygicount (AES laboratorios, Francia) y se encontraron en todos los casos libres de microorganismos.

Los platos de contacto inoculados sin dilución en el caso de los experimentos en humanos y con una dilución 1:100 para los estudios *in vitro* fueron incubados en una atmósfera aeróbica a 37 °C durante 24 horas. Al final de este período de tiempo las unidades formadoras de colonia (UFC) fueron contadas.

5.3.7 Estudios de permeación a través de la piel mediante iontoforesis y difusión pasiva *in vivo* e *in vitro*.

Los estudios de difusión pasiva se realizaron en la parte externa de orejas de cerdo (*in vitro*), y en el antebrazo de los voluntarios sanos (*in vivo*). En todos los casos, los sitios tratados fueron limpiados suavemente sin tallar la piel con agua estéril utilizando una gasa estéril y

permitiendo secar por algunos segundos. Después de esto, los diferentes tratamientos se aplicaron (Cuadros 10 y 11) usando una gasa estéril y tallando la piel durante 30 segundos.

En el caso del uso de la iontoforesis, los estudios se realizaron aplicando 0.2 mA/cm^2 por un periodo de tiempo de 10 minutos, usando el Foresor Iomed[®] (Salt Lake City, USA) conectado a los electrodos TransQE[™] (Iomed, USA).

En ambos casos, ya sea para la liberación pasiva o iontoforética del DGC para las experiencias *in vivo* e *in vitro*, la piel fue sometida a 10 tape strippings con cinta adhesiva Scotch[®] No. 845 (3M, USA) con la finalidad de evaluar la cantidad permeada de DGC a través de piel humana y de cerdo mediante HPLC.

5.3.8 Repoblación de microorganismos en las zonas que fueron sometidas a los tratamientos con las soluciones de DGC mediante difusión pasiva e iontoforesis.

Una vez realizados los 10 strippings, la zona fue cubierta con un recubrimiento estéril durante 24 horas, al término de las cuales se realizó un lavado mediante la técnica de tallado con detergente. Los lavados fueron colectados, sembrados e incubados en platos de contacto Hygicount (AES Laboratorios, Francia) a 37°C por un periodo de tiempo de 24 horas, para verificar al término de este plazo si hubo presencia de UFC.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Uso de promotores de penetración (azona[®] y transcuto[®])

6.1.1 Estudios de Viscosidad

Como ya se mencionó el PF-127 presenta un interesante comportamiento de gelación térmica reversa (Miyazaki *et al.*, 1984; Gilbert *et al.*, 1986; DiBiase *et al.*, 1996; Yeon *et al.*, 2000). Ésta es la principal característica que ha permitido su uso como acarreador de diferentes activos de uso farmacéutico a través de diversas vías de administración como son la oral, la intranasal, la vaginal, la rectal, la oftálmica, la tópica y la transdérmica (Miyazaki *et al.*, 1984; Jain *et al.*, 1991; DiBiase *et al.*, 1996; Ryu *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Escobar-Chávez *et al.*, 2005) e inclusive por vía parenteral. Estos geles pueden aplicarse como una solución, convirtiéndose en geles a temperatura corporal, además ofrecen la posibilidad de formar depósitos, a través de los cuales el fármaco pueda liberarse. El fenómeno de gelación se debe a un proceso de desolvatación e hinchamiento del copolímero para formar agregados entrecruzados. En solución acuosa a temperaturas bajas, una capa de hidratación rodea a las moléculas de PF-127 permitiéndole ser una solución. Sin embargo, a medida que la temperatura se incrementa, las cadenas hidrofílicas del PF-127 se desolvatan como resultado del rompimiento de los puentes de hidrógeno que se habían establecido previamente entre el solvente y las cadenas del PF-127. Este fenómeno favorece las interacciones hidrofóbicas entre las regiones polioxipropilénicas, provocando la formación del gel (Gilbert *et al.*, 1986; DiBiase *et al.*, 1996). Este comportamiento se pone en evidencia en la figura 14 para una solución del PF-127 al 27% (p/v), donde un incremento en la temperatura produce un incremento en la viscosidad del gel.

Está perfectamente documentado (Koller *et al.*, 1987) que la adición de ingredientes a una solución de PF-127 afectará su viscosidad. Con esto en mente, el efecto de la azona[®] y transcuto[®] sobre la viscosidad del PF-127 fue evaluado en función de la temperatura. La viscosidad de la formulación I (naproxeno sódico), II (naproxeno sódico y transcuto[®]) y III (naproxeno sódico, transcuto[®] y azona[®]) fue determinada. Como se muestra en la figura 14, todos los componentes presentes en la formulación producen un decremento en la viscosidad del gel de PF-127 en el intervalo de temperaturas de 25-40 °C en el siguiente orden: transcuto[®]/azona[®] > transcuto[®] > formulación II > formulación III > formulación I. La adición de ácidos o alcoholes disminuyen la rigidez de los geles de PF-127 e incrementan la temperatura de transición, generando una reducción en los valores de viscosidad debido a la formación de iones oxonio (Schmolka, 1974) y a una reducción de interacciones hidrofóbicas, o a la formación de micelas mixtas (BASF Wyandotte Corp., 1973; DiBiase *et al.*, 1996, Godwin *et al.*, 2002). En este sentido, el transcuto[®] y, principalmente la combinación transcuto[®]/azona[®], generó como resultado una dramática pérdida de la viscosidad. Con excepción de la formulación III, todos los sistemas restantes muestran el mismo perfil. La formulación III presentó un comportamiento inesperado, con altos valores de viscosidad a bajas temperaturas y una rápida disminución en los valores de viscosidad a medida que la

temperatura se incrementó. Esta formulación es el único sistema que contiene naproxeno sódico y azona[®]. Considerando que la formulación III tiene un pH de 6.1, la azona[®] y el naproxeno sódico están ionizados (la azona[®] protonada y el naproxeno sódico como carboxilato), una interacción iónica entre la azona[®] y el naproxeno sódico es posible y, por ende, podría contribuir al incremento en la viscosidad a temperaturas bajas. A temperaturas arriba de 25 °C, la viscosidad de la formulación III disminuye. Sin embargo, fue más alta que la del sistema que combinaba azona[®]/transcutol[®] sin naproxeno sódico. Se ha descrito que la incorporación de sales minerales genera un incremento en la viscosidad de geles de PF-127 (Koller *et al.*, 1987); en este sentido, el naproxeno sódico puede actuar contrarrestando el efecto del transcutol[®] o el de la mezcla azona[®]/transcutol[®] en la disminución de la viscosidad.

DiBiase and Rhodes (1991) enfatizaron la importancia de la viscosidad en la velocidad de liberación de fármacos formulados en geles de PF-127. Además, en el presente estudio, los porcentajes de PF-127 y transcutol[®] fueron ajustados con la finalidad de tener viscosidades similares entre formulaciones (I a III) a la temperatura fisiológica (~37°C).

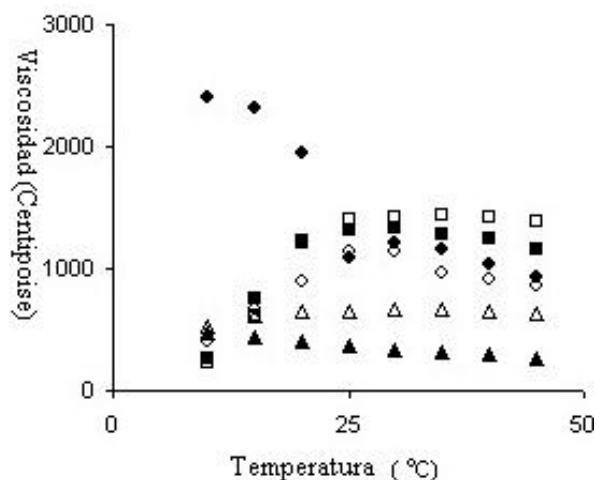


Figura 14. Medidas de viscosidad (n=3) del gel PF-127 (27% w/v, ?), Formulación I (□), Formulación II (◇) y III (△) y efecto de los componentes (transcutol[®] 24.8 % ▲, y azona[®] 1.7 % ◆ /transcutol[®] 24.8 % ?) sobre la viscosidad del gel PF-127.

6.1.2 Estudios de penetración de naproxeno sódico en humanos

Los perfiles de penetración de naproxeno sódico a través de EC humano por difusión pasiva a partir de geles de PF-127 se muestran en la figura 15. En el caso de la formulación I (sin transcutol[®] y azona[®]), el naproxeno sódico no se detectó en las cintas removidas, demostrándose que no atraviesa el EC, debido a que como el naproxeno sódico está ionizado en el gel contribuye a que éste sea incapaz de poder penetrar a través de la piel. Por el contrario, se confirmó claramente que la presencia de agentes promotores de la penetración

promueve la penetración de naproxeno sódico en EC. La inclusión de transcuto[®] al 24.8 % (formulación II) permitió al naproxeno sódico penetrar a través de la piel (0.29 ± 0.01 mg aplicando una dosis infinita y 0.22 ± 0.02 como capa). Esta capacidad promotora de la penetración del transcuto[®] ha sido atribuida a su posibilidad de pasar a través de la piel (Ganem-Quintanar *et al.*, 1997), siendo incorporado dentro de las capas lipídicas de EC, generando un hinchamiento de los lípidos intercelulares (Godwin *et al.*, 2002). Este promotor también ha mostrado acumulación de compuestos aplicados tópicamente sin un incremento significativo en la penetración transdérmica (Ritschel *et al.*, 1991). La combinación de azona[®] y transcuto[®] (formulación III) produce aproximadamente un incremento de 2 a 3 veces mayor en la penetración del naproxeno sódico con respecto a la formulación II, sugiriendo un efecto sinérgico entre la azona[®] y el transcuto[®]. El sinergismo entre estos dos promotores de penetración ha sido ya demostrado para diferentes sustancias como las prostaglandinas (Watkinson *et al.*, 1991) y el cianofenol (Harrison *et al.*, 1996). Por otro lado, se sabe que la azona[®] es capaz de promover la permeación del naproxeno al insertarse por si misma dentro de los lípidos intercelulares del EC, generando un desacomodo en su empaquetamiento (Degim *et al.*, 1999).

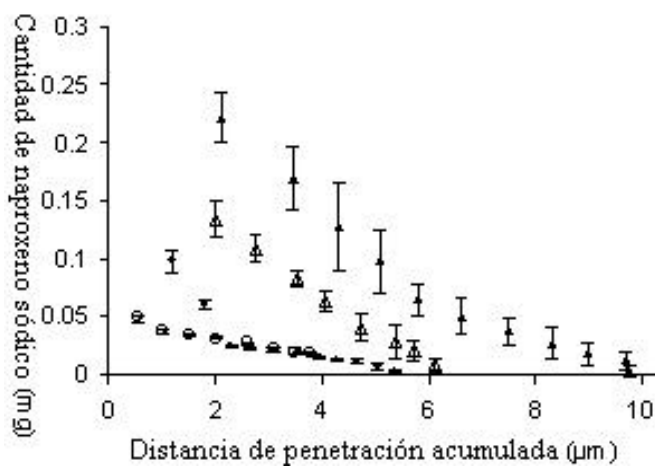


Figura 15. Perfiles de penetración a través de estrato córneo humano de naproxeno sódico formulado en geles de PF-127 aplicando: Una dosis infinita (Formulación II \circ , Formulación III \triangle) y una capa (Formulación II ∇) (media \pm DS; n=6).

Como se indicó en la metodología, todas las formulaciones fueron aplicadas como una dosis infinita (usando celda de perfusión) y aplicando una capa en la piel. El cálculo de las distancias de penetración y la cantidad total de naproxeno sódico permeada a través de la piel (Fig. 16) demostró que, independientemente del modo de aplicación, la formulación III siempre mostró un mayor grado de penetración (en cuanto a distancia de penetración y cantidad permeada) que la formulación II. Por otro lado, aun cuando la aplicación de una dosis infinita favorece una mayor penetración que cuando se aplica en capa, como se muestra en la figura 16, la diferencia entre aplicación de una dosis infinita y una capa es mayor para la

formulación III. Con la finalidad de comparar la cantidad total permeada y la distancia de penetración para estos cuatro sistemas (formulación II y III, dosis infinita y capa), se realizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey. Se encontraron diferencias significativas entre la formulación III-dosis infinita y los tres sistemas restantes, tanto en el caso de la cantidad total permeada a través de la piel ($F= 78.9$; $F_{0.05/2; 3,20}= 3.1$) como para la distancia de penetración ($F= 57.9$; $F_{0.05/2; 3,20} = 3.1$). Resumiendo, la distancia más profunda de penetración (Figure 16 A) y la mayor cantidad total permeada (Figure 16 B) de naproxeno sódico fueron obtenidas al aplicar la formulación III mediante celda de perfusión (dosis infinita).

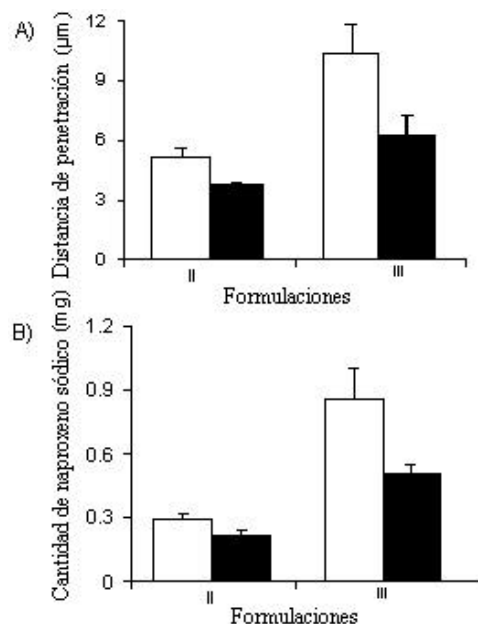


Figura 16 Distancia de penetración (A) y cantidad total recuperada de naproxeno sódico en EC humano (B) para las formulaciones II y III con una dosis infinita (?) y aplicando una capa en la piel (†) (media \pm DS; n=6).

6.1.3 Determinaciones de TEWL

Bajo condiciones ambientales controladas, un valor elevado de TEWL puede predecir que las propiedades de barrera de permeabilidad de la piel están alteradas. Estas determinaciones han sido también utilizadas para verificar la integridad de la piel *in vivo* cuando una formulación se aplica sobre ésta (Tanojo *et al.*, 1997; Pu *et al.*, 1998). En este trabajo, el promedio de valores de TEWL para el sitio control (sin tratamiento) fue 10.4 ± 1.1 g/h.m², el cual se correlaciona adecuadamente con estudios previos de lecturas en sitios control en piel humana (Takeuchi *et al.*, 1995; Fang *et al.*, 2003). El tratamiento de la piel con la formulación II

incrementa el valor de TEWL a $20.6 \pm 1.7 \text{ g/h.m}^2$, y con la formulación III, los valores de TEWL alcanzaron un valor de $33.5 \pm 2.6 \text{ g/h.m}^2$ (Fig. 17). Estos valores se correlacionan bien con aquellos encontrados en estudios de penetración, donde el transcutol[®] incrementa la penetración de activos a través de la piel, y un efecto sinérgico fue propuesto para la mezcla azona[®] /transcutol[®] (formulación III), en el caso de la azona[®] además de su capacidad para modificar los lípidos de la barrera de permeabilidad del EC, se ha reportado que ocasiona un incremento en la retención de agua de los lípidos de la barrera de permeabilidad (Takeuchi *et al.*, 1995). Estos dos efectos pueden haber contribuido considerablemente a la obtención de elevados valores de TEWL para el caso de la formulación III, comparados con la formulación II y el control (Fig. 17). En la figura 18, con la finalidad de evidenciar aun más el efecto de los componentes de las formulaciones II y III sobre la barrera de permeabilidad de la piel, se graficó el cambio absoluto (cada valor de formulación menos el control) en función de los voluntarios involucrados en el estudio, quedando de manifiesto que la formulación III es la que incrementa en mayor grado la pérdida de agua transepidermal (TEWL).

El análisis estadístico (ANOVA de un factor, seguidos de la prueba de Tukey) reveló una diferencia significativa en los valores de pérdida de agua transepidermal entre la formulaciones II y III y entre estas formulaciones y el control ($F=215.5$, $F_{0.05/2;2,15}=3.7$). No se encontró diferencia significativa entre la formulación I y el control.

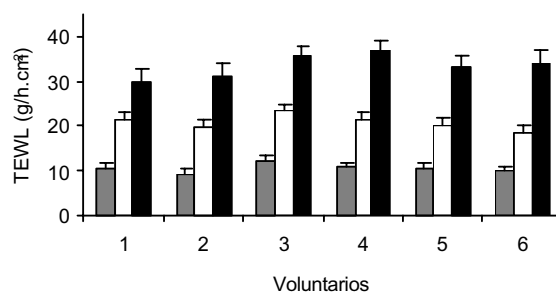


Figura 17. Valores de TEWL obtenidos después de aplicar naproxeno sódico formulado en geles de PF-127. Blanco (□), Formulación II (■) y Formulación III (■) (media \pm DS; n=6)

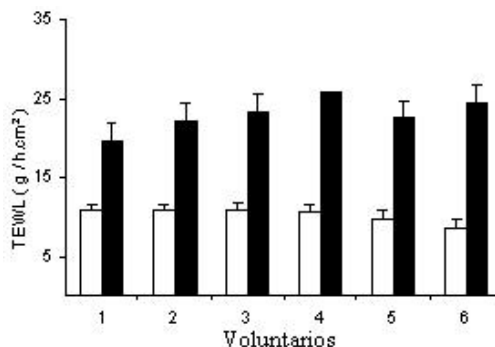


Figura 18. Valores absolutos de TEWL (cada valor de la formulación menos el control) después de aplicar naproxeno sódico formulado en geles de PF-127. Formulación II (□) y Formulación III (■) (media \pm DS; n=6).

6.1.4 ATR/FTIR

Con excepción de las moléculas homonucleares, todas las moléculas absorben radiación infrarroja. La espectroscopía de infrarrojo (IRTF-RTA) estudia las vibraciones moleculares de las especies absorbentes. Aun cuando el número de vibraciones posibles es grande para el caso del EC, las vibraciones de estiramiento originados por las cadenas alquílicas (C-H₂) de los lípidos intercelulares de EC han sido las más ampliamente estudiadas. Principalmente el pico cercano a 2850 cm⁻¹ (vibración de estiramiento simétrica) y el localizado a 2920 cm⁻¹ (vibración de estiramiento asimétrico) son muy buenos indicadores de la naturaleza conformacional de las cadenas alquílicas. Generalmente, desplazamientos de estas vibraciones de estiramiento a números de onda mayores son indicativos de un incremento en isómeros rotacionales del tipo “gauche” a lo largo de la cadena alquílica, lo que genera una mayor libertad de movimiento de los lípidos de la barrera de permeabilidad del EC llamada comúnmente “fluidización” (Naik *et al.*, 1997). En este trabajo, el efecto de la azona[?] y transcutof[?] incluidos en las formulaciones II y III fueron examinados *in vivo* mediante ATR-FTIR.

Las modificaciones sufridas en la base hidrocarbonada (H/C) de los lípidos de EC fueron monitoreadas para ambas formulaciones por ATR/FTIR (Fig.19), debido a que el efecto de los componentes de las formulaciones produce un incremento significativo en las vibraciones del grupo metileno (CH₂) localizadas en la región que va de 2850-2920 cm⁻¹ del espectro de IR (Casal *et al.*, 1984).

Como se muestra en las figuras 20 y 21, cambios a números de onda mayores fueron observados para el caso de las vibraciones simétricas a 2850 cm⁻¹, para ambas formulaciones (II y III), no así para el caso de las vibraciones asimétricas a 2920 cm⁻¹ (Fig. 22). La comparación estadística (ANOVA de un factor) de los datos corroboró este resultado, encontrándose diferencia significativa para la banda simétrica localizada a 2850 cm⁻¹ (F=10.5, F_{0.05/2; 2,15}=3.7) con respecto al control, cuando la piel fue tratada con la formulación III. Sin embargo, no se observó diferencia significativa para la banda asimétrica a 2920 cm⁻¹ (F=0.9, F_{0.05/2; 2,15}=3.7). Es posible asociar estos resultados con fluidización de lípidos y, consecuentemente, con un incremento en la permeabilidad del naproxeno sódico. Estos resultados obtenidos, están en concordancia con estudios de penetración y TEWL presentados anteriormente en este trabajo, y confirman la capacidad promotora de la mezcla Azona[?]/Transcutof[?] en la formulación III, sugiriendo una relación sinérgica entre ambos promotores.

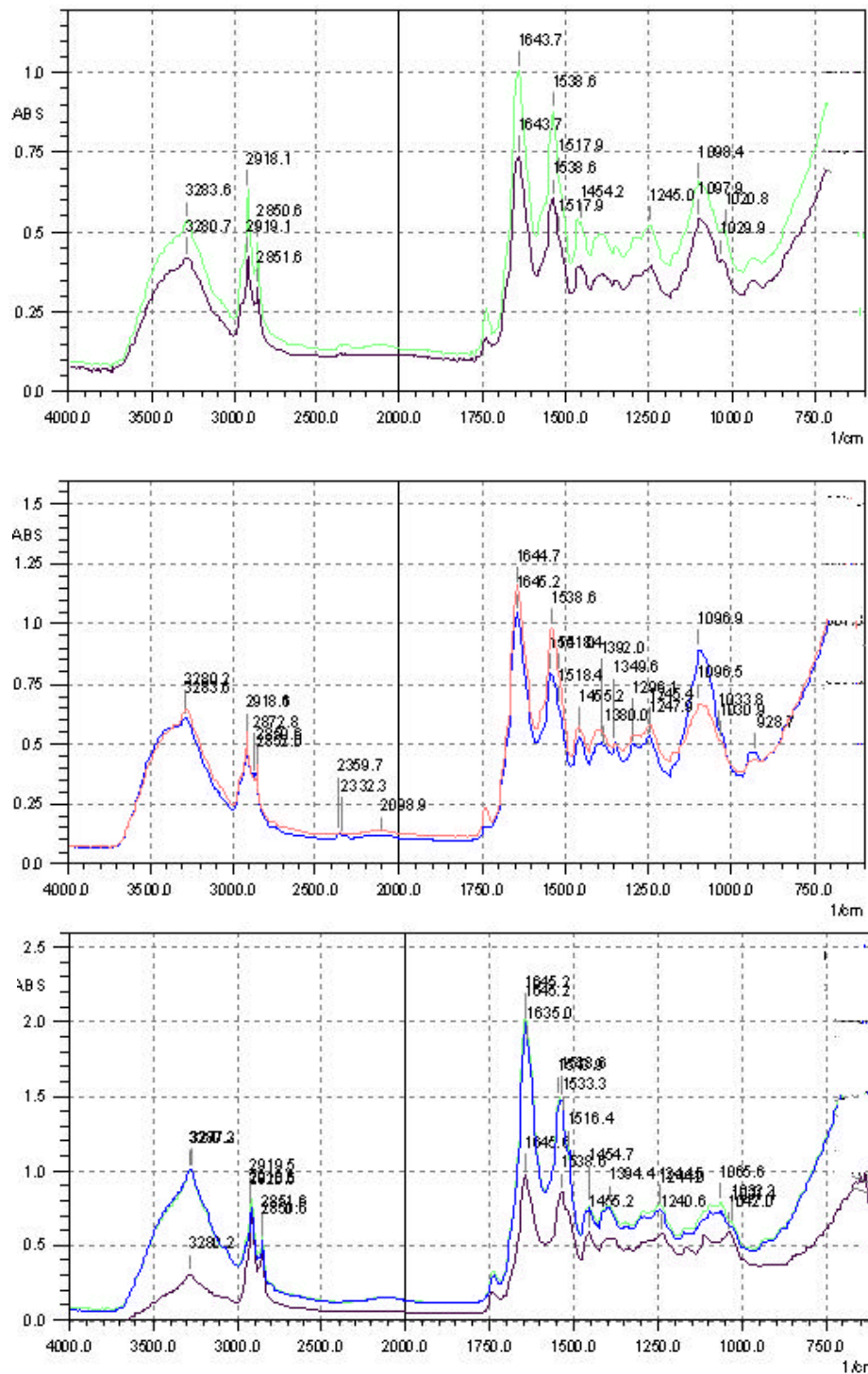


Figura 19. Espectros de infrarrojo de EC humano de 3 voluntarios después de haber aplicado las formulaciones II y III.

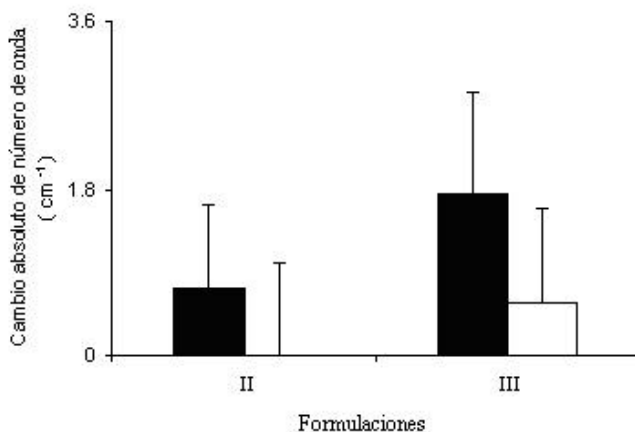


Figura 20. Cambios absolutos de frecuencia de las vibraciones de estiramiento simétrica a 2850 cm^{-1} (¡) y asimétrica (?) a 2920 cm^{-1} de las cadenas alquílicas de los lípidos de EC después de la aplicación de las formulaciones (II y III) (media \pm DS; n=6).

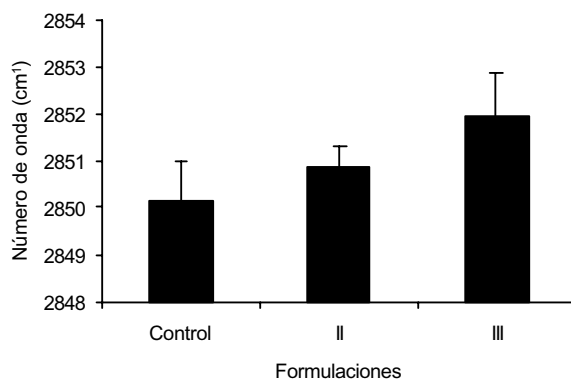


Figura 21. Cambios de número de onda para las vibraciones simétricas (2850 cm^{-1}) de las cadenas alquílicas de los lípidos de EC.

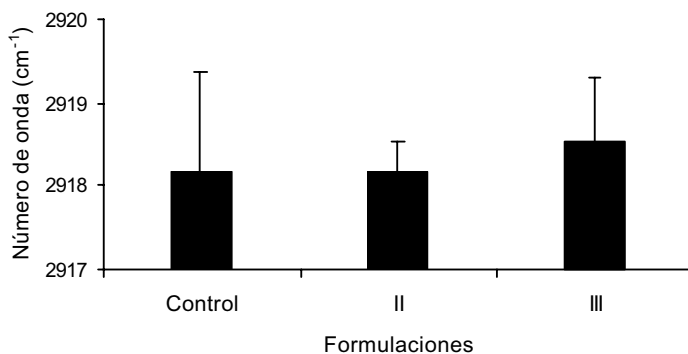


Figura 22. Cambios de número de onda para las vibraciones asimétricas a (2920 cm^{-1}) de las cadenas alquílicas de los lípidos de EC.

6.2 Uso de iontoforesis

6.2.1 Estudios de penetración de DGC *in vitro*

Los perfiles de penetración para DGC, y la cantidad total permeada a través de piel de oreja de cerdo, para los experimentos *in vitro* seguidos de una administración pasiva e iontoforesis, se muestran en las figuras 23 y 24, respectivamente. Es evidente que la cantidad que penetró de DGC por difusión pasiva a través de la piel fue mayor cuando se empleó la solución de hibitane[®] al 0.5% ($181 \pm 25\mu\text{g}$), comparada con las soluciones de DGC al 0.1% y 1% (53 ± 10 y $145 \pm 35 \mu\text{g}$, respectivamente). Estos resultados ponen de manifiesto el hecho de que el uso de la solución de hibitane[®] al 0.5% en solución etanólica al 70% es suficiente para limpiar capas superficiales de la piel previo a un procedimiento invasivo (Garland *et al.*, 1995; Mimos *et al.*, 1999; McDonald *et al.*, 2001).

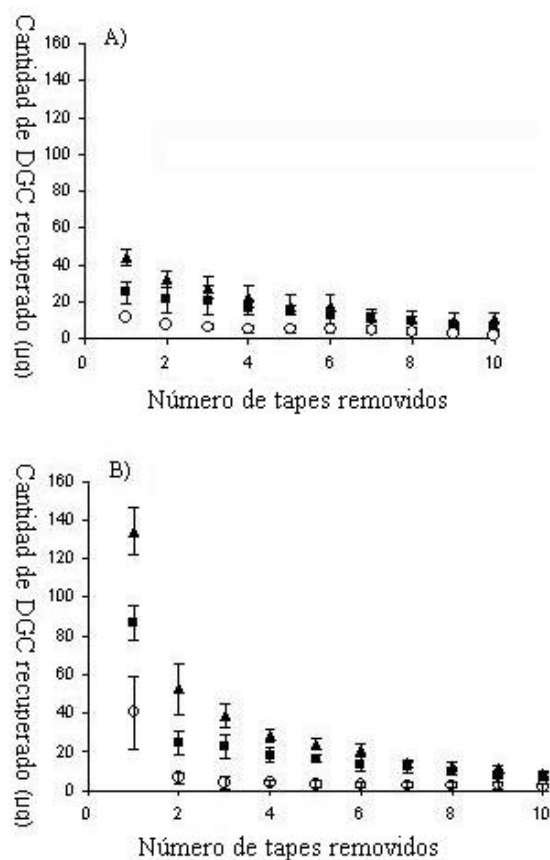


Figura 23. Perfiles de penetración a través de piel de oreja de cerdo de soluciones acuosas de digluconato de clorhexidina (0.1% \circ , y 1% \blacksquare) y de una solución de hibitane[®] en etanol al 70% (\blacktriangle) por difusión pasiva (A) e iontoforesis (B) (media \pm DS; n=3).

Aun cuando la solución de hibitane[®] al 0.5% aplicada por difusión pasiva elimina la microflora superficial de la piel y reduce significativamente la colonización microbiana de catéteres comparada con otros antisépticos como la povidona-iodada (Maki *et al.*, 1991; Sheehan *et al.*, 1993; Mimosz *et al.*, 1996; Humar *et al.*, 1997; Lane *et al.*, 2002), Sato (1996) and Malathi (1993) demostraron que una breve exposición a DGC no es suficiente para la completa eliminación de la microflora residente en la piel, dado que es muy frecuente y común la repoblación de microorganismos residentes en la piel. Por esta razón el uso de la iontoforesis - la cual tiene aplicaciones terapéuticas importantes (Webster *et al.*, 1983; Sloan *et al.*, 1986; Moss *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1990; Maloney *et al.*, 1992; Heit *et al.*, 1994; Ashburn *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1995; Varghese *et al.*, 1996; Doliwa *et al.*, 2001) y que consiste en el transporte electrofacilitado de especies ionizadas a través de la piel mediante una diferencia de potencial, favoreciendo el paso de especies cargadas positivamente -, ofrece una excelente posibilidad de incrementar el transporte transdérmico del DGC a capas profundas de EC para mejorar la antisepsia de la piel, tomando en cuenta que el DGC se encuentra cargado positivamente al pH fisiológico de la piel.

Con la finalidad de comparar la cantidad total permeada de DGC de las soluciones 0.1, 1% e hibitane[®] 0.5% en etanol al 70% para los experimentos *in vitro* administrada por difusión pasiva e iontoforesis un análisis de varianza fue realizado, seguido de la prueba de Tukey. Diferencias significativas entre todas las soluciones de DGC y la solución de hibitane[®] aplicada vía difusión pasiva e iontoforesis se encontraron, tomando en cuenta la cantidad permeada ($F= 53.5$; $F_{0.05/2; 5, 12}= 3.1$). Resumiendo, la mayor cantidad de DGC permeada (Fig. 23) fue conseguida con la solución de hibitane[®] al 0.5% en etanol al 70% usando iontoforesis.

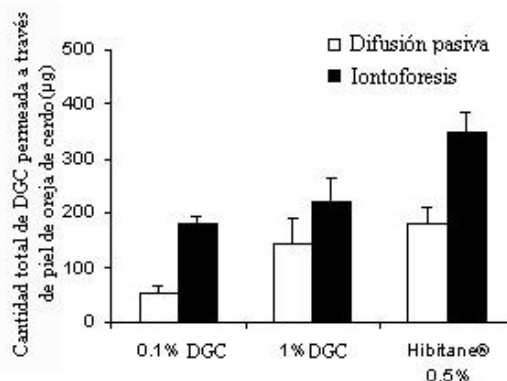


Figura 24. Cantidad total permeada de DGC a través de piel de oreja de cerdo para soluciones de DGC (0.1 y 1%) y la solución de hibitane[®] al 0.5% en etanol al 70% por difusión pasiva (☐) e iontoforesis (■).

6.2.2 Estudios de penetración de DGC *in vivo*

Los perfiles de concentración de DGC a través de EC humano, y la cantidad total permeada de DGC siguiendo la administración pasiva o iontoforética de este *in vivo*, se muestran en las figuras 25 y 26 respectivamente. Los experimentos *in vivo* muestran que la solución de hibitane[®] al 0.5% en etanol al 70% penetra a capas profundas de EC, cuando se administra por iontoforesis ($166 \pm 22\mu\text{g}$) comparada con la liberación pasiva ($31 \pm 5\mu\text{g}$). La comparación estadística (ANOVA de un factor) seguida de la prueba de Tukey para estos datos sustenta los resultados encontrados, se encontró diferencia significativa entre la aplicación de la solución de hibitane[®] por difusión pasiva o por iontoforesis ($F=694.7$; $F_{0.05/2; 1, 6}= 6.0$).

En algunos casos el uso de ciertas sustancias como la histamina (Ikoma *et al.*, 2005) y solución salina (Singh *et al.*, 2001) han generado picazón y eritema en la piel cuando se administran por iontoforesis en humanos. En nuestros experimentos *in vivo*, se encontró un ligero eritema y picazón en la zona de aplicación, cuando la solución de hibitane[®] en etanol al 70% se aplicó mediante iontoforesis. El eritema y la picazón pueden atribuirse a la presencia del etanol en la solución, dado que cuando se aplicó una solución acuosa de DGC al 0.5%, estos problemas desaparecieron y mostraron perfiles de concentración y cantidades de DGC que penetraron a través de la piel similares ($122 \pm 9\mu\text{g}$ comparada con $166 \pm 22\mu\text{g}$ obtenida mediante la aplicación iontoforética de la solución de hibitane[®] al 0.5% en etanol al 70%) (Figuras 24 C y 25).

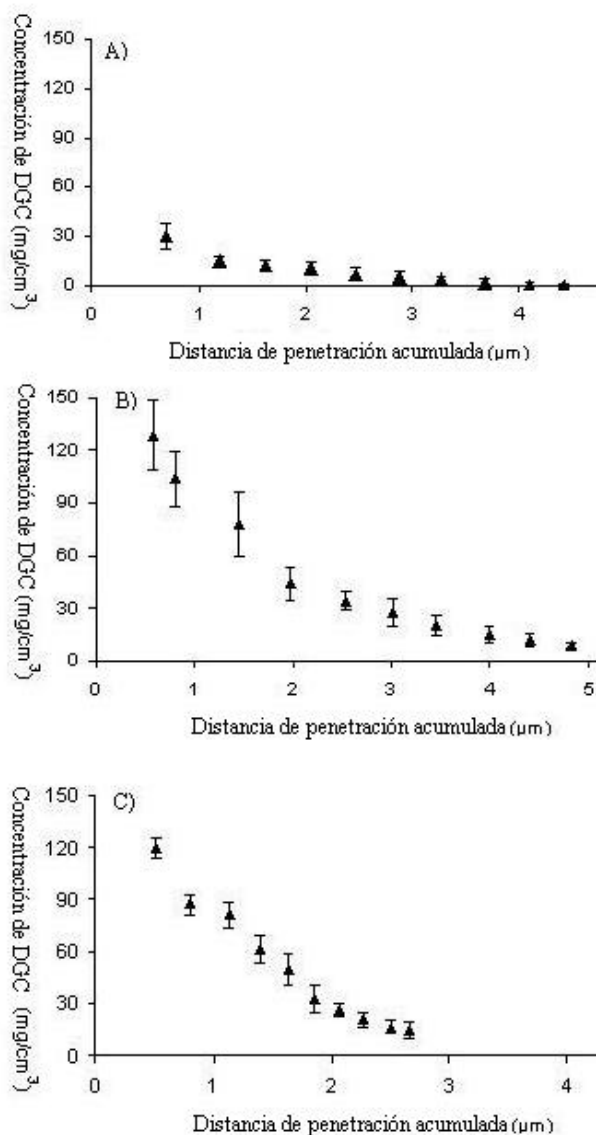


Figura 25. Perfiles de concentración para la solución de hibitane[®] al 0.5% en etanol al 70 % por difusión pasiva (A) (media \pm DS; n=6) e iontoforesis (B) (media \pm DS; n=4), y una solución acuosa de DGC 0.5% (C) (media \pm DS; n=2) aplicada por iontoforesis a través de EC humano.

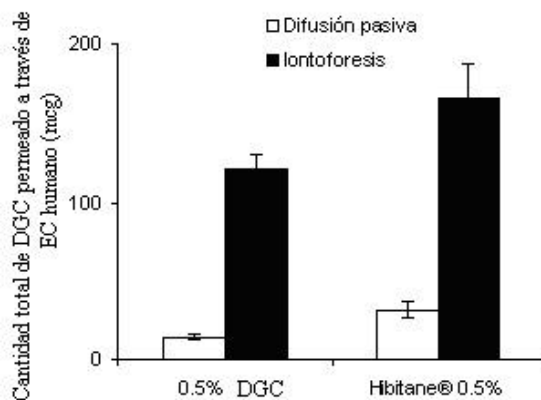


Figura 26. Cantidad total de DGC permeada a través de EC humano para la solución acuosa de DGC al 0.5% y de la solución de hbitane® al 0.5% en etanol al 70% por difusión pasiva (☐) e iontoforesis (■).

6.2.3 Estudios microbiológicos *in vitro* e *in vivo*

El DGC es una bisbiguanida (Fig. 27) activa contra bacterias gram positivo y negativo, microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, hongos, levaduras (Suci *et al.*, 2002) y virus. Se utiliza como agente antimicrobiano para desinfección preoperatoria de la piel, en heridas, para limpieza general de la piel, y también como preservativo farmacéutico y cosmético y como agente antisarro. Para desinfección de la piel, la clorhexidina ha sido formulada en solución al 0.5% (w/v) en etanol al 70% (v/v) (Wade *et al.*, 1994).

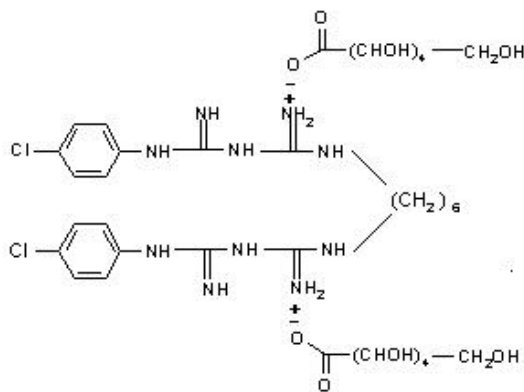


Figura 27. Estructura química del digluconato de clorhexidina (DGC).

Su actividad antibacteriana se debe a que a el pH fisiológico de la piel se encuentra cargada positivamente, lo cual produce uniones a los fosfolípidos de la membrana cargada negativamente de las bacterias causando alteraciones en el equilibrio osmótico con pérdida de fósforo y potasio necesarios para el desarrollo de los microorganismos.

El método para muestreo de microorganismos de piel que goza de mayor reconocimiento y que es el más ampliamente utilizado con fines de investigación es la técnica de tallado con detergente (Eady E.A., 1995). El método está estandarizado, es cuantitativo, reproducible y eficiente, fue elegido para este estudio por estas razones y con la finalidad de poder demostrar que aun cuando la piel se desinfectó con las soluciones acuosas de DGC o con la solución de hibitane[®], hay microorganismos presentes en la piel.

Idealmente, la desinfección de la piel debería eliminar en su totalidad la microflora de la piel de los sitios limpiados. Este estudio muestra en el cuadro 12 que el uso de una gasa humedecida con soluciones de DGC (0.1, 1.0 e hibitane[®] 0.5% en solución etanólica al 70% para los experimentos *in vitro* y la solución acuosa de DGC al 0.5% e hibitane[®] al 0.5% para los experimentos *in vivo*) no es suficiente para erradicar la microflora de la piel. Se encontró la presencia de microorganismos en la piel después de realizar 10 “strippings” lo que confirmó la presencia de reservorios de microorganismos presentes en capas profundas de EC (Selwyn *et al.*, 1972; Owen-Hendley *et al.*, 1991), los cuales no pueden eliminarse mediante una limpieza superficial de la piel con DGC antes de cualquier procedimiento invasivo, como es el uso de un catéter. En el caso de los experimentos *in vitro* fue necesario diluir los lavados obtenidos después de la aplicación de los diferentes tratamientos (Cuadros 10 y 11), para poder determinar las UFC. Se hizo evidente que el uso de la solución de hibitane[®] al 0.5% en etanol al 70%, y de la solución acuosa de DGC al 0.5% mediante difusión pasiva redujo la cuenta de microorganismos en las experiencias *in vivo*. En el caso de los experimentos *in vitro*, se observó la misma tendencia, la solución de hibitane[®] al 0.5% en etanol al 70% mostró una mejor eficacia antimicrobiana comparada con las soluciones de DGC al 0.1 y 1% aplicadas por difusión pasiva.

El cuadro 13 muestra las medias de las UFC obtenidas para los experimentos *in vitro* e *in vivo* cuando a solución de hibitane[®] al 0.5% en etanol al 70% y las soluciones acuosas de DGC se aplicaron mediante iontoforesis a 0.2mA/cm² durante 10 minutos. Es claro que la aplicación de la solución de hibitane[®] al 0.5% por iontoforesis para los experimentos *in vitro* disminuye la microflora de la piel en gran magnitud comparada con las soluciones 0.1 y 1% de DGC.

Los datos para el uso de difusión pasiva o iontoforesis de los experimentos *in vitro* e *in vivo* se analizaron mediante un ANOVA de un factor, seguido de la prueba de Tukey. Se encontró diferencia significativa en cuanto al decremento de UFC, ya sea por uso de difusión pasiva o iontoforesis ($F=5.4$; $F_{0.05/2; 7, 30}= 2.3$). La aplicación de la solución de hibitane[®] al 0.5% y de la solución acuosa de DGC al 0.5% *in vivo* también mostró una tendencia similar en cuanto al decremento de microorganismos.

El efecto de la desinfección de la piel mediante el uso de soluciones de DGC es temporal y superficial. La repoblación de microorganismos ocurrió a las 24 horas después de aplicados los diferentes tratamientos aun cuando la zona tratada fue protegida por un recubrimiento estéril oclusivo. Owen-Hendley (1991) en un estudio de los efectos de tratamientos antimicrobianos de uso tópico en piel humana adulta, encontró que los estafilococos

coagulasa-negativa (que son flora normal de la piel) fueron erradicados de la superficie de la piel. Sin embargo, la repoblación de microorganismos ocurrió a las 24 horas por microorganismos que no habían sido eliminados de capas profundas de EC.

La repoblación de microorganismos en los experimentos *in vitro* fue mayor comparada con la de los resultados *in vivo* debido a que la cantidad de microorganismos presentes en piel es mayor en cerdos que en humanos. Con todo esto, se pone de manifiesto que la aplicación de DGC mediante iontoforesis ofrece una mejor eficacia antimicrobiana que la administración pasiva de DGC, dando como resultado la disminución de la repoblación de microorganismos, hecho que trae como consecuencia una mejor antisepsia de la piel.

Cuadro 12. Media de las UFC obtenidas para los experimentos *in vitro* e *in vivo* cuando soluciones de DGC (0.1, 1 y 0.5%) y de hibitane al 0.5% en etanol al 70% se aplicaron en la piel por difusión pasiva

Media (intervalo) UFC				Media (intervalo) UFC				
Difusión pasiva <i>In vitro</i>				Difusión pasiva <i>In vivo</i>				
Soluciones	Antes del tratamiento Sin dilución	Después de 10 “tape strippings”		Repoblación a las 24h Sin dilución	Soluciones	Antes del tratamiento Sin dilución	Después de 10 “tape strippings”	Repoblación a las 24h Sin dilución
		Sin dilución	1:100					
Sin tratamiento (agua estéril) <i>n</i> =8	>>100	>>100	46 (17-103)	>>100	Sin tratamiento (agua estéril) <i>n</i> =8	30 (12-48)	6 (3-13)	12 (12-26)
DGC 0.1% <i>n</i> =3	>>100	>>100	38 (31-45)	>>100	0.5% CDG <i>n</i> =3	43 (22-63)	0.7 (0-2)	1 (0-2)
DGC 1% <i>n</i> =3	>>100	>100	33 (29-40)	>>100	Hi bitane® 0.5% <i>n</i> =3	41 (31-46)	0.7 (0-1)	1 (0-2)
Hibitane® 0.5% <i>n</i> =8	>>100	>>100	27 (12 -58)	>>100				

Cuadro 13. Media de las UFC obtenidas para los experimentos *in vitro* e *in vivo* cuando soluciones de DGC (0.1, 1 y 0.5%) y de hibitane al 0.5% en etanol al 70% fueron aplicados en la piel mediante iontoforesis a 0.2 mA/cm² durante 10 minutos.

Media (intervalo) UFC					Media (intervalo) UFC			
Iontoforesis n=4 (0.2mA/cm ² 10 min) <i>in vitro</i>					Iontoforesis (0.2mA/cm ² 10 min) <i>in vivo</i>			
Soluciones	Antes del tratamiento Sin dilución	Después 10 “tape strippings”		Repoblación 24 h Sin dilución	Soluciones	Antes del tratamiento Sin diluir	Después 10 “tape trippings”	Repopulation 24 h Sin diluir
		Sin dilución	1:100					
Sin tratamiento (agua estéril)	>>100	>>100	20 (16-24)	>>100	Sin tratamiento (agua estéril) n=2	45 (43 -47)	1 (0-2)	3 (0-6)
DGC 0.1%	>>100	>>100	10 (4-16)	>>100	DGCac 0.5% n=2	38 (31-45)	0.5 (0-1)	0.3 (0-1)
DGC 1%	>>100	>>100	4 (1-6)	>>100	Hibitane® 0.5% n=3	36 (31-42)	0.3 (0-1)	1 (0-2)

VII. CONCLUSIONES

- Uso de promotores de penetración química (Transcutol y Azona®)

Los experimentos demostraron que la inclusión de un promotor de penetración (transcutol® ó azona®/transcutol®) aumenta el paso de naproxeno sódico a través de la piel. Sin embargo, la combinación azona®/transcutol® actúa de manera sinérgica aumentando en mayor grado la penetración de naproxeno sódico. Este hecho fue confirmado mediante medida de pérdida de agua transepidermal (TEWL) e IRTF-RTA: Un marcado incremento en los valores de TEWL y desplazamientos hacia mayores números de onda para las vibraciones simétricas de las cadenas alquílicas de los lípidos del EC fueron observadas cuando se encontraban ambos promotores en la misma formulación.

La formulación con la mezcla de ambos promotores (azona®/transcutol®) forma un gel transparente a la temperatura de la piel, con una adecuada viscosidad, permitiendo al naproxeno sódico su liberación a través del EC. Estos geles son sistemas interesantes para la liberación de fármacos antiinflamatorios al permitir que se mejore su acción.

- Uso de iontoforésis como mecanismo para la penetración a través de la piel.

El tratamiento de la piel con digluconato de clorhexidina puede asumirse como efectivo en la eliminación de microorganismos en la superficie de la piel, pero no necesariamente en capas profundas del estrato córneo. En el presente estudio, se encontró que la repoblación de microorganismos ocurrió a las 24 horas aun después de la desinfección de la superficie de la piel. El número de unidades formadoras de colonias encontradas a las 24 horas de la aplicación del DGC fue mayor cuando éste se aplicó por difusión pasiva en comparación al número encontrado cuando el DGC se aplicó por iontoforesis. Por esta razón, el implemento de la iontoforesis en la aplicación de agentes desinfectantes en la piel ofrece una gran posibilidad para mejorar la antisepsia de la piel mediante la eliminación de microorganismos en capas profundas del EC. Este estudio puede ser la base de futuras investigaciones sobre desinfección de la piel mediante el uso de la iontoforesis con otros antisépticos.

VIII. PERSPECTIVAS

Aun cuando los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto doctoral han sido satisfactorios, éstos ofrecen la posibilidad a futuro de expandir la investigación, pudiéndose proponer la realización de los siguientes estudios:

- * Experimentos de penetración a tiempos más prolongados con la finalidad de obtener el flujo de naproxeno sódico a través de la piel en función del tiempo.
- * Aprovechar la propiedad de gelación térmica reversa del PF-127 para formular otros activos con azona[®] y transcutol[®].
- * Probar otros antisépticos por iontoforesis que puedan favorecer una adecuada antisepsia de la piel como es el caso del segundo antiséptico por elección (Povidona-iodada) para la desinfección rutinaria de la piel.

IX. REFERENCIAS

- Afouna, M. I., Fincher, T. K., Zaghoul, A-A. A., Reddy, I. K. (2003) Effect of azone upon the *in vivo* antiviral efficacy of cidofovir or acyclovir topical formulations in treatment/prevention of cutaneous HSV-1 infections and its correlation with skin target site free drug concentration in hairless mice, *Int. J. Pharm.*, 253, 159-168.
- Agyralides, G. G., Dallas, P. P., Rekkas, D. M. (2004). Development and *in vitro* evaluation of furosemide transdermal formulations using experimental design techniques, *Int. J. Pharm.*, 281, 35-43.
- Akhter, S.A., Barry, B. W. J. (1984). Penetration enhancers in human skin –effect of oleic acid and Azone on flurbiprofen permeation. *J. Pharm. Pharmacol.*, Dec. Suppl.36, 7P.
- Akimoto, J., Takayama, K., Isowa, K., Nayait, T. (1996). Evaluation of skin irritation of percutaneous absorption promoters by means of fractal dimension of rat skin structure, *Int. J. Pharm.*, 128, (1-2), 251-260.
- Alberty, W.J., Hadgraft, J. (1979). Percutaneous absorption: *in vivo* experiments. *J. Pharm. Pharmacol.*, 31, 140-147.
- Allan, G. (1995). Azone®. En Smith, E. W. y Maibach, H.I. Percutaneous penetration enhancers. Ed., CRC. Press. Inc., USA, 129-136.
- Almgren, M., Bahadur, P., Jansson, M., Li, P., Brown, W., Bahadur, A. (1992). *J. Colloid Interface Sci.*, 151, 157.
- Amiji, M. M., Lai, P. K., Shenoy, D. B., Rao, M. (2002). Intratumoral administration of paclitaxel in an in situ gelling poloxamer 407 formulation, *Pharm. Dev. Technol.*, 7(2), 195-202.
- Ashburn, M.A., Streisand, J., Zhong, J. 1995. The iontophoresis of fentanyl citrate in humans. *Anesthesiology.*, 82, 1146-1153.
- Attwood, D., Collet, J. H., Tait, C. (1985). The micellar properties of the poly(oxyethylene)–poly(oxypropylene) copolymer Pluronic F-127 in water and electrolyte solution, *Int. J. Pharm.*, 26, 25-33 .
- Ayala- Bravo, H. A., Quintanar-Guerrero, D., Naik, A., Kalia, Y. N., Cornejo-Bravo, J. M., Ganem-Quintanar, A. (2003). Effects of sucrose oleate and sucrose laureate on *in vivo* human stratum corneum permeability, *Pharm. Res.*, 20,8, 1267-1273.
- Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K., Nagai, T. (1999). Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats, *Int. J. Pharm.*, 184, 2.
- Barry, B. W. 1983. Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption. In: Swarbick J, ed. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. New York and Basel: Marcel Dekker, Inc. p.202.

- Barry, B. W. (1987). Mode of action of penetraci3n enhancers in human skin. *J. Control. Rel.*, 6, 85-97.
- BASF Wyandotte Corp., Industrial Chemical Group. 1973. The wonderful world of Pluronic polyols, Catalog Card No. 70-150738.
- BASF Wyandotte Corp., Industrial Chemical Group. 1973. Pluronic polyols, toxicity and irritation data, Publication No. OS-3012.
- Beastall, J.C., Hadgraft, J., Washington, C. (1988). Mechanism of action of azone as percutaneous penetration enhancer: lipid bilayer fluidity and transition temperature effects. *Int. J. Pharm.*, 43, 207-213.
- Bennett, S. L. Barry, B. W., Woodford, R. J. (1984). The assessment of some potential penetration enhancers using the vasoconstrictor test. *Pharm. Pharmacol.*, Dec. Suppl. 36, 8P.
- Bentley, M., Marchetti, J. M., N3gila, R., Ziad, Ali-Abi., Collet, J. H.(1999). Influence of lecithin on some physical chemical properties of poloxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studies, *Int. J. Pharm.*, 193, 49-55.
- Bialik, W., Walters, K. A., Brian, K. R., Hadgraft, J. (1993). Some factors affecting the *in vitro* penetration of ibuprofen through human skin, *Int. J. Pharm.*, 92, 219-223.
- Bohorquez, M., Koch, C., Trygstad, T., Pandi, N., (1999). A study of the temperature-dependent micellization of pluronic F-127, *J. Colloid Interface Sc.*, 216, 34-40.
- Bos, J. D. 1997. Skin immune system: Cutaneous immunology and clinical immunodermatology, CRC Press, Boca Raton, USA, pp.1-719.
- Bourre, L., Thibaut, S., Lajat, Y., Briffaud, A., Patrice, T. (2002). Potential efficacy of a delta 5-aminolevulinic acid thermosetting gel formulation for use in photodynamic therapy of lesions of gastrointestinal tract, *Pharmacol. Res.*, 45(2), 159-165.
- Bronaugh, R. L., Stewart, R. F., Congdon, E. R. (1982). Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies II: Comparison of human and animal skin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 62, 481-488.
- Brown, W., Schill3n, K., Almgren, M., Hvidt, S., Bahadur, P. (1991). *J. Phys. Chem.*, 95, 1850.
- Cabana, A., Ait-Kadi, A., Juhasz, J. (1997). Study of the gelation process of polyethylene oxide-propylene oxide-polyethylene oxide copolymer (poloxamer 407) aqueous solutions, *J. Colloid Interface Sci.*, 190, 307-312.
- Casal, H. L., Mantsch, H.H. 1984. Polymorphic phase behaviour of phospholipids membranes studied by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.*, 779, 381- 401.

- Cázares-Delgadillo, J., Naik, A., Kalia, Y. N., Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A. (2005). Skin permeation enhancement by sucrose esters: A pH-dependent phenomenon, *Int. J. Pharm.*, 297, 204-212.
- Ceschel, G. C., Maffei, P., Moretti, M. D. L., Demontis, S., Peana, A. T. (2000). In vitro permeation through porcine buccal mucosa of Salvia desoleana Atzei & Picci essential oil from topical formulations, *Int. J. Pharm.*, 195, 171-177.
- Cohen, J. P. 1996. Physical Properties of Polymeric Gels, Jhon Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.
- Collet, J.H., Tait, C., Attwood, D. (1985). In vitro Evaluation of poloxamer gels as controlled release systems using gamma scintigraphy, *Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater.*; 12, 28-30.
- Collier, S.W., Sheikh, N. M., Sakr, A., Lichtin, J. L., Stewart, R. F., Bronaugh, R. L. (1989). Maintenance of skin viability during *in vitro* percutaneous absorption/metabolism studies, *Tox. Appl. Pharmacol.*, 99, 522-533.
- Charrueau, C., Tuleu, C., Astre, V., Grossiord, J. L., Chaumeil, J. C. (2001). Poloxamer 407 as a thermogelling and adhesive polymer for rectal administration of short-chain fatty acids, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 27(4), 351-357.
- Chen-Chow, P. (1980). Drug release from pluronic F-127 gels, *Diss. Abstr. Int.*; 340, 4751.
- Chen-Chow, P., Frank, S. (1981). *In vitro* release of lidocaine from pluronic-127 gels, *Int. J. Pharm.*, 8, 89-100.
- Chesnoy, S., Doucet, J., Durand, D., Couarraze, G. (1996). Effect of iontophoresis in combination with ionic enhancers on the lipid structure of stratum corneum: An X-ray diffraction study, *Pharm. Res.*, 13, 1581-1584.
- Chi, S. Ch., Do, K., Tan, H-K., Chun, H. W. (1996). Anti-inflammatory and analgesic transdermal gel. *U.S. Patent.*, 5,527,832.
- Degim, L.T.; Uslu, A., Hadgraft, J., Atay, T., Akay C., Cevheroglu, S. 1999. The effects of azone and capsaicin on the permeation of naproxen through human skin. *Int. J. Pharm.*, 179, 21-25.
- Desai, S.D., Blanchard, J. 1998. Evaluation of pluronic F127 based sustained-release ocular delivery systems for pilocarpine using the albino rabbit eye model, *J. Pharm. Sci.*, 87, 1190-1195.
- Desai, S. D., Blanchard, J. (2000). Pluronic F 127-based ocular delivery system containing biodegradable polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules of pilocarpine, *Drug Deliv.*, 7(4), 201-207.

- DiBiase, M.D., Rhodes, C.T. 1991. Investigations of epidermal growth factor in semisolid formulations. *Pharm. Acta Helv.*, 66, 165-169.
- DiBiase, M., Rhodes, C.T. 1996. Formulation and evaluation of epidermal growth factor in pluronic-127 Gel, *Drug Develop. Ind. Pharm.*, 22(8), 823-831.
- Doliwa, A., Santoyo, S., Ygartua, P. 2001. Effect of passive and iontophoretic skin pretreatments with terpenes on the in vitro skin transport of piroxicam. *Int. J. Pharm.*, 229, 37-44
- Eady, E. A. 1995. In: Handbook of non invasive methods on the skin, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 207-216.
- Edsman, K., Carlfors, J., Petersson, R. 1998. Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 6, 105-112.
- Ellias, P.M. 1991. Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism, *J. Control. Release*; 15, 199-208.
- Ellias, P., Menon, G. 1991. Structural and lipid biochemical correlates of epidermal permeability barrier. *Adv. Lipid. Res.*, 24, 1-26.
- Escobar-Chávez, J. J., Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A. 2005. *In vivo* skin permeation of sodium naproxen formulated in Pluronic F-127 gels: Effect of azone[®] and transcutol[®], *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 31, 447-454.
- Escribano, E., Calpena, A. C., Queralt, J., Obach, R., Doménech, J. (2003). Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 19, 203-210.
- Eurokova, V. Y., Krylova, O.O., Antonenko, Y.N., Melik-Nubarov, N. S. (2000). Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer lipid membranes to small solutes including doxorubicin, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1468, (1-2) 73-86.
- Fang, J.Y., Fang, C. L., Huang, Y. B., Tsai, Y. H. (1997). Transdermal iontophoresis of sodium nonivamide acetate. III. Combined effect of pre-treatment by penetration enhancers, *Int. J. Pharm.*, 149, 183-193.
- Fang, J-Y., Hsu, L. R., Huang, Y-B., Tsai, Y-H. (1999). Evaluation of transdermal iontophoresis of enoxacin from polymer formulations, in vitro skin permeation and in vivo microdialysis using Wistar rat as an animal model, *Int. J. Pharm.*, 180, 137-149.
- Fang, J-Y., Leu, Y-L., Hwang, T-L., Cheng, H-Ch., Hung, Ch-F. (2003). Development of sesquiterpenes from *Alpina oxyphylla* as novel skin permeation enhancers. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 19, 253-262.

- Fang, J.Y., Leu, Y.L., Wang, Y.Y., Tsai, Y.H. (2002). In vitro topical application and *in vivo* pharmacodynamic evaluation of nonivamide hydrogels using Wistar rat as an animal model, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 15 (5) , 417-423.
- Fawaz, F., Koffi, A., Guyot, M., Pillet, P. (2004). Comparative *in vitro-in vivo* study of two quinine rectal gel formulations, *Int.J. Pharm.*, 280, 151-162.
- Feldmann, R.J., Maibach, H.I. (1969). Percutaneous penetration of steroids in man, *J. Invest. Dermatol.*, 542, 89-94.
- Feldmann, R.J., Maibach, H.I. (1970). Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest. Dermatol.*, 54, 399-404.
- Feldmann, R.J., Maibach, H.I. (1974). Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 28, 126-132.
- Forslind, B. 1994. A domain mosaic model of skin barrier. *Acta Derm. Venereol.*, 74, 1-6.
- Fowler, E.B., Cuenin, M.F., Hokett, S.D., Peacock, M.E. McPherson, J. C 3rd., Sharawy, T.R., Billman, M.A. (2002). Evaluation of pluronic polyols as carriers for grafting materials: study in rat calvaria defects, *J. Periodontol.*, 73(2), 191-197.
- Ganem-Quintanar, A., Lafforgue, A.C., Falson-Rieg, F., Buri, P. 1997. Evaluation of the transepidermal permeation of diethyleneglycol monoethylether and skin water loss. *Int. J. Pharm.*, 147, 165-172.
- Ganem, R. A., Piñón, S. E., Quintanar, G. D. 1998. Uso de promotores de absorción percutánea. *Ciencia Cosmética*, 4, (2), 19-25.
- Ganga, S., Ramarao, P., Singh, J. (1996). Effect of azone on the iontophoretic transdermal delivery of metoprolol tartrate through human epidermis *in vitro*, *J. Control. Rel.*, 42, 57-64.
- Garland, J. S.; Buck, R. K.; Maloney, P.; Durkin, D. M.; Toth-Lloyd, S.; Duffy, M.; Szocik, P.; McAuliffe, T.L.; Goldmann, D. Comparison of 10% povidone-iodine and 0.5% chlorhexidine digluconate for the prevention of peripheral intravenous catheter colonization in neonates: a prospective trial. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1995, 14(6), 510-516.
- Gilbert, J., Hadgraft, J., Bye, A., Brookes, L. 1986. Drug release from pluronic F-127 Gels, *Int. J. Pharmaceutics.*, 32, 223-228.
- Gilbert, J., Richardson, J.L., Davies, M.C., Pallin, K. J. Hadgraft, J. (1987). The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F-127 solution for controlled drug delivery, *J. Control. Release.*, 5, 113-118 .

- Godwin, D.A., Kim, N.H., Felton, L.A. (2002). Influence of transcutol CG on the skin accumulation and transepidermal permeation of ultraviolet absorbers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 53, 23-27.
- Guzek, D.B., Kennedy, A.H., McNeill, S.C., Wakshull, E., Potts, R.O. (1989). Transdermal drug transport and metabolism. Comparison of *in vitro* and *in vivo* results, *Pharm. Res.*, 6, 33-39.
- Guzmán, M., Aberturas, M.R., Garcia, F., Molpeceres, J. (1994). Gelatine gels and polyoxyethylene-polyoxypropylene gels: Comparative study of their properties, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 20, 2041-2048.
- Habib, F.S., Attia, M.A. (1984). Comparative study of the ocular activity in rabbit eyes of adrenaline bitartrate formulated carbopol and poloxamers gels, *Arch. Pharm. Chem. Sci.*, 12, 91-96.
- Hadgraft, J. (1996). Physicochemical determinants of skin penetration enhancement. 3rd Jerusalem Conference on Pharmaceutical Sciences and Clinical Pharmacology.
- Hadgraft, J., Howard, J. (1982). Drug release from pluronic F-127 gels, *J. Pharm. Pharmacol.*; 34, 3.
- Hadgraft, J., Walters, K. A., Wotton, P.K. (1985). Facilitated transport of sodium salicylate across an artificial lipid membrane by azone. *J. Pharm. Pharmacol.*, 37, 725-727.
- Hager, D. F., Laubach, M. J., Sharkey, J. W., Silverly, J. R. (1993). *In vitro* iontophoretic delivery of CQA 206-291 – Influence of ethanol, *J. Control. Rel.*, 23, 175-182.
- Hamley, I. W. 1998. The physics of block copolymers, Oxford University Press; N. Y; USA. pp. 1-20.
- Harrison, J.E., Watkinson, A.C., Green, D.M., Hadgraft, J., Brain, K. (1996). The relative effect of azone and transcutol on permeant diffusivity and solubility in human stratum corneum. *Pharm. Res.*, 13, 542-546.
- Hecht, E., Hoffmann, H. (1994). Interaction of ABA copolymers with ionic surfactants in aqueous solution, *Langmuir*, 10, 86-91.
- Heit, M. C., Monteiro-Riviere, N. A., Jayes, F.L. (1994). Transdermal iontophoretic delivery of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH): effects of repeated administration. *Pharm. Res.*, 11, 1000-1003.
- Henry, R.L., Schmolka, I.R. (1989). Burn wound coverings and the use of poloxamer preparations, *Crit. Rev. Biocompatibility*, 5, 207-220.

- Hirvonen, J., Kantturi, K., Murtomaki, L., Paronen, P., Urtti, A. (1993). Transdermal iontophoresis of sotalol and salicylate: The effect of skin charge and penetration enhancers, *J. Control. Rel.*, 26, 109-117.
- Hokett, S. D., Cuenin, M. F., O'Neal, R. B., Brennan, W. A., Strong, S., Runner, R. R., McPherson, J. C., Van Dyke, T. E. (2000). Pluronic polyol effects on human gingival fibroblast attachment and growth, *J. Periodontol.*, 71, 803-809.
- Howes, D., Guy, R. H., Hadgraft, J., Heylings, J., Hoeck, U., Kemper, F., Maibach, H., Marty, J. P., Merk, H., Parra, J., Rekkas, D., Rondelli, I., Schaefer, H., Täuber, U., Verbiess, N. (1994). Methods for assessing percutaneous absorption. *Atla*, 24, 81-106.
- Humar, A., Ostromecki, A., Baptist, D., Marshall, J., Lazar, N., Houston, P. (1997). A prospective randomized trial of 10% povidone-iodine (PI) vs 0.5% tincture of chlorhexidine (TC) for prevention of infections associated with central venous catheters (CVCs) {Aabstract}. In: Program and Abstracts of the 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 28 September-1 October 1997, Toronto Canada. Washington, DC: *American Society for Microbiology*, 302.
- Ikoma, A., Handwerker, H., Miyachi, Y., Schmelz, M. (2005). Electrically evoked itch in humans. *Pain.*, 113, 148-154.
- Jain, N., Aswal, V., Goyal, P., Bahadur, P. (1998). Micellar structure of an ethylene oxide-propylene oxide block copolymer: A small angle neutron scattering study, *J. Phys. Chem.*, 102, 8452-8460.
- Jain N.K., Shah, B.K., Taneja, N.L. (1991). Nasal absorption of metoprolol tartrate, *Indian J. Pharm. Sci.*, 53, 16-19.
- Jorgensen, E., Hvidt, S., Brown, W., Schillen, K. (1997). Effects of salts on the micellization and gelation of triblock copolymer studied by rheology and light scattering, *Macromolecules* 30, 2355-2364.
- Kabanov, A. V., Batrakova, E.V., Alakhov, V. Y. (2002). Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54(5), 759-779.
- Kadar, T., Fishbeine, E., Meshulam, Y., Sahar, R., Chapman, S., Liani, H., Barness, I., Amir, A. (2000). Treatment of skin injuries induced by sulphur mustard with calmodulin antagonists, using the pig model, *J. Appl. Toxicol.*, Suppl. 1, 133-136.
- Kalia, Y. N., Guy, R. H. (1997). Interaction between penetration enhancers and iontophoresis: Effect on human skin impedance *in vivo*, *J. Control. Rel.*, 44, 33-42.
- Kanikkannan, N., Singh, J., Ramarao, P. (2000). Transdermal iontophoretic delivery of timolol maleate in albino rabbits, *Int. J. Pharm.*, 197, 69-76.

- Katsu, T., Kuroko, M., Sanchika, K., Morikawa, T., Kurosaki, Y., Nakayama, T., Kimura, T., Fujita, Y. (1989). Interaction of 1-dodecylazacicloheptan-2-one (azone) with erythrocyte membrane. *Int. J. Pharm.*, 53, 61-66.
- Kattan-El, A.F., Asbill, C.S., Kim, N., Michniak, B.B. (2000). Effect of formulation variables on the percutaneous permeation of ketoprofen from gel formulations, *Drug Deliv.*, 7,3.
- Kim, E. Y., Gao, Z.G., Park, J. S., Li, H., Han, K. (2002). rhEGF/HP-beta-CD complex in poloxamer gel for ophthalmic delivery, *Int. J. Pharm.*, 233(1-2), 159-167.
- Koller, C., Buri, P. (1987). Propriétés et intérêt pharmaceutique des gels thermoréversibles à base de poloxamers et poloxamines, *S.T.P. Pharma* ; 3(2),115-124.
- Lafforgue, C., Eynard, I., Falson, F., Watkinson, A.C. Hadgraft, J. (1995). Percutaneous absorption of methyl nicotinate, *Int. J. Pharm.*, 121, 89-93.
- Lane, R. K., Matthay, M. A. (2002). Central line infections. *Infectious Diseases.*, 441-448.
- Lemp, M.A. (1973). Artificial tear solutions, *Int. Ophthalmol. Clin.*, 221-229
- Lenaerts, V., Triqueneux, C., Quarton, M., Rieg-Falson, F., Couvreur, P. (1987). Temperature-dependent rheological behavior of Pluronic F-127, *Int. J. Pharm.*, 39, 121-127.
- Li, H., Sung, K.C. (2000). Carbopol/pluronic phase change solutions for ophthalmic drug delivery, *J. Control. Rel.*, 69 , 379-388.
- Liaw, J., Lin, Y. Ch. (2000). Evaluation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) gels as a release vehicle for percutaneous fentanyl, *J. Controll. Rel.*, 68, 273-282.
- López, A., Linares, F., Cortell, C., Herráez, M. (2000). Comparative enhancer effects of Span[®] 20 with Tween[®] 20 and Azone[®] on the *in vitro* percutaneous penetration of compounds with different lipophilicities, *Int. J. Pharm.*, 202, 133-140.
- López, M., Márquez, E., Angeles, E., Cazares, J., Quintanar, D., Ganem, A. (2005). Chemical enhancers for the absorption of substances through the skin. Laurocapram and its derivatives, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, *in press*
- Loyd, V., Allen, J. (1994). Compounding gels, Current and Practical Compounding Information for the Pharmacist, *Secundum Artem*, 4 (5),1-13.
- Lundsted, L.G., Schmolka, I.R. The synthesis and properties of block copolymer polyol surfactants in block and graft polymerization, Ceresa (Ed.), Vol.2, London, 1-62 (1972).
- Maki, D.G., Ringer, M., Alvarado, C.J. (1991). Prospective randomised trial of povidone-iodine, alcohol and clohexidine for prevention of infection associated with central venous and arterial catheters. *Lancet*, 338, 339-343.

- McDonald, C.P. (2001). Evaluation of donor arm disinfection techniques. *Vox Sanguinis*, 80, 135-141.
- Maloney, J.M. (1992). Local anesthesia obtained via iontophoresis as an aid to shave biopsy. *Arch. Dermatol.*, 128, 331-332.
- Manual Merck. (1996). Duodécima edición.
- Meidan, V., Walmsley, A. D., Docker, M. F., Irwin, W. J. (1999). Ultrasound-enhanced diffusion into coupling gel during phonophoresis of 5-fluorouracil, *Int. J. Pharm.*, 185, 205-213.
- Melski, J.W. (1996). The anatomy and physiology of the skin, in: principles and practice of skin excisions, B.I.E. JEMEC and G.B.E. JEMEC (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 1-14.
- Merk, H.F., Jugert, F.K., Frankenberg, S. (1996). Biotransformations in the skin, in: Dermatotoxicology, F.N. Marzulli and H.I. Maibach (eds.) Taylor & Francis, USA, pp. 61-73.
- Michniak, B. B., Player, M. R., Godwin, D. A., Lockhart, C.C., Sowell, J. W. (1998). In vitro evaluation of azone analogs as dermal penetration enhancer V. Miscellaneous compounds, *Int. J. Pharm.*, 161, 169-178.
- Miller, L.L., Kolaskie, C. J., Smith, G. A. (1990). Transdermal iontophoresis of gonadotropin-releasing hormone (LHRH) and two analogues. *J. Pharm. Sci.*, 79, 490-493.
- Miller, S.C., Drabik, B.R. (1984). Rheological properties of poloxamer vehicles, *Int. J. Pharm.*, 18, 269-276.
- Miller, S., Donovan, M. (1982). Effect of poloxamer 407 gel on the mitotic activity of Pilocarpine nitrate in rabbits, *Int. J. Pharm.*, 12, 147-152.
- Mimoz, O., Pieroni, L., Lawrence, C. (1996). Prospective, randomized trial of two antiseptic solutions for prevention of central venous or arterial catheter colonization and infection in intensive-care unit patients, *Crit. Care Med.*, 24, 1818-1823.
- Mimoz, O., Karim, A., Mercat, A., Cosseron, M., Falissard, B., Parker, F., Richard, C., Sammi, K., Nordmann, P. (1999). Chlorhexidine compared with povidone-iodine as skin preparation before blood culture: a randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.*, 131(11), 834-837.
- Mitragotri, S., Blankchtein, D., Langer, R. (1996). Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis, *Pharm. Res.*, 13, (3), 411-420.
- Miyazaki, S., Ohkawa, Y., Takada, M., Atwood, D. (1986). Antitumor effect of PF-127 gel containing mytomycin C on sarcoma-180 ascites tumor in mice. *Chem Pharm. Bull.* 34, 2224-2226.

- Miyazaki, S., Takeuchi, S., Yokouchi, C., Takada, M. (1984). Pluronic F127 gels as vehicles for Topical administration of Anticancer Agents, *Chem. Phar. Bull.*, 32(10), 4205-4208
- Miyazaki, S., Yokouchi, C., Nakamura, T., Hashiguchi, N., Hou, W-M., Takada, M. (1986). Pluronic F-127 gels as a novel vehicle for rectal administration of Indomethacin. *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 1801-1808.
- Miyazaki, S., Tobiyama, T., Takada, M., Attwood, D. (1995). Percutaneous absorption of indomethacin from pluronic F-127 gels in Rats, *J. Pharm. Pharmacol*, 47, 455-457.
- Moghimi, S. M., (2003). Modulation of lymphatic distribution of subcutaneously injected poloxamer 407-coated nanospheres: the effect of the ethylene oxide chane configuration, *FEBS Lett.*, 540 (1-3), 241- 244.
- Morgan, T.M., Reed, B. I., Finin, B.C. (1998). Enhanced skin permeation of sex hormones with novel topical spray vehicles, *J. Pharm. Sci.*, 87, (10), 1213-1218.
- Morikawa, K., Okada ,F., Hosokawa , M., Kobayashi, H.. (1987). Enhancement of therapeutic effects of recombinant interleukin 2 on a transplantable rat fibrosarcoma by the use of a sustained release vehicle pluronic gel, *Cancer Res.*, 47, 37-41.
- Morishita, M., Barichello, J. M., Takayama, K., Chiba, Y., Tokiwa, S., Nagai, T. (2001). Pluronic F-127 gels incorporating highly purified unsaturated fatty acids for buccal delivery of insulin, *Int. J. Pharm.*, 212-222.
- Moss, J., Bundgnard, H. (1990). Prodrugs of peptides. 7. Transdermal delivery of thyrotropin-releasing hormone (TRH) via prodrug. *Int. J. Pharm.*, 66, 39-45.
- Mura, P., Faucci, M. T., Bramanti, G., Corti, P. (2000). Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 9, 365-372.
- Nalbandian, R., Henry, R., Balko, K., Adams, D., Neuman, N. (1987). Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs, *J. Biomed. Mater. Res.*, 21, 1135-1148.
- Nalbandian, R., Henry, R., Wills, H. (1972). Artificial Skin II: Pluronic F-127 silver nitrate or silver lactate gel in treatment of thermal burns, *J. Biomed. Res.*, 6, 583-590.
- Naik, A., Guy, R.H. (1997). Mechanisms of Transdermal Drug Delivery: Infrared spectroscopy and differential scanning calorimetric investigations of the stratum corneum barrier function. New York, Marcel Dekker, Inc.; New York, 87-162.
- Nair, V., Panchangula, R. (2003). Poloxamer gel as vehicle for transdermal iontophoretic delivery of arginine vasopressin: evaluation of in vivo performance in rats, *Pharmacol Res.*, 47(6), 555-562.

- Nicolazzo, J. A., Reed, B. L., Finnin, B. C. (2005). Enhancing the buccal mucosal uptake and retention of triamcinolone acetonide, *J. Control. Rel., in press*
- Norlen, L., Engblom, J. (2000). Structure-related aspects on water diffusivity in fatty acid-soap and skin lipid model systems, *J. Control. Rel.*, 63, 213-226.
- Numajiri, S., Inada, H., Sugibayashi, K., Morimoto, Y. (1998). Iontophoretic transport of morphine across A56 hairless rat skin: is a further increase obtained with chemical enhancer, *Arch-Pract-Pharm-Yakuzaigaku*, 58 (1), 29-36.
- Owen-Hendley, J., Ashe, K. (1991). M. Effect of topical antimicrobial treatment on aerobic bacteria in the stratum corneum of human skin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35, 627-631.
- Paavolla, A., Kilpeläinen, I., Ylirussi, J., Rosenberg, P. (2000). Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia, *Int. J. Pharm.*, 199, 85-93.
- Padilla, M., Clark, G.T., Merrill, R.L. (2000). Topical medications for orofacial neuropathic pain: a review, *J. Am. Dent. Assoc.*, 131-132.
- Parra, J. L., Coderch, L., Yuste, I., De la Maza, A. (1997). Incorporation of non-steroidal anti-inflammatory drugs into specific monophasic formulations, *Colloids and Surfaces.*, 123-124, 115-123.
- Paustin, P. W., McPherson, J. C., Haase, R. R., Runner, R.R., Plowman, K. M., Ward, D. F., Nguyen, T. H., McPherson, J. C. Jr. (1993). Intravenous pluronic F127 in early burn wound treatment in rats, *Burns.*, 19, 187-191.
- Phillips, C. A., Michniak, B.B. (1995). Transdermal delivery of drugs with different lipophilicities using Azone analogs as dermal penetration enhancers, *J. Pharm. Sci.*, 84, 12, 1427-1433.
- Potts, R.O., MacNeill, S.C., Desbonnet, C.R., Wakshull, E. (1989). Transdermal drug transport and metabolism. II. The role of competing kinetic events, *Pharm. Res.*, 6, 119-124.
- Potts, R.O., Francoeur M.L. (1990). Lipid biophysics of water loss through the skin. *J. Invest Dermatol.*, 87, 3871-3873.
- Potts, R.O., Francoeur, M.L. (1991). The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *J. Invest Dermatol.*, 96, 495-499.
- Potts, R. O., Guy, R.H. (1992). Predicting skin permeability. *Pharm. Res.*, 9, (5), 663-669.
- Pruniéras, M. (1981). Précis de cosmetologie dermatologique, Masson Paris.
- Pu, Y., Lyn, P. (1998). Water permeation barrier in isolated cutaneous newborn rat epidermis. *J. Pharm. Tox. Met.*, 40, 145-149.

- Puglia, C., Bonina, F., Trapani, G., Franco, M., Ricci, M. (2001). Evaluation of in vitro percutaneous absorption of lorazepam and clonazepam from hydro-alcoholic gel formulations, *Int. J. Pharm.*, 228, 79-87.
- Rajadhyaksha, V. J. (1976). *U.S. Patent* 3,989,203.
- Rajadhyaksha, V. J. (1976). *U.S. Patent* 3,989,815.
- Rajadhyaksha, V. J. (1976). *U.S. Patent* 3,989,816.
- Rajadhyaksha, V. J. (1978). *U.S. Patent* 4,122,170.
- Rajadhyaksha, V. J. (1982). *U.S. Patent* 4,316,893.
- Rajadhyaksha, V. J. (1983). *U.S. Patent* 4,405,616.
- Rajadhyaksha, V. J. (1983). *U.S. Patent* 4,415,563.
- Rajadhyaksha, V. J., Peck, J.V., Miniskanian, G. (1983). *U.S. Patent* 4,422,970.
- Rajadhyaksha, V. J. (1983). *U.S. Patent* 4,423,040.
- Rajadhyaksha, V. J. (1984). *U.S. Patent* 4,424,210.
- Rajadhyaksha, V. J. (1984). *U.S. Patent* 4,444,762.
- Rassing, J., Atwood, D. (1983). Ultrasonic velocity and lighth scattering studies on polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymer Pluronic F-127 in aqueous solution, *Int. J. Pharm.*, 13, 47-55.
- Ritschel, W.A., Panchagnula, R., Stemmer, K., Ashraf, M. (1991). Development of an intracutaneous depot for drugs. Binding, drug accumulation and retention studies, and mechanisms of depot. *Skin Pharmacol.*, 4, 235-245.
- Rougier, A., Dupuis, D., Lotte, C., Rouguet, R., Schaefer, H. (1983). *In vivo* correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption, *J. Invest. Dermatol* 81, 271-275.
- Rougier, A., Dupuis, D., Lotte, C., Rouguet, R., Wester, R. C., Maibach, H. I. (1986). Regular variation in percutaneous absorption in man: measurement by the stripping method, *Arch. Dermatol. Res.*, 278, 465-469.
- Ruland, A., Kreuter, J., Rytting, J. H. (1994). Transdermal delivery of the tetrapeptide hisetal (melanotropin (6-9)). I. Effect of various penetration enhancers: in vitro study across hairless mouse skin. *Int. J. Pharm.*, 101, 57-61.

- Ryu, J.M., Chung, S-J., Lee, M-H., Chang-Kook, K., Chang-Koo, S. (1999). Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquid suppositories in the rectum, *J. Control. Rel.*, 59, 163-172.
- Saettone, M.F., Giannaccini, B., Delmonte, G., Campigli, V., Tota, G., La Marca, F. (1988). *Int. J. Pharm.*, 43, 67.
- Sato, S., Sakuragi, T., Dan, K. (1996). Human skin flora as a potential source of epidural abscess. *Anesthesiology*, 85, 1276-1282..
- Schmolka, I. (1972). Artificial Skin I: Preparation and properties of Pluronic-127 gels for treatment of burns, *J. Biomed. Mater. Res.*, 6, 571-582.
- Schmolka, I.R. (1974). Pluronic polyols in skin lotions, *Cosmet. Perfum.*, 89, 63-66.
- Schmolka, I. R. (1977). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54, 110.
- Schückler, F., Lee, G. (1991). The influence of azone on monomolecular films of some stratum corneum lipids. *Int. J. Pharm.*, 70, 173-186.
- Schmidt, J. B., Binder, M., Maicheiner, W. (1995). New treatment of atrophic acne scars by iontophoresis with estriol and tretinoin. *Int. J. Dermatol.*, 34, 53-57.
- Selwyn, S., Ellis, H. (1972). Skin bacteria and skin disinfection reconsidered. *Br. Med. J.*, 1, 136-140.
- Sheehan, G., Leicht, K., O'Brien, M., Taylor, G., Rennie, R. (1993). Clorhexidine versus povidone-iodine as cutaneous antiseptics for prevention of vascular catheter infection {Abstract}. In: Program and Abstracts of the 33rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 17-20 October 1993, New Orleans, Louisiana. Washington, DC: *American Society for Microbiology*, 1616.
- Shin, S.C., Cho, C.W., Oh, I. J. (2001). Effects of non ionic surfactants as permeation enhancers towards piroxicam from the poloxamer gel through rat skins, *Int. J. Pharm.*, 222(2), 199-203.
- Shin, S.C., Kim, J-Y. (2000). Enhanced permeation of triamcinolone acetonide through the bucal mucosa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50, 217-220.
- Singh, B. M., Singh, R. B., Singh, J. (2005). Effects of ionization and penetration enhancers on the transdermal delivery of 5-fluorouracil through excised human stratum corneum, *Int. J. Pharm.*, in press.
- Singh, J., Gross, M., Sage, B., Davis, H. T., Maibach, H.I. (2001). Regional variations in skin barrier function and cutaneous irritation due to iontophoresis in human subjects. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 1079-1086.

- Singh, S; Singh, J. (1993). Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: a review. *Med. Res. Rev.*, 13, 569-621.
- Sloan, J.B., Soltani, K. (1986). Iontophoresis in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 15, 671-684
- Smith, J.C., Irwin, W.J. (2000). Ionisation and the effect of absorption enhancers on transport of salicylic acid through silastic rubber and human skin, *Int. J. Pharm.*, 210, 69-82.
- Squillante, E., Maniar, A., Needham, T., Zia, H. (1998). Optimization of *in vitro* nifedipine penetration enhancement through hairless mouse skin, *Int. J. Pharm.*, 169, 143-154.
- Streinstrasser, I., Merkle, H.P. (1995). Dermal metabolism of topically applied drugs: Pathways and models reconsidered, *Pharm. Acta Helv.*, 70, 3-24.
- Suci, P.A., Tyler, B. J. (2002). Action of clorhexidine digluconate against yeast and filamentous forms in an early-stage *Candida albicans* biofilm. *Antimicrob. Chemother.*, 11, 3522-3531.
- Tae-Wan, L., Jin-Chul, K., Sung-Joo, Hwang. (2003). Hydrogel patches containing triclosan for acne treatment, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 56, 407-412.
- Takeuchi, Y., Yasukawa, H., Yamaoka, Y., Taguchi, K., Fukushima, S., Shimouaka, Y., Nishinaga H., Morimoto, Y. 1995. Behaviour of propylene glycol in dermis after treatment of rat intact skin surface with fatty acids, fatty amines or Azone dissolved in propylene glycol. *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 304-309.
- Tanojo, H., Junginger, H.E., Boddé, H.E. (1997). In vivo human skin permeability enhancement by oleic acid: Transepidermal water loss and Fourier-transform infrared spectroscopy studies. *J. Controll. Rel.*, 47, 31-39.
- Tenjarla, S.N., Kasina, R., Puranajoti, P., Omar, M.S., Harris, W.T. (1999). Síntesis and evaluation of N-acetylprolinate esters –novel skin penetrations enhancers, *Int. J. Pharm.*, 192, 147-158.
- The United States Pharmacopeia 24 and National Formulary 19, Unites States Pharmaopeial convention, Inc., Rockville, USA (2000).
- Torrado, S., López, M. L., Torrado, G., Bolás, F., Torrado, S., Cadórniga, R. (1997). A novel formulation of albendazole solution: oral bioavailability and efficacy evaluation, *Int. J. Pharm.*, 156, 181-187.
- Touitou, E., Levi-Schaffer, F., Dayan, N., Alhaique, F., Riccieri, F. (1994). Modulation of caffeine skin delivery by carrier design: liposomes versus permeation enhancers, *Int. J. Pharm.*, 103, 131-136.

- Touitou, E., Levi-Schaffer, F., Shaco-Ezra, N., Ben-Yossef, R., Fabin, B. (1991). Enhanced permeation of teophylline through the skin and its effect on fibroblast proliferation, *Int. J. Pharm.*, 70, 159-166.
- Turunen, T.M., Urtti, A., Paronen, P., Audus, K.L., Rytting, J.H. (1994). Effect of some penetration enhancers on epithelial membrane lipid domains: evidence from fluorescence spectroscopy studies, *Pharm. Res.*, 11, 288-294.
- Valia, K.H., Tojo, K., Chien, Y.W. (1985). Long-term permeation kinetics of estradiol: (III) Kinetic analysis of the simultaneous skin permeation and bioconversion of estradiol esters, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 11, 1133-1173.
- Varghese, E., Khar, R. K. (1996). Enhanced skin permeation of diclofenac by iontophoresis: In vitro and in vivo studies. *J. Control. Rel.*, 38, 21-27.
- Veyries M. L., Faurisson, F., Joly-Guillou, M. L., Rouveix, B. (2000). Control of staphylococcal adhesion to polymethylmethacrylate and enhancement of susceptibility to antibiotics by poloxamer 407, *Antimicrob Agents Chemother.*, 44(4):1093-6.
- Wade, A., Weller, P.J. (1994). Chlorhexidine, In: Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association, Washington, DC., 106-110.
- Wang, Y. Y., Hong, C.T., Chiu, W. T., Fang, J. Y. (2001). *In vitro* and *in vivo* evaluations of topically applied capsaicin and nonivamide from hydrogels, *Int.J. Pharm.*, 224, 1-2.
- Watkinson, A.C., Hadgraft, J., Bye, A. (1991). Aspects of the transdermal delivery of prostaglandins. *Int. J. Pharm.*, 74, 229-236.
- Webster, L.H. (1983). Laboratory diagnosis of cystic fibrosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 18, 313-338.
- Wenzel J.G., Balaji, K. S., Koushik, K., Navarre, C., Duran, S.H., Rahe, C. H., Kompella, U. B. (2002). Pluronic F127 gel formulations of deslorelin and GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle. *J Control Rel.*, 85(1-3):51-9.
- Wester, R. C., Noonan, P. K. (1978). Topical bioavailability of a potential antiacne agent (SC-23110) as determined by cumulative excretion and areas under plasma concentration-time curves, *J. Invest. Dermatol.*, 70, 92-94.
- Wester, R. C., Noonan, P. K., Smeach, S., Kosobud, L. (1983). Pharmacokinetics and bioavailability of intravenous and topical nitroglycerin in the Rhesus monkey: Estimate of first-pass metabolism. *J. Pharm. Sci.*, 72, 745-748.
- Wester, R. C., Melendres, J., Hui, X., Cox, R., Serranzana, S., Zhai, H., Quan, D., Maibach, H. I. (1998). Human *in vitro* and *in vivo* hydroquinone topical bioavailability, metabolism and disposition, *J. Toxicol. Environ. Health Part A*, 54, 101-117.

- Westerink, M. A., Smithson, S. L., Srivastava, N., Blonder, J., Coeshott, C., Rosenthal, G. J. (2001). Projuvant (Pluronic F127: chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid, *Vaccine*, 20(5-6), 711-723.
- Wiechers, J. W., Drenth-Ben, F.H., Jonkman, J. H. G. (1990). Percutaneous absorption of triamcinolone ecetonide from creams with and without azone[®] in humans *in vivo*. *Int. J. Pharm.*, 66, 53-62.
- Wiechers, J. W., Zeew, R. A. (1990). Transdermal drug delivery: Efficacy and potential applications of the penetration enhancer, azone[®]. En Honan, M., Drug Design and Delivery, Ed., Harwood Academic Publishers, United Kingdom, Cap. 5.
- Woolfson, D., McCaffety, D. (1993). Percutaneous local anaesthesia. Ellis Horwood.
- Xia, W., Cao, Y., Shang, Q. (2001). An experimental study of tissue engineered autologous cartilage by using an injectable polymer, *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, 17(5),302-305.
- Yamamoto, T., Yammamoto, Y. (1976). Electrical properties of the epidermal stratum corneum, *Med.Biol. Eng.*, 14, 151-158.
- Yeon, S., Chul, J., Moo, Y. (2000). Poly(ethylene oxide)-poly(ethylene oxide)/poly(? - caprolactone)(PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres: Thermo-responsive drug release behaviors, *J. Control. Rel.*, 65, 345-358.
- Yu, G., Deng, Y., Dalton, S., Atwood, D., Price, C., Booth, C. (1992). *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 25, 2537.
- Zhang, L., Parson, D.L., Navarre, C., Kompella, U.B. (2002). Development and *in-vitro* evaluation of sustained release poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur, *J. Control. Rel.*, 85, 73-81.
- Zhong-Gao, G., Han-Gon, Ch., Hee-Jong, S., Kyung-Mi, P., Soo-Jeong, L., Ki-Jun, H., Chong-Kook, K. (1998). Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for oral delivery of cyclosporine A, *Int. J. Pharm.*, 161, 75-86.
- Zhou, Z., Chu, B. (1988). Ligth scattering study on the association behavior of triblock polymers of ethylene oxide and propylene oxide in aqueous solution, *J. Colloid interface Sci.*, 126, 171-180.
- Zierhut, M., Bieber, T., Brocker, E.B., Forrester, J.V., Foster, C.S., Streilein, J.W. (1996). Immunology of the skin and the eye, *Immunol. Today*, 17, 448-450.

IX. REFERENCIAS

- Afouna, M. I., Fincher, T. K., Zaghoul, A-A. A., Reddy, I. K. (2003) Effect of azone upon the *in vivo* antiviral efficacy of cidofovir or acyclovir topical formulations in treatment/prevention of cutaneous HSV-1 infections and its correlation with skin target site free drug concentration in hairless mice, *Int. J. Pharm.*, 253, 159-168.
- Agyralides, G. G., Dallas, P. P., Rekkas, D. M. (2004). Development and *in vitro* evaluation of furosemide transdermal formulations using experimental design techniques, *Int. J. Pharm.*, 281, 35-43.
- Akhter, S.A., Barry, B. W. J. (1984). Penetration enhancers in human skin –effect of oleic acid and Azone on flurbiprofen permeation. *J. Pharm. Pharmacol.*, Dec. Suppl.36, 7P.
- Akimoto, J., Takayama, K., Isowa, K., Nayait, T. (1996). Evaluation of skin irritation of percutaneous absorption promoters by means of fractal dimension of rat skin structure, *Int. J. Pharm.*, 128, (1-2), 251-260.
- Alberty, W.J., Hadgraft, J. (1979). Percutaneous absorption: *in vivo* experiments. *J. Pharm. Pharmacol.*, 31, 140-147.
- Allan, G. (1995). Azone®. En Smith, E. W. y Maibach, H.I. Percutaneous penetration enhancers. Ed., CRC. Press. Inc., USA, 129-136.
- Almgren, M., Bahadur, P., Jansson, M., Li, P., Brown, W., Bahadur, A. (1992). *J. Colloid Interface Sci.*, 151, 157.
- Amiji, M. M., Lai, P. K., Shenoy, D. B., Rao, M. (2002). Intratumoral administration of paclitaxel in an in situ gelling poloxamer 407 formulation, *Pharm. Dev. Technol.*, 7(2), 195-202.
- Ashburn, M.A., Streisand, J., Zhong, J. 1995. The iontophoresis of fentanyl citrate in humans. *Anesthesiology.*, 82, 1146-1153.
- Attwood, D., Collet, J. H., Tait, C. (1985). The micellar properties of the poly(oxyethylene)–poly(oxypropylene) copolymer Pluronic F-127 in water and electrolyte solution, *Int. J. Pharm.*, 26, 25-33 .
- Ayala- Bravo, H. A., Quintanar-Guerrero, D., Naik, A., Kalia, Y. N., Cornejo-Bravo, J. M., Ganem-Quintanar, A. (2003). Effects of sucrose oleate and sucrose laureate on *in vivo* human stratum corneum permeability, *Pharm. Res.*, 20,8, 1267-1273.
- Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K., Nagai, T. (1999). Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats, *Int. J. Pharm.*, 184, 2.
- Barry, B. W. 1983. Dermatological Formulations: Percutaneous Absorption. In: Swarbick J, ed. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. New York and Basel: Marcel Dekker, Inc. p.202.

- Barry, B. W. (1987). Mode of action of penetraci3n enhancers in human skin. *J. Control. Rel.*, 6, 85-97.
- BASF Wyandotte Corp., Industrial Chemical Group. 1973. The wonderful world of Pluronic polyols, Catalog Card No. 70-150738.
- BASF Wyandotte Corp., Industrial Chemical Group. 1973. Pluronic polyols, toxicity and irritation data, Publication No. OS-3012.
- Beastall, J.C., Hadgraft, J., Washington, C. (1988). Mechanism of action of azone as percutaneous penetration enhancer: lipid bilayer fluidity and transition temperature effects. *Int. J. Pharm.*, 43, 207-213.
- Bennett, S. L. Barry, B. W., Woodford, R. J. (1984). The assessment of some potential penetration enhancers using the vasoconstrictor test. *Pharm. Pharmacol.*, Dec. Suppl. 36, 8P.
- Bentley, M., Marchetti, J. M., N3gila, R., Ziad, Ali-Abi., Collet, J. H.(1999). Influence of lecithin on some physical chemical properties of poloxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studies, *Int. J. Pharm.*, 193, 49-55.
- Bialik, W., Walters, K. A., Brian, K. R., Hadgraft, J. (1993). Some factors affecting the *in vitro* penetration of ibuprofen through human skin, *Int. J. Pharm.*, 92, 219-223.
- Bohorquez, M., Koch, C., Trygstad, T., Pandi, N., (1999). A study of the temperature-dependent micellization of pluronic F-127, *J. Colloid Interface Sc.*, 216, 34-40.
- Bos, J. D. 1997. Skin immune system: Cutaneous immunology and clinical immunodermatology, CRC Press, Boca Raton, USA, pp.1-719.
- Bourre, L., Thibaut, S., Lajat, Y., Briffaud, A., Patrice, T. (2002). Potential efficacy of a delta 5-aminolevulinic acid thermosetting gel formulation for use in photodynamic therapy of lesions of gastrointestinal tract, *Pharmacol. Res.*, 45(2), 159-165.
- Bronaugh, R. L., Stewart, R. F., Congdon, E. R. (1982). Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies II: Comparison of human and animal skin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 62, 481-488.
- Brown, W., Schill3n, K., Almgren, M., Hvidt, S., Bahadur, P. (1991). *J. Phys. Chem.*, 95, 1850.
- Cabana, A., Ait-Kadi, A., Juhasz, J. (1997). Study of the gelation process of polyethylene oxide-propylene oxide-polyethylene oxide copolymer (poloxamer 407) aqueous solutions, *J. Colloid Interface Sci.*, 190, 307-312.
- Casal, H. L., Mantsch, H.H. 1984. Polymorphic phase behaviour of phospholipids membranes studied by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.*, 779, 381- 401.

- Cázares-Delgadillo, J., Naik, A., Kalia, Y. N., Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A. (2005). Skin permeation enhancement by sucrose esters: A pH-dependent phenomenon, *Int. J. Pharm.*, 297, 204-212.
- Ceschel, G. C., Maffei, P., Moretti, M. D. L., Demontis, S., Peana, A. T. (2000). In vitro permeation through porcine buccal mucosa of Salvia desoleana Atzei & Picci essential oil from topical formulations, *Int. J. Pharm.*, 195, 171-177.
- Cohen, J. P. 1996. Physical Properties of Polymeric Gels, Jhon Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.
- Collet, J.H., Tait, C., Attwood, D. (1985). In vitro Evaluation of poloxamer gels as controlled release systems using gamma scintigraphy, *Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater.*; 12, 28-30.
- Collier, S.W., Sheikh, N. M., Sakr, A., Lichtin, J. L., Stewart, R. F., Bronaugh, R. L. (1989). Maintenance of skin viability during *in vitro* percutaneous absorption/metabolism studies, *Tox. Appl. Pharmacol.*, 99, 522-533.
- Charrueau, C., Tuleu, C., Astre, V., Grossiord, J. L., Chaumeil, J. C. (2001). Poloxamer 407 as a thermogelling and adhesive polymer for rectal administration of short-chain fatty acids, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 27(4), 351-357.
- Chen-Chow, P. (1980). Drug release from pluronic F-127 gels, *Diss. Abstr. Int.*; 340, 4751.
- Chen-Chow, P., Frank, S. (1981). *In vitro* release of lidocaine from pluronic-127 gels, *Int. J. Pharm.*, 8, 89-100.
- Chesnoy, S., Doucet, J., Durand, D., Couarraze, G. (1996). Effect of iontophoresis in combination with ionic enhancers on the lipid structure of stratum corneum: An X-ray diffraction study, *Pharm. Res.*, 13, 1581-1584.
- Chi, S. Ch., Do, K., Tan, H-K., Chun, H. W. (1996). Anti-inflammatory and analgesic transdermal gel. *U.S. Patent.*, 5,527,832.
- Degim, L.T.; Uslu, A., Hadgraft, J., Atay, T., Akay C., Cevheroglu, S. 1999. The effects of azone and capsaicin on the permeation of naproxen through human skin. *Int. J. Pharm.*, 179, 21-25.
- Desai, S.D., Blanchard, J. 1998. Evaluation of pluronic F127 based sustained-release ocular delivery systems for pilocarpine using the albino rabbit eye model, *J. Pharm. Sci.*, 87, 1190-1195.
- Desai, S. D., Blanchard, J. (2000). Pluronic F 127-based ocular delivery system containing biodegradable polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules of pilocarpine, *Drug Deliv.*, 7(4), 201-207.

- DiBiase, M.D., Rhodes, C.T. 1991. Investigations of epidermal growth factor in semisolid formulations. *Pharm. Acta Helv.*, 66, 165-169.
- DiBiase, M., Rhodes, C.T. 1996. Formulation and evaluation of epidermal growth factor in pluronic-127 Gel, *Drug Develop. Ind. Pharm.*, 22(8), 823-831.
- Doliwa, A., Santoyo, S., Ygartua, P. 2001. Effect of passive and iontophoretic skin pretreatments with terpenes on the in vitro skin transport of piroxicam. *Int. J. Pharm.*, 229, 37-44
- Eady, E. A. 1995. In: Handbook of non invasive methods on the skin, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 207-216.
- Edsman, K., Carlfors, J., Petersson, R. 1998. Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 6, 105-112.
- Ellias, P.M. 1991. Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism, *J. Control. Release*; 15, 199-208.
- Ellias, P., Menon, G. 1991. Structural and lipid biochemical correlates of epidermal permeability barrier. *Adv. Lipid. Res.*, 24, 1-26.
- Escobar-Chávez, J. J., Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A. 2005. *In vivo* skin permeation of sodium naproxen formulated in Pluronic F-127 gels: Effect of azone[®] and transcutol[®], *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 31, 447-454.
- Escribano, E., Calpena, A. C., Queralt, J., Obach, R., Doménech, J. (2003). Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 19, 203-210.
- Eurokova, V. Y., Krylova, O.O., Antonenko, Y.N., Melik-Nubarov, N. S. (2000). Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer lipid membranes to small solutes including doxorubicin, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1468, (1-2) 73-86.
- Fang, J.Y., Fang, C. L., Huang, Y. B., Tsai, Y. H. (1997). Transdermal iontophoresis of sodium nonivamide acetate. III. Combined effect of pre-treatment by penetration enhancers, *Int. J. Pharm.*, 149, 183-193.
- Fang, J-Y., Hsu, L. R., Huang, Y-B., Tsai, Y-H. (1999). Evaluation of transdermal iontophoresis of enoxacin from polymer formulations, in vitro skin permeation and in vivo microdialysis using Wistar rat as an animal model, *Int. J. Pharm.*, 180, 137-149.
- Fang, J-Y., Leu, Y-L., Hwang, T-L., Cheng, H-Ch., Hung, Ch-F. (2003). Development of sesquiterpenes from *Alpina oxyphylla* as novel skin permeation enhancers. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 19, 253-262.

- Fang, J.Y., Leu, Y.L., Wang, Y.Y., Tsai, Y.H. (2002). In vitro topical application and *in vivo* pharmacodynamic evaluation of nonivamide hydrogels using Wistar rat as an animal model, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 15 (5) , 417-423.
- Fawaz, F., Koffi, A., Guyot, M., Pillet, P. (2004). Comparative *in vitro-in vivo* study of two quinine rectal gel formulations, *Int.J. Pharm.*, 280, 151-162.
- Feldmann, R.J., Maibach, H.I. (1969). Percutaneous penetration of steroids in man, *J. Invest. Dermatol.*, 542, 89-94.
- Feldmann, R.J., Maibach, H.I. (1970). Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest. Dermatol.*, 54, 399-404.
- Feldmann, R.J., Maibach, H.I. (1974). Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 28, 126-132.
- Forslind, B. 1994. A domain mosaic model of skin barrier. *Acta Derm. Venereol.*, 74, 1-6.
- Fowler, E.B., Cuenin, M.F., Hokett, S.D., Peacock, M.E. McPherson, J. C 3rd., Sharawy, T.R., Billman, M.A. (2002). Evaluation of pluronic polyols as carriers for grafting materials: study in rat calvaria defects, *J. Periodontol.*, 73(2), 191-197.
- Ganem-Quintanar, A., Lafforgue, A.C., Falson-Rieg, F., Buri, P. 1997. Evaluation of the transepidermal permeation of diethyleneglycol monoethylether and skin water loss. *Int. J. Pharm.*, 147, 165-172.
- Ganem, R. A., Piñón, S. E., Quintanar, G. D. 1998. Uso de promotores de absorción percutánea. *Ciencia Cosmética*, 4, (2), 19-25.
- Ganga, S., Ramarao, P., Singh, J. (1996). Effect of azone on the iontophoretic transdermal delivery of metoprolol tartrate through human epidermis *in vitro*, *J. Control. Rel.*, 42, 57-64.
- Garland, J. S.; Buck, R. K.; Maloney, P.; Durkin, D. M.; Toth-Lloyd, S.; Duffy, M.; Szocik, P.; McAuliffe, T.L.; Goldmann, D. Comparison of 10% povidone-iodine and 0.5% chlorhexidine digluconate for the prevention of peripheral intravenous catheter colonization in neonates: a prospective trial. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1995, 14(6), 510-516.
- Gilbert, J., Hadgraft, J., Bye, A., Brookes, L. 1986. Drug release from pluronic F-127 Gels, *Int. J. Pharmaceutics.*, 32, 223-228.
- Gilbert, J., Richardson, J.L., Davies, M.C., Pallin, K. J. Hadgraft, J. (1987). The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F-127 solution for controlled drug delivery, *J. Control. Release.*, 5, 113-118 .

- Godwin, D.A., Kim, N.H., Felton, L.A. (2002). Influence of transcutol CG on the skin accumulation and transepidermal permeation of ultraviolet absorbers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 53, 23-27.
- Guzek, D.B., Kennedy, A.H., McNeill, S.C., Wakshull, E., Potts, R.O. (1989). Transdermal drug transport and metabolism. Comparison of *in vitro* and *in vivo* results, *Pharm. Res.*, 6, 33-39.
- Guzmán, M., Aberturas, M.R., Garcia, F., Molpeceres, J. (1994). Gelatine gels and polyoxyethylene-polyoxypropylene gels: Comparative study of their properties, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 20, 2041-2048.
- Habib, F.S., Attia, M.A. (1984). Comparative study of the ocular activity in rabbit eyes of adrenaline bitartrate formulated carbopol and poloxamers gels, *Arch. Pharm. Chem. Sci.*, 12, 91-96.
- Hadgraft, J. (1996). Physicochemical determinants of skin penetration enhancement. 3rd Jerusalem Conference on Pharmaceutical Sciences and Clinical Pharmacology.
- Hadgraft, J., Howard, J. (1982). Drug release from pluronic F-127 gels, *J. Pharm. Pharmacol.*; 34, 3.
- Hadgraft, J., Walters, K. A., Wotton, P.K. (1985). Facilitated transport of sodium salicylate across an artificial lipid membrane by azone. *J. Pharm. Pharmacol.*, 37, 725-727.
- Hager, D. F., Laubach, M. J., Sharkey, J. W., Silverly, J. R. (1993). *In vitro* iontophoretic delivery of CQA 206-291 – Influence of ethanol, *J. Control. Rel.*, 23, 175-182.
- Hamley, I. W. 1998. The physics of block copolymers, Oxford University Press; N. Y; USA. pp. 1-20.
- Harrison, J.E., Watkinson, A.C., Green, D.M., Hadgraft, J., Brain, K. (1996). The relative effect of azone and transcutol on permeant diffusivity and solubility in human stratum corneum. *Pharm. Res.*, 13, 542-546.
- Hecht, E., Hoffmann, H. (1994). Interaction of ABA copolymers with ionic surfactants in aqueous solution, *Langmuir*, 10, 86-91.
- Heit, M. C., Monteiro-Riviere, N. A., Jayes, F.L. (1994). Transdermal iontophoretic delivery of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH): effects of repeated administration. *Pharm. Res.*, 11, 1000-1003.
- Henry, R.L., Schmolka, I.R. (1989). Burn wound coverings and the use of poloxamer preparations, *Crit. Rev. Biocompatibility*, 5, 207-220.

- Hirvonen, J., Kantturi, K., Murtomaki, L., Paronen, P., Urtti, A. (1993). Transdermal iontophoresis of sotalol and salicylate: The effect of skin charge and penetration enhancers, *J. Control. Rel.*, 26, 109-117.
- Hokett, S. D., Cuenin, M. F., O'Neal, R. B., Brennan, W. A., Strong, S., Runner, R. R., McPherson, J. C., Van Dyke, T. E. (2000). Pluronic polyol effects on human gingival fibroblast attachment and growth, *J. Periodontol.*, 71, 803-809.
- Howes, D., Guy, R. H., Hadgraft, J., Heylings, J., Hoeck, U., Kemper, F., Maibach, H., Marty, J. P., Merk, H., Parra, J., Rekkas, D., Rondelli, I., Schaefer, H., Täuber, U., Verbiess, N. (1994). Methods for assessing percutaneous absorption. *Atla*, 24, 81-106.
- Humar, A., Ostromecki, A., Baptist, D., Marshall, J., Lazar, N., Houston, P. (1997). A prospective randomized trial of 10% povidone-iodine (PI) vs 0.5% tincture of chlorhexidine (TC) for prevention of infections associated with central venous catheters (CVCs) {Abstract}. In: Program and Abstracts of the 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 28 September-1 October 1997, Toronto Canada. Washington, DC: *American Society for Microbiology*, 302.
- Ikoma, A., Handwerker, H., Miyachi, Y., Schmelz, M. (2005). Electrically evoked itch in humans. *Pain.*, 113, 148-154.
- Jain, N., Aswal, V., Goyal, P., Bahadur, P. (1998). Micellar structure of an ethylene oxide-propylene oxide block copolymer: A small angle neutron scattering study, *J. Phys. Chem.*, 102, 8452-8460.
- Jain N.K., Shah, B.K., Taneja, N.L. (1991). Nasal absorption of metoprolol tartrate, *Indian J. Pharm. Sci.*, 53, 16-19.
- Jorgensen, E., Hvidt, S., Brown, W., Schillen, K. (1997). Effects of salts on the micellization and gelation of triblock copolymer studied by rheology and light scattering, *Macromolecules* 30, 2355-2364.
- Kabanov, A. V., Batrakova, E.V., Alakhov, V. Y. (2002). Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54(5), 759-779.
- Kadar, T., Fishbeine, E., Meshulam, Y., Sahar, R., Chapman, S., Liani, H., Barness, I., Amir, A. (2000). Treatment of skin injuries induced by sulphur mustard with calmodulin antagonists, using the pig model, *J. Appl. Toxicol.*, Suppl. 1, 133-136.
- Kalia, Y. N., Guy, R. H. (1997). Interaction between penetration enhancers and iontophoresis: Effect on human skin impedance *in vivo*, *J. Control. Rel.*, 44, 33-42.
- Kanikkannan, N., Singh, J., Ramarao, P. (2000). Transdermal iontophoretic delivery of timolol maleate in albino rabbits, *Int. J. Pharm.*, 197, 69-76.

- Katsu, T., Kuroko, M., Sanchika, K., Morikawa, T., Kurosaki, Y., Nakayama, T., Kimura, T., Fujita, Y. (1989). Interaction of 1-dodecylazacicloheptan-2-one (azone) with erythrocyte membrane. *Int. J. Pharm.*, 53, 61-66.
- Kattan-El, A.F., Asbill, C.S., Kim, N., Michniak, B.B. (2000). Effect of formulation variables on the percutaneous permeation of ketoprofen from gel formulations, *Drug Deliv.*, 7,3.
- Kim, E. Y., Gao, Z.G., Park, J. S., Li, H., Han, K. (2002). rhEGF/HP-beta-CD complex in poloxamer gel for ophthalmic delivery, *Int. J. Pharm.*, 233(1-2), 159-167.
- Koller, C., Buri, P. (1987). Propriétés et intérêt pharmaceutique des gels thermoréversibles à base de poloxamers et poloxamines, *S.T.P. Pharma* ; 3(2),115-124.
- Lafforgue, C., Eynard, I., Falson, F., Watkinson, A.C. Hadgraft, J. (1995). Percutaneous absorption of methyl nicotinate, *Int. J. Pharm.*, 121, 89-93.
- Lane, R. K., Matthay, M. A. (2002). Central line infections. *Infectious Diseases.*, 441-448.
- Lemp, M.A. (1973). Artificial tear solutions, *Int. Ophthalmol. Clin.*, 221-229
- Lenaerts, V., Triqueneux, C., Quarton, M., Rieg-Falson, F., Couvreur, P. (1987). Temperature-dependent rheological behavior of Pluronic F-127, *Int. J. Pharm.*, 39, 121-127.
- Li, H., Sung, K.C. (2000). Carbopol/pluronic phase change solutions for ophthalmic drug delivery, *J. Control. Rel.*, 69 , 379-388.
- Liaw, J., Lin, Y. Ch. (2000). Evaluation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) gels as a release vehicle for percutaneous fentanyl, *J. Controll. Rel.*, 68, 273-282.
- López, A., Linares, F., Cortell, C., Herráez, M. (2000). Comparative enhancer effects of Span[®] 20 with Tween[®] 20 and Azone[®] on the *in vitro* percutaneous penetration of compounds with different lipophilicities, *Int. J. Pharm.*, 202, 133-140.
- López, M., Márquez, E., Angeles, E., Cazares, J., Quintanar, D., Ganem, A. (2005). Chemical enhancers for the absorption of substances through the skin. Laurocapram and its derivatives, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, *in press*
- Loyd, V., Allen, J. (1994). Compounding gels, Current and Practical Compounding Information for the Pharmacist, *Secundum Artem*, 4 (5),1-13.
- Lundsted, L.G., Schmolka, I.R. The synthesis and properties of block copolymer polyol surfactants in block and graft polymerization, Ceresa (Ed.), Vol.2, London, 1-62 (1972).
- Maki, D.G., Ringer, M., Alvarado, C.J. (1991). Prospective randomised trial of povidone-iodine, alcohol and clohexidine for prevention of infection associated with central venous and arterial catheters. *Lancet*, 338, 339-343.

- McDonald, C.P. (2001). Evaluation of donor arm disinfection techniques. *Vox Sanguinis*, 80, 135-141.
- Maloney, J.M. (1992). Local anesthesia obtained via iontophoresis as an aid to shave biopsy. *Arch. Dermatol.*, 128, 331-332.
- Manual Merck. (1996). Duodécima edición.
- Meidan, V., Walmsley, A. D., Docker, M. F., Irwin, W. J. (1999). Ultrasound-enhanced diffusion into coupling gel during phonophoresis of 5-fluorouracil, *Int. J. Pharm.*, 185, 205-213.
- Melski, J.W. (1996). The anatomy and physiology of the skin, in: principles and practice of skin excisions, B.I.E. JEMEC and G.B.E. JEMEC (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 1-14.
- Merk, H.F., Jugert, F.K., Frankenberg, S. (1996). Biotransformations in the skin, in: Dermatotoxicology, F.N. Marzulli and H.I. Maibach (eds.) Taylor & Francis, USA, pp. 61-73.
- Michniak, B. B., Player, M. R., Godwin, D. A., Lockhart, C.C., Sowell, J. W. (1998). In vitro evaluation of azone analogs as dermal penetration enhancer V. Miscellaneous compounds, *Int. J. Pharm.*, 161, 169-178.
- Miller, L.L., Kolaskie, C. J., Smith, G. A. (1990). Transdermal iontophoresis of gonadotropin-releasing hormone (LHRH) and two analogues. *J. Pharm. Sci.*, 79, 490-493.
- Miller, S.C., Drabik, B.R. (1984). Rheological properties of poloxamer vehicles, *Int. J. Pharm.*, 18, 269-276.
- Miller, S., Donovan, M. (1982). Effect of poloxamer 407 gel on the miotic activity of Pilocarpine nitrate in rabbits, *Int. J. Pharm.*, 12, 147-152.
- Mimoz, O., Pieroni, L., Lawrence, C. (1996). Prospective, randomized trial of two antiseptic solutions for prevention of central venous or arterial catheter colonization and infection in intensive-care unit patients, *Crit. Care Med.*, 24, 1818-1823.
- Mimoz, O., Karim, A., Mercat, A., Cosseron, M., Falissard, B., Parker, F., Richard, C., Sammi, K., Nordmann, P. (1999). Chlorhexidine compared with povidone-iodine as skin preparation before blood culture: a randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.*, 131(11), 834-837.
- Mitragotri, S., Blankchtein, D., Langer, R. (1996). Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis, *Pharm. Res.*, 13, (3), 411-420.
- Miyazaki, S., Ohkawa, Y., Takada, M., Atwood, D. (1986). Antitumor effect of PF-127 gel containing mytomycin C on sarcoma-180 ascites tumor in mice. *Chem Pharm. Bull.* 34, 2224-2226.

- Miyazaki, S., Takeuchi, S., Yokouchi, C., Takada, M. (1984). Pluronic F127 gels as vehicles for Topical administration of Anticancer Agents, *Chem. Phar. Bull.*, 32(10), 4205-4208
- Miyazaki, S., Yokouchi, C., Nakamura, T., Hashiguchi, N., Hou, W-M., Takada, M. (1986). Pluronic F-127 gels as a novel vehicle for rectal administration of Indomethacin. *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 1801-1808.
- Miyazaki, S., Tobiyama, T., Takada, M., Attwood, D. (1995). Percutaneous absorption of indomethacin from pluronic F-127 gels in Rats, *J. Pharm. Pharmacol*, 47, 455-457.
- Moghimi, S. M., (2003). Modulation of lymphatic distribution of subcutaneously injected poloxamer 407-coated nanospheres: the effect of the ethylene oxide chane configuration, *FEBS Lett.*, 540 (1-3), 241- 244.
- Morgan, T.M., Reed, B. I., Finin, B.C. (1998). Enhanced skin permeation of sex hormones with novel topical spray vehicles, *J. Pharm. Sci.*, 87, (10), 1213-1218.
- Morikawa, K., Okada ,F., Hosokawa , M., Kobayashi, H.. (1987). Enhancement of therapeutic effects of recombinant interleukin 2 on a transplantable rat fibrosarcoma by the use of a sustained release vehicle pluronic gel, *Cancer Res.*, 47, 37-41.
- Morishita, M., Barichello, J. M., Takayama, K., Chiba, Y., Tokiwa, S., Nagai, T. (2001). Pluronic F-127 gels incorporating highly purified unsaturated fatty acids for buccal delivery of insulin, *Int. J. Pharm.*, 212-222.
- Moss, J., Bundgnard, H. (1990). Prodrugs of peptides. 7. Transdermal delivery of thyrotropin-releasing hormone (TRH) via prodrug. *Int. J. Pharm.*, 66, 39-45.
- Mura, P., Faucci, M. T., Bramanti, G., Corti, P. (2000). Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 9, 365-372.
- Nalbandian, R., Henry, R., Balko, K., Adams, D., Neuman, N. (1987). Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs, *J. Biomed. Mater. Res.*, 21, 1135-1148.
- Nalbandian, R., Henry, R., Wills, H. (1972). Artificial Skin II: Pluronic F-127 silver nitrate or silver lactate gel in treatment of thermal burns, *J. Biomed. Res.*, 6, 583-590.
- Naik, A., Guy, R.H. (1997). Mechanisms of Transdermal Drug Delivery: Infrared spectroscopy and differential scanning calorimetric investigations of the stratum corneum barrier function. New York, Marcel Dekker, Inc.; New York, 87-162.
- Nair, V., Panchangula, R. (2003). Poloxamer gel as vehicle for transdermal iontophoretic delivery of arginine vasopressin: evaluation of in vivo performance in rats, *Pharmacol Res.*, 47(6), 555-562.

- Nicolazzo, J. A., Reed, B. L., Finnin, B. C. (2005). Enhancing the buccal mucosal uptake and retention of triamcinolone acetonide, *J. Control. Rel., in press*
- Norlen, L., Engblom, J. (2000). Structure-related aspects on water diffusivity in fatty acid-soap and skin lipid model systems, *J. Control. Rel.*, 63, 213-226.
- Numajiri, S., Inada, H., Sugibayashi, K., Morimoto, Y. (1998). Iontophoretic transport of morphine across A56 hairless rat skin: is a further increase obtained with chemical enhancer, *Arch-Pract-Pharm-Yakuzaigaku*, 58 (1), 29-36.
- Owen-Hendley, J., Ashe, K. (1991). M. Effect of topical antimicrobial treatment on aerobic bacteria in the stratum corneum of human skin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35, 627-631.
- Paavolla, A., Kilpeläinen, I., Ylirussi, J., Rosenberg, P. (2000). Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia, *Int. J. Pharm.*, 199, 85-93.
- Padilla, M., Clark, G.T., Merrill, R.L. (2000). Topical medications for orofacial neuropathic pain: a review, *J. Am. Dent. Assoc.*, 131-132.
- Parra, J. L., Coderch, L., Yuste, I., De la Maza, A. (1997). Incorporation of non-steroidal anti-inflammatory drugs into specific monophasic formulations, *Colloids and Surfaces.*, 123-124, 115-123.
- Paustin, P. W., McPherson, J. C., Haase, R. R., Runner, R.R., Plowman, K. M., Ward, D. F., Nguyen, T. H., McPherson, J. C. Jr. (1993). Intravenous pluronic F127 in early burn wound treatment in rats, *Burns.*, 19, 187-191.
- Phillips, C. A., Michniak, B.B. (1995). Transdermal delivery of drugs with different lipophilicities using Azone analogs as dermal penetration enhancers, *J. Pharm. Sci.*, 84, 12, 1427-1433.
- Potts, R.O., MacNeill, S.C., Desbonnet, C.R., Wakshull, E. (1989). Transdermal drug transport and metabolism. II. The role of competing kinetic events, *Pharm. Res.*, 6, 119-124.
- Potts, R.O., Francoeur M.L. (1990). Lipid biophysics of water loss through the skin. *J. Invest Dermatol.*, 87, 3871-3873.
- Potts, R.O., Francoeur, M.L. (1991). The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *J. Invest Dermatol.*, 96, 495-499.
- Potts, R. O., Guy, R.H. (1992). Predicting skin permeability. *Pharm. Res.*, 9, (5), 663-669.
- Pruniéras, M. (1981). Précis de cosmetologie dermatologique, Masson Paris.
- Pu, Y., Lyn, P. (1998). Water permeation barrier in isolated cutaneous newborn rat epidermis. *J. Pharm. Tox. Met.*, 40, 145-149.

- Puglia, C., Bonina, F., Trapani, G., Franco, M., Ricci, M. (2001). Evaluation of in vitro percutaneous absorption of lorazepam and clonazepam from hydro-alcoholic gel formulations, *Int. J. Pharm.*, 228, 79-87.
- Rajadhyaksha, V. J. (1976). *U.S. Patent* 3,989,203.
- Rajadhyaksha, V. J. (1976). *U.S. Patent* 3,989,815.
- Rajadhyaksha, V. J. (1976). *U.S. Patent* 3,989,816.
- Rajadhyaksha, V. J. (1978). *U.S. Patent* 4,122,170.
- Rajadhyaksha, V. J. (1982). *U.S. Patent* 4,316,893.
- Rajadhyaksha, V. J. (1983). *U.S. Patent* 4,405,616.
- Rajadhyaksha, V. J. (1983). *U.S. Patent* 4,415,563.
- Rajadhyaksha, V. J., Peck, J.V., Miniskanian, G. (1983). *U.S. Patent* 4,422,970.
- Rajadhyaksha, V. J. (1983). *U.S. Patent* 4,423,040.
- Rajadhyaksha, V. J. (1984). *U.S. Patent* 4,424,210.
- Rajadhyaksha, V. J. (1984). *U.S. Patent* 4,444,762.
- Rassing, J., Atwood, D. (1983). Ultrasonic velocity and lighth scattering studies on polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymer Pluronic F-127 in aqueous solution, *Int. J. Pharm.*, 13, 47-55.
- Ritschel, W.A., Panchagnula, R., Stemmer, K., Ashraf, M. (1991). Development of an intracutaneous depot for drugs. Binding, drug accumulation and retention studies, and mechanisms of depot. *Skin Pharmacol.*, 4, 235-245.
- Rougier, A., Dupuis, D., Lotte, C., Rouguet, R., Schaefer, H. (1983). *In vivo* correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption, *J. Invest. Dermatol* 81, 271-275.
- Rougier, A., Dupuis, D., Lotte, C., Rouguet, R., Wester, R. C., Maibach, H. I. (1986). Regular variation in percutaneous absorption in man: measurement by the stripping method, *Arch. Dermatol. Res.*, 278, 465-469.
- Ruland, A., Kreuter, J., Rytting, J. H. (1994). Transdermal delivery of the tetrapeptide hisetal (melanotropin (6-9)). I. Effect of various penetration enhancers: in vitro study across hairless mouse skin. *Int. J. Pharm.*, 101, 57-61.

- Ryu, J.M., Chung, S-J., Lee, M-H., Chang-Kook, K., Chang-Koo, S. (1999). Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquid suppositories in the rectum, *J. Control. Rel.*, 59, 163-172.
- Saettone, M.F., Giannaccini, B., Delmonte, G., Campigli, V., Tota, G., La Marca, F. (1988). *Int. J. Pharm.*, 43, 67.
- Sato, S., Sakuragi, T., Dan, K. (1996). Human skin flora as a potential source of epidural abscess. *Anesthesiology*, 85, 1276-1282..
- Schmolka, I. (1972). Artificial Skin I: Preparation and properties of Pluronic-127 gels for treatment of burns, *J. Biomed. Mater. Res.*, 6, 571-582.
- Schmolka, I.R. (1974). Pluronic polyols in skin lotions, *Cosmet. Perfum.*, 89, 63-66.
- Schmolka, I. R. (1977). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54, 110.
- Schückler, F., Lee, G. (1991). The influence of azone on monomolecular films of some stratum corneum lipids. *Int. J. Pharm.*, 70, 173-186.
- Schmidt, J. B., Binder, M., Maicheiner, W. (1995). New treatment of atrophic acne scars by iontophoresis with estriol and tretinoin. *Int. J. Dermatol.*, 34, 53-57.
- Selwyn, S., Ellis, H. (1972). Skin bacteria and skin disinfection reconsidered. *Br. Med. J.*, 1, 136-140.
- Sheehan, G., Leicht, K., O'Brien, M., Taylor, G., Rennie, R. (1993). Clorhexidine versus povidone-iodine as cutaneous antiseptics for prevention of vascular catheter infection {Abstract}. In: Program and Abstracts of the 33rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 17-20 October 1993, New Orleans, Louisiana. Washington, DC: *American Society for Microbiology*, 1616.
- Shin, S.C., Cho, C.W., Oh, I. J. (2001). Effects of non ionic surfactants as permeation enhancers towards piroxicam from the poloxamer gel through rat skins, *Int. J. Pharm.*, 222(2), 199-203.
- Shin, S.C., Kim, J-Y. (2000). Enhanced permeation of triamcinolone acetonide through the bucal mucosa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50, 217-220.
- Singh, B. M., Singh, R. B., Singh, J. (2005). Effects of ionization and penetration enhancers on the transdermal delivery of 5-fluorouracil through excised human stratum corneum, *Int. J. Pharm.*, in press.
- Singh, J., Gross, M., Sage, B., Davis, H. T., Maibach, H.I. (2001). Regional variations in skin barrier function and cutaneous irritation due to iontophoresis in human subjects. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 1079-1086.

- Singh, S; Singh, J. (1993). Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: a review. *Med. Res. Rev.*, 13, 569-621.
- Sloan, J.B., Soltani, K. (1986). Iontophoresis in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 15, 671-684
- Smith, J.C., Irwin, W.J. (2000). Ionisation and the effect of absorption enhancers on transport of salicylic acid through silastic rubber and human skin, *Int. J. Pharm.*, 210, 69-82.
- Squillante, E., Maniar, A., Needham, T., Zia, H. (1998). Optimization of *in vitro* nifedipine penetration enhancement through hairless mouse skin, *Int. J. Pharm.*, 169, 143-154.
- Streinstrasser, I., Merkle, H.P. (1995). Dermal metabolism of topically applied drugs: Pathways and models reconsidered, *Pharm. Acta Helv.*, 70, 3-24.
- Suci, P.A., Tyler, B. J. (2002). Action of clorhexidine digluconate against yeast and filamentous forms in an early-stage *Candida albicans* biofilm. *Antimicrob. Chemother.*, 11, 3522-3531.
- Tae-Wan, L., Jin-Chul, K., Sung-Joo, Hwang. (2003). Hydrogel patches containing triclosan for acne treatment, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 56, 407-412.
- Takeuchi, Y., Yasukawa, H., Yamaoka, Y., Taguchi, K., Fukushima, S., Shimouaka, Y., Nishinaga H., Morimoto, Y. 1995. Behaviour of propylene glycol in dermis after treatment of rat intact skin surface with fatty acids, fatty amines or Azone dissolved in propylene glycol. *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 304-309.
- Tanojo, H., Junginger, H.E., Boddé, H.E. (1997). In vivo human skin permeability enhancement by oleic acid: Transepidermal water loss and Fourier-transform infrared spectroscopy studies. *J. Controll. Rel.*, 47, 31-39.
- Tenjarla, S.N., Kasina, R., Puranajoti, P., Omar, M.S., Harris, W.T. (1999). Síntesis and evaluation of N-acetylprolinate esters –novel skin penetrations enhancers, *Int. J. Pharm.*, 192, 147-158.
- The United States Pharmacopeia 24 and National Formulary 19, Unites States Pharmaopeial convention, Inc., Rockville, USA (2000).
- Torrado, S., López, M. L., Torrado, G., Bolás, F., Torrado, S., Cadórniga, R. (1997). A novel formulation of albendazole solution: oral bioavailability and efficacy evaluation, *Int. J. Pharm.*, 156, 181-187.
- Touitou, E., Levi-Schaffer, F., Dayan, N., Alhaique, F., Riccieri, F. (1994). Modulation of caffeine skin delivery by carrier design: liposomes versus permeation enhancers, *Int. J. Pharm.*, 103, 131-136.

- Touitou, E., Levi-Schaffer, F., Shaco-Ezra, N., Ben-Yossef, R., Fabin, B. (1991). Enhanced permeation of teophylline through the skin and its effect on fibroblast proliferation, *Int. J. Pharm.*, 70, 159-166.
- Turunen, T.M., Urtti, A., Paronen, P., Audus, K.L., Rytting, J.H. (1994). Effect of some penetration enhancers on epithelial membrane lipid domains: evidence from fluorescence spectroscopy studies, *Pharm. Res.*, 11, 288-294.
- Valia, K.H., Tojo, K., Chien, Y.W. (1985). Long-term permeation kinetics of estradiol: (III) Kinetic analysis of the simultaneous skin permeation and bioconversion of estradiol esters, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 11, 1133-1173.
- Varghese, E., Khar, R. K. (1996). Enhanced skin permeation of diclofenac by iontophoresis: In vitro and in vivo studies. *J. Control. Rel.*, 38, 21-27.
- Veyries M. L., Faurisson, F., Joly-Guillou, M. L., Rouveix, B. (2000). Control of staphylococcal adhesion to polymethylmethacrylate and enhancement of susceptibility to antibiotics by poloxamer 407, *Antimicrob Agents Chemother.*, 44(4):1093-6.
- Wade, A., Weller, P.J. (1994). Chlorhexidine, In: Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association, Washington, DC., 106-110.
- Wang, Y. Y., Hong, C.T., Chiu, W. T., Fang, J. Y. (2001). *In vitro* and *in vivo* evaluations of topically applied capsaicin and nonivamide from hydrogels, *Int.J. Pharm.*, 224, 1-2.
- Watkinson, A.C., Hadgraft, J., Bye, A. (1991). Aspects of the transdermal delivery of prostaglandins. *Int. J. Pharm.*, 74, 229-236.
- Webster, L.H. (1983). Laboratory diagnosis of cystic fibrosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 18, 313-338.
- Wenzel J.G., Balaji, K. S., Koushik, K., Navarre, C., Duran, S.H., Rahe, C. H., Kompella, U. B. (2002). Pluronic F127 gel formulations of deslorelin and GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle. *J Control Rel.*, 85(1-3):51-9.
- Wester, R. C., Noonan, P. K. (1978). Topical bioavailability of a potential antiacne agent (SC-23110) as determined by cumulative excretion and areas under plasma concentration-time curves, *J. Invest. Dermatol.*, 70, 92-94.
- Wester, R. C., Noonan, P. K., Smeach, S., Kosobud, L. (1983). Pharmacokinetics and bioavailability of intravenous and topical nitroglycerin in the Rhesus monkey: Estimate of first-pass metabolism. *J. Pharm. Sci.*, 72, 745-748.
- Wester, R. C., Melendres, J., Hui, X., Cox, R., Serranzana, S., Zhai, H., Quan, D., Maibach, H. I. (1998). Human *in vitro* and *in vivo* hydroquinone topical bioavailability, metabolism and disposition, *J. Toxicol. Environ. Health Part A*, 54, 101-117.

- Westerink, M. A., Smithson, S. L., Srivastava, N., Blonder, J., Coeshott, C., Rosenthal, G. J. (2001). Projuvant (Pluronic F127: chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid, *Vaccine*, 20(5-6), 711-723.
- Wiechers, J. W., Drenth-Ben, F.H., Jonkman, J. H. G. (1990). Percutaneous absorption of triamcinolone ecetonide from creams with and without azone[®] in humans *in vivo*. *Int. J. Pharm.*, 66, 53-62.
- Wiechers, J. W., Zeew, R. A. (1990). Transdermal drug delivery: Efficacy and potential applications of the penetration enhancer, azone[®]. En Honan, M., Drug Design and Delivery, Ed., Harwood Academic Publishers, United Kingdom, Cap. 5.
- Woolfson, D., McCaffety, D. (1993). Percutaneous local anaesthesia. Ellis Horwood.
- Xia, W., Cao, Y., Shang, Q. (2001). An experimental study of tissue engineered autologous cartilage by using an injectable polymer, *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, 17(5),302-305.
- Yamamoto, T., Yammamoto, Y. (1976). Electrical properties of the epidermal stratum corneum, *Med.Biol. Eng.*, 14, 151-158.
- Yeon, S., Chul, J., Moo, Y. (2000). Poly(ethylene oxide)-poly(ethylene oxide)/poly(? - caprolactone)(PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres: Thermo-responsive drug release behaviors, *J. Control. Rel.*, 65, 345-358.
- Yu, G., Deng, Y., Dalton, S., Atwood, D., Price, C., Booth, C. (1992). *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 25, 2537.
- Zhang, L., Parson, D.L., Navarre, C., Kompella, U.B. (2002). Development and *in-vitro* evaluation of sustained release poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur, *J. Control. Rel.*, 85, 73-81.
- Zhong-Gao, G., Han-Gon, Ch., Hee-Jong, S., Kyung-Mi, P., Soo-Jeong, L., Ki-Jun, H., Chong-Kook, K. (1998). Physicochemical characterization and evaluation of a microemulsion system for oral delivery of cyclosporine A, *Int. J. Pharm.*, 161, 75-86.
- Zhou, Z., Chu, B. (1988). Ligth scattering study on the association behavior of triblock polymers of ethylene oxide and propylene oxide in aqueous solution, *J. Colloid interface Sci.*, 126, 171-180.
- Zierhut, M., Bieber, T., Brocker, E.B., Forrester, J.V., Foster, C.S., Streilein, J.W. (1996). Immunology of the skin and the eye, *Immunol. Today*, 17, 448-450.

Sinónimos: Hexan digluconato del 1,6-Bis(N-P-Clorofenil-Biguanido)

Formula condensada: $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}.2C_6H_{12}O_7$

Peso molecular: 897.76 g/mol C 52.78%, H 5.43%, O 14.48%, Cl 9.05% N 18.11%.

Propiedades: Solución clara e incolora preparada en un intervalo de concentraciones entre 19.0 – 21.0% p/v con un contenido de agua que va del 79-81 % y 500ppm de 4-cloroanilina. Tiene una densidad de 1.06–1.07 g/mL es miscible en agua y alcoholes, el pH de la solución oscila entre 5.5 a 7.0.

Usos: El digluconato de clorhexidina es una bisbiguanida con poder antiséptico y desinfectante, por lo que puede actuar como bactericida o bacteriostático, es activa contra una gran cantidad de bacterias gram positivas y gram negativas. También inhibe a hongos, y algunos virus. El digluconato de clorhexidina es más activo a pH's neutros o ligeramente ácidos. Es ampliamente utilizados para desinfección de la piel, en limpieza de instrumental quirúrgico, y en superficies a una concentración al 0.5%.

10.2 Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico se realizó con el programa computacional *Excel 2000* para Windows

a) Uso de promotores de penetración (Azona[®] y Transcutol[®])

10.2.1 Estudios de penetración *in vivo*

- Cantidad de naproxeno permeada a través de EC humano

Voluntarios	Transcutol DI	Transcutol/Azona DI	Transcutol DF	Transcutol/Azona DF
1	0.2991	0.7031	0.2384	0.5188
2	0.3291	0.9629	0.2277	0.4721
3	0.3031	0.8845	0.1988	0.4646
4	0.2708	0.7774	0.1795	0.5203
5	0.2916	1.0679	0.2387	0.5849
6	0.2957	0.7269	0.2306	0.4369
Promedio	0.2982	0.8538	0.2190	0.4996
DS	0.0188	0.1437	0.0242	0.0528
CV	6.3044	16.8306	11.0502	10.5684

Para determinar si los datos obtenidos se ajustaron a una distribución normal fue necesario realizar la prueba de *Bondad de Ajuste de Kolmogorov-Smirnov*.

Donde se establece que:

H_0 = La muestra se ajusta o proviene de una distribución normal

H_i = La muestra no se ajusta a una distribución normal o proviene de una distribución diferente a la normal

FS = Frecuencia acumulada/total de datos

FT = Se obtiene a partir de z y la tabla F del Daniel

$D = (FS-FT)$

FA = Frecuencia acumulada

Se acepta H_0 si $D_{max} < N$

(D_{max} en los datos se resalta en negritas)

Cuadro N (para n = 6) Daniel: Prueba bilateral

p = 0.80	P = 0.90	p = 0.95	p = 0.98	p = 0.99
N = 0.410	N = 0.468	N = 0.519	N = 0.577	N = 0.617

Cuadro de prueba de Bondad de ajuste de Kolgomorov-Smirnov para la cantidad de naproxeno sódico recuperada en los tapes al aplicar las Formulaciones II y III mediante dosis infinita (celda de perfusión) y dosis finita (capa)

Transcutol® DI		Promedio: 0.2982			DS: 0.0188	
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
0.2708	1	1	0.1666	-1.4554	0.0735	0.0931
0.2916	1	2	0.3333	-0.3538	0.3632	-0.0298
0.2957	1	3	0.5	-0.1318	0.4483	0.0517
0.2991	1	4	0.6666	0.0478	0.516	0.1506
0.3031	1	5	0.8333	0.2593	0.5987	0.2346
0.3291	1	6	1	1.6338	0.9484	0.0516

Transcutol®/Azona® DI		Promedio: 0.8538			DS: 0.1437	
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
0.7031	1	1	0.1666	-1.0479	0.1492	0.0174
0.7269	1	2	0.3333	-0.8826	0.1894	0.1439
0.7774	1	3	0.5	-0.5315	0.2981	0.2019
0.8845	1	4	0.6666	0.2136	0.5832	0.0834
0.9629	1	5	0.8333	0.7589	0.7734	0.0599
1.0679	1	6	1	1.4894	0.9306	0.0694

Transcutol® DF		Promedio: 0.2190			DS: 0.0242	
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
0.1795	1	1	0.1666	-1.6269	0.0526	0.1140
0.1988	1	2	0.3333	-0.8292	0.2061	0.1272
0.2277	1	3	0.5	0.3608	0.646	-0.146
0.2306	1	4	0.6666	0.4799	0.6808	-0.0141
0.2384	1	5	0.8333	0.8023	0.7881	0.0452
0.2387	1	6	1	0.8130	0.791	0.2090

Transcutol®/Azona® DF		Promedio: 0.4996			DS: 0.05288	
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
0.4369	1	1	0.1666	-1.1862	0.1190	0.0476
0.4721	1	2	0.3333	-0.5189	0.3050	0.0283
0.4867	1	3	0.5	-0.2435	0.4052	0.0948
0.5188	1	4	0.6666	0.3634	0.6406	0.0260
0.5203	1	5	0.8333	0.3906	0.6517	0.1816
0.5849	1	6	1	1.6127	0.9463	0.0537

Como se puede observar en todos los casos $D_{max} < N$ (a cualquier nivel de α) por lo tanto:

D es insignificante a cualquier nivel razonable y por lo tanto se acepta H_0 que me dice que mis datos se ajustan a *Distribución normal*.

Análisis de varianza de un factor para la cantidad de naproxeno permeada a través de EC humano.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1.4439	3	0.4813	78.896	2.94 X 10 ⁻¹¹	3.0983
Dentro de los grupos	0.1220	20	0.0061			
Total	1.5659	23				

Del ANOVA realizado se tiene $F_{calculada} > F_{Tablas}$ por tanto se rechaza H_0 que suponía todas las medias iguales, por tanto hay diferencia en al menos un par de medias.

Prueba de Tukey

$$DVS = q_{a, k, N-k} (\text{Promedio de Cuadrados}/n)^{1/2}$$

Donde:

DVS = Diferencia verdaderamente significativa

a = Nivel de significancia elegido

k = Número de medias del experimento

N = Número total de observaciones del experimento

n = Número total de observaciones en el tratamiento

PC = Promedio de los cuadrados dentro de los grupos (Error)

q = Se obtiene de tablas con los valores de a, k y N-k (Daniel, 1993)

Si DVS es mayor al cambio absoluto entonces no hay diferencia (las diferencias están subrayadas en negritas)

DVS = 0.1262

	Transcutol [®] /Azona [®] DI	Transcutol [®] DI	Transcutol [®] /Azona [®] DF	Transcutol [®] DF
Transcutol [®] /Azona [®] DI	0	X	X	X
Transcutol [®] DI	-0.55552729	0	X	X
Transcutol [®] /Azona [®] DF	0.07927347	0.63480075	0	X
Transcutol [®] DF	-0.20135747	0.35416982	-0.28063093	0

- Distancia de penetración de naproxeno sódico a través de EC humano

Voluntarios	Transcutol®/Azona® DI	Transcutol® DI	Transcutol®/Azona® DF	Transcutol DF
1	10.85	5.1	5.46	3.55
2	8.8	5.4	6.95	4.1
3	12.05	5.4	7.96	3.65
4	8.52	5.44	5.9	3.7
5	11.55	5.45	5.37	3.85
6	10.45	5.7	5.34	3.7
Promedio	10.37	5.415	6.1633	3.7583
DS	1.4379	0.1911	1.0694	0.1934
CV	13.8659	3.5290	17.3510	5.1459

Para determinar si los datos obtenidos se ajustaron a una distribución normal fue necesario realizar la prueba de *Bondad de Ajuste de Kolmogorov-Smirnov*.

Donde se establece que:

H_0 = La muestra se ajusta o proviene de una distribución normal

H_i = La muestra no se ajusta a una distribución normal o proviene de una distribución diferente a la normal

FS = Frecuencia acumulada/total de datos

FT = Se obtiene a partir de z y la tabla F del Daniel

$D = (FS-FT)$

FA = Frecuencia acumulada

Se acepta H_0 si $D_{max} < N$

(D_{max} en los datos se resalta en negritas)

Cuadro N (para n = 6) Daniel: Prueba bilateral

p = 0.80	p = 0.90	p = 0.95	p = 0.98	p = 0.99
N = 0.41	N = 0.468	N = 0.519	N = 0.577	N = 0.617

Cuadro de prueba de *Bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov* para la distancia de penetración de naproxeno sódico a través de EC humano al aplicar las Formulaciones II y III mediante dosis infinita (celda de perfusión) y dosis finita (capa)

Transcutol® DI		Promedio: 10.37		DS: 1.43		
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
8.52	1	1	0.1666	-1.2937	0.0985	0.0708
8.8	1	2	0.3333	-1.0979	0.1379	0.1954
10.45	1	3	0.5	0.0559	0.5199	-0.0199
10.85	1	4	0.6666	0.3356	0.6293	0.0373
11.55	1	5	0.8333	0.8251	0.7939	0.0394
12.05	1	6	1	1.1748	0.8790	0.121

Transcutol®/Azona® DI						
			Promedio: 5.415	DS: 0.1911		
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
5.1	1	1	0.1666	-1.6483	0.0505	0.1161
5.4	2	3	0.5000	-0.0784	0.1894	0.3106
5.44	1	4	0.6666	0.1308	0.5517	0.1149
5.45	1	5	0.8333	0.1831	0.5714	0.2619
5.7	1	6	1	1.4913	0.9319	0.0681

Transcutol® DF						
			Promedio: 6.1633	DS: 1.0694		
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
5.34	1	1	0.1666	-0.7698	0.2148	-0.0482
5.37	1	2	0.3333	-0.7418	0.2296	0.1037
5.46	1	3	0.5	-0.6576	0.2578	0.2422
5.9	1	4	0.6666	-0.2462	0.4052	0.2614
6.95	1	5	0.8333	0.7356	0.7774	0.0559
7.96	1	6	1	1.6801	0.9535	0.0465

Transcutol®/Azona® DF						
			Promedio: 3.7583	DS: 0.1934		
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
3.55	1	1	0.1666	-1.0770	0.1423	0.0243
3.65	1	2	0.3333	-0.5599	0.2912	0.0421
3.7	1	4	0.6666	-0.3014	0.3821	0.2845
3.85	1	5	0.8333	0.4741	0.6808	0.1525
4.1	1	6	1	1.7668	0.9608	0.0392

Como se puede observar en todos los casos $D_{max} < N$ (a cualquier nivel de α) por lo tanto:

D es insignificante a cualquier nivel razonable y por lo tanto se acepta H_0 que me dice que mis datos se ajustan a *Distribución normal*.

Análisis de varianza para la distancia de penetración de naproxeno permeada a través de EC humano.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	142.5761	3	47.5253	57.8626	4.8788E-10	3.0983
Dentro de los grupos	16.4269	20	0.8213			
Total	159.0031	23				

Del ANOVA realizado se tiene $F_{\text{calculada}} > F_{\text{Tablas}}$ por tanto se rechaza H_0 que suponía todas las medias iguales, por tanto hay diferencia en al menos un par de medias.

Prueba de Tukey

$$DVS = q_{a, k, N-k} (\text{Promedio de Cuadrados}/n)^{1/2}$$

Donde:

DVS = Diferencia verdaderamente significativa

a = Nivel de significancia elegido

k = Número de medias del experimento

N = Número total de observaciones del experimento

n = Número total de observaciones en el tratamiento

PC = Promedio de los cuadrado dentro de los grupos (Error)

q = Se obtiene de tablas con los valores de a, k y N-k (Daniel, 1993)

Si DVS es mayor al cambio absoluto entonces no hay diferencia (las diferencias están subrayadas en negritas)

$$DVS = \mathbf{1.4651}$$

	Transcutol [®] /Azona [®] DI	Transcutol [®] DI	Transcutol [®] /Azona [®] DF	Transcutol [®] DF
Transcutol [®] /Azona [®] DI	0	X	X	X
Transcutol [®] DI	4.9550	0	X	X
Transcutol [®] /Azona [®] DF	4.2066	-0.7493	0	X
Transcutol [®] DF	6.6116	1.6556	2.405	0

10.2.2 TEWL

Pruebas estadísticas correspondientes a las lecturas de TEWL de las formulaciones II y III.

Voluntarios	Blanco	Formulación II	Formulación III
1	10.428	21.1234	30.0488
2	9.089	19.7689	31.2367
3	12.3654	23.2155	35.6543
4	10.7256	21.3195	36.7439
5	10.34	20.1263	32.9621
6	9.62	18.2635	34.1589
Promedio	10.428	20.6361	33.4674
DS	1.1221	1.6732	2.5657
CV	10.7605	8.1083	7.6662

Cambios absolutos (formulación menos el control) de valores de TEWL para las formulaciones II y III.

Voluntarios	Formulación II	Formulación III
1	10.6954	19.6208
2	10.6799	22.1477
3	10.8501	23.2889
4	10.5939	26.0183
5	9.7863	22.6221
6	8.6435	24.5389
Promedio	10.2081	23.0394
DS	0.8540	2.18360
CV	8.3662	9.4776

Para determinar si los datos obtenidos se ajustaron a una distribución normal fue necesario realizar la prueba de Bondad de Ajuste de Kolmogorov-Smirnov.

Donde se establece que:

H_0 = La muestra se ajusta o proviene de una distribución normal

H_i = La muestra no se ajusta a una distribución normal o proviene de una distribución diferente a la normal

FS = Frecuencia acumulada/total de datos

FT = Se obtiene a partir de z y la tabla F del Daniel

$D = (FS-FT)$

FA = Frecuencia acumulada

Se acepta H_0 si $D_{max} < N$

(D_{max} en los datos se resalta en negritas)

Cuadro N (para n = 6) Daniel: Prueba bilateral

p = 0.80	p = 0.90	p = 0.95	p = 0.98	p = 0.99
N = 0.41	N = 0.468	N = 0.519	N = 0.577	N = 0.617

Prueba de Bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov para los valores de TEWL obtenidos para el blanco y las formulaciones II y III con promotores de penetración.

TEWL (g.h.cm ⁻²) Blanco		Promedio: 10.428		DS: 1.1221		
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
9.089	1	1	0.1666	-1.1932	0.1170	0.0496
9.62	1	2	0.3333	-0.7200	0.2358	0.0975
10.34	1	3	0.5000	-0.0784	0.4721	0.0279
10.428	1	4	0.6666	0.0000	0.5000	0.1666
10.7256	1	5	0.8333	0.2652	0.6026	0.2307
12.3654	1	6	1	1.7265	0.9573	0.0427

TEWL (g.h.cm⁻²) Formulación II Promedio: 20.6361 DS: 1.6732						
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
18.2635	1	1	0.1666	-1.4180	0.0793	0.0873
19.7689	1	2	0.3333	-0.5182	0.3050	0.0283
20.1263	1	3	0.5000	-0.3046	0.3821	0.1179
21.1234	1	4	0.6666	0.2912	0.6141	0.0525
21.3195	1	5	0.8333	0.4084	0.6554	0.1779
23.2155	1	6	1	1.5415	0.9382	0.0618

TEWL (g.h.cm⁻²) Formulación III Promedio: 33.4674 DS: 2.5657						
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
30.0488	1	1	0.1666	-1.3324	0.0918	0.0748
31.2367	1	2	0.3333	-0.8694	0.1949	0.1384
32.9621	1	3	0.5000	-0.1969	0.4247	0.0753
34.1589	1	4	0.6666	0.2695	0.6026	0.0640
35.6543	1	5	0.8333	0.8523	0.8023	0.031
36.7439	1	6	1	1.2770	0.8980	0.1020

Prueba de Bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov para los cambios absolutos de TEWL después de que se aplicaron y se retiraron las formulaciones II y III de EC humano.

TEWL (g.h.cm⁻²) Formulación II Promedio: 10.2081 DS: 0.8540						
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
8.6435	1	1	0.1666	-1.8320	0.0336	0.1330
9.7863	1	2	0.3333	-0.4939	0.3121	0.0212
10.5939	1	3	0.5000	0.4517	0.6736	-0.173
10.6799	1	4	0.6666	0.5524	0.7088	-0.042
10.6954	1	5	0.8333	0.5706	0.7157	0.1176
10.8501	1	6	1	0.7517	0.7734	0.2266

TEWL (g.h.cm⁻²) Formulación III Promedio: 23.0394 DS: 2.1836						
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
19.6208	1	1	0.1666	-1.5655	0.0594	0.1072
22.1477	1	2	0.3333	-0.4083	0.3446	-0.011
22.6221	1	3	0.5000	-0.1911	0.4247	0.0753
23.2889	1	4	0.6666	0.1142	0.5438	0.1228
24.5389	1	5	0.8333	0.6686	0.7454	0.0879
26.0183	1	6	1	1.3642	0.9131	0.0869

Análisis de varianza de un factor para las determinaciones de TEWL una vez aplicadas y retiradas las formulaciones II y III de EC humano.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1599.3293	2	799.6646	215.4316	6.43793E-12	3.6823
Dentro de los grupos	53.20890	15	3.5472			
Total	1652.5382	17				

Del ANOVA realizado se tiene $F_{\text{calculada}} > F_{\text{Tablas}}$ por tanto se rechaza H_0 que suponía todas las medias iguales, por tanto hay diferencia en al menos un par de medias.

Prueba de Tukey

$$DVS = q_{a, k, N-k} (\text{Promedio de Cuadrados}/n)^{1/2}$$

Donde:

DVS = Diferencia verdaderamente significativa

a = Nivel de significancia elegido

k = Número de medias del experimento

N = Número total de observaciones del experimento

n = Número total de observaciones en el tratamiento

PC = Promedio de los cuadrado dentro de los grupos (Error)

q b= Se obtiene de tablas con los valores de a, k y N-k (Daniel, 1993)

Si DVS es mayor al cambio absoluto entonces no hay diferencia (las diferencias están subrayadas en negritas)

$$DVS = \mathbf{2.8218}$$

	Blanco	Formulación II	Formulación III
Blanco	0	X	X
Formulación II	-10.2081	0	X
Formulación III	-23.0394	-12.8312	0

10.2.3 Infrarrojos TF/RTA

Pruebas estadísticas de las bandas correspondientes a los estiramientos simétricos (localizados a 2850 cm^{-1}) de las cadenas alquílicas de los lípidos del EC obtenidos después de aplicar por un periodo de 90 minutos las formulaciones II y III.

Voluntarios	Blanco	Formulación II	Formulación III
1	2851.6	2850.6	2851.6
2	2850.6	2851.6	2853.5
3	2849.6	2851.3	2852.3
4	2849.6	2850.6	2851.6
5	2849.5	2850.6	2850.6
6	2850.1	2850.6	2852
Promedio	2850.1666	2850.8833	2851.9333
DS	0.8164	0.4490	0.9584
CV	0.0286	0.0157	0.03360

Cambio absoluto (formulación menos control) de los números de onda de las bandas correspondientes a los estiramientos simétricos (localizados aproximadamente a 2850 cm^{-1}) de las cadenas alquílicas de los lípidos de EC obtenidos después de que se aplicaron y retiraron las formulaciones II y III.

Voluntarios	Formulación II	Formulación III
1	-1	0
2	1	2.9
3	1.7	2.7
4	1	2
5	1.1	1.1
6	0.5	1.9
Promedio	0.7166	1.7666
DS	0.9239	1.0764
CV	128.9219	60.9290

Prueba de Bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov para la banda de estiramiento simétrico a 2850 cm^{-1} de las cadenas alquílicas de los lípidos de EC después de que se aplicaron y se retiraron las formulaciones II y III.

2850 cm^{-1} Blanco						
			Promedio:2850.1666		DS: 0.8164	
X	Frecuencia	FA	FS=(FA/FT)	Z=(X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
2849.5	1	1	0.1666	-0.8165	0.2090	-0.042
2849.6	2	3	0.5000	-0.6940	0.2451	0.2549
2850.1	1	4	0.6666	-0.0815	0.4681	0.1985
2850.6	1	5	0.8333	0.5308	0.7019	0.1314
2851.6	1	6	1	1.7557	0.9599	0.0401

2850 cm⁻¹ Formulación II						
			Promedio: 2850.8833	DS: 0.4490		
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
2850.6	4	4	0.6666	-0.6309	0.2643	0.4023
2851.3	5	5	0.8333	0.9280	0.8212	0.0121
2851.6	6	6	1	1.5962	0.9441	0.0559

2850 cm⁻¹ Formulación III						
			Promedio:2851.9333	DS: 0.9584		
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
2850.6	1	1	0.1666	-1.3911	0.0823	0.0843
2851.6	2	3	0.5000	-0.3477	0.3669	0.1331
2852	1	4	0.6666	0.0695	0.5239	0.1427
2852.3	1	5	0.8333	0.3826	0.6480	0.1853
2853.5	1	6	1	1.6347	0.9484	0.0516

Prueba de Bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov para los cambios de número de onda absolutos de la banda de estiramiento simétrico a 2850 cm⁻¹ de las cadenas alquílicas de los lípidos de EC después de que se aplicaron y se retiraron las formulaciones II y III.

2850 cm⁻¹ Formulación II						
			Promedio: 0.7166	DS: 0.9239		
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
-1	1	1	0.1666	-1.8579	0.0322	0.1344
0.5	1	2	0.3333	-0.2344	0.4090	-0.075
1	2	4	0.6666	0.3067	0.6179	0.3599
1.1	1	5	0.8333	0.4149	0.6591	0.1742
1.7	1	6	1	1.0644	0.8554	0.1446

2850 cm⁻¹ Formulación III						
			Promedio: 1.7666	DS: 1.0764		
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
0	1	1	0.1666	-1.6412	0.0505	0.1161
1.1	1	2	0.3333	-0.6192	0.2709	0.0624
1.9	1	3	0.5000	0.1239	0.5478	-0.047
2	1	4	0.6666	0.2168	0.5832	0.0834
2.7	1	5	0.8333	0.8671	0.8051	0.0282
2.9	1	6	1	1.0529	0.8531	0.1469

Pruebas estadísticas de las bandas correspondientes a los estiramientos asimétricos (localizados a 2920 cm⁻¹) de las cadenas alquílicas de los lípidos del EC obtenidos después de aplicar por un periodo de 90 minutos las formulaciones II y III.

Voluntarios	Blanco	Formulación II	Formulación III
1	2920.5	2918.6	2919.5
2	2918.1	2918.1	2918.1
3	2917.6	2918.5	2919.5
4	2917.6	2918.1	2919.1
5	2917.1	2917.6	2917.6
6	2918.1	2918.1	2918.6
Promedio	2918.1666	2918.1666	2918.7333
DS	1.2027	0.3559	0.7763
CV	0.0412	0.0121	0.0265

Cambio absoluto (formulación menos control) de los números de onda de las bandas correspondientes a los estiramientos simétricos (localizados aproximadamente a 2920 cm^{-1}) de las cadenas alquílicas de los lípidos de EC obtenidos después de que se aplicaron y retiraron las formulaciones II y III.

Voluntarios	Formulación II	Formulación III
1	-1.9	-1
2	0	0
3	0.9	1.9
4	0.5	1.5
5	0.5	0.5
6	0	0.5
Promedio	0	0.5666
DS	0.9919	1.0424

Prueba de Bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov para la banda de estiramiento simétrico a 2920 cm^{-1} de las cadenas alquílicas de los lípidos de EC después de que se aplicaron y se retiraron las formulaciones II y III.

2920 cm⁻¹ Blanco						
Promedio:2918.1666			DS: 1.2027			
X	Frecuencia	FA	FS=(FA/FT)	Z=(X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
2917.1	1	1	0.1666	-0.8868	0.1894	-0.022
2917.6	2	3	0.5000	-0.4711	0.3192	0.1808
2918.1	2	5	0.8333	-0.0553	0.4801	0.3532
2920.5	1	6	1	1.9401	0.9738	0.0262

2920 cm⁻¹ Formulación II						
Promedio: 2918.1666			DS: 0.3559			
X	Frecuencia	FA	FS=(FA/FT)	Z=(X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
2917.6	1	1	0.1666	-1.5920	0.0559	0.1107
2918.1	3	4	0.6666	-0.1871	0.4286	0.238
2918.5	1	5	0.8333	0.9367	0.8238	0.0095
2918.6	1	6	1	1.2177	0.8869	0.1131

2920 cm⁻¹ Formulación III						
			Promedio: 2918. 7333	DS: 0.7763		
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
2917.6	1	1	0.1666	-1.4598	0.0735	0.0931
2918.1	1	2	0.3333	-0.8157	0.2090	0.1243
2918.6	1	3	0.5000	-0.1717	0.4325	0.0675
2919.1	1	4	0.6666	0.4723	0.6808	-0.014
2919.5	2	6	1	0.9876	0.8365	0.1635

Prueba de Bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov para los cambios de número de ondas absolutos de la banda de estiramiento simétrico a 2920 cm⁻¹ de las cadenas alquílicas de los lípidos de EC después de que se aplicaron y se retiraron las formulaciones II y III.

2920 cm⁻¹ Formulación II						
			Promedio: 0.0	DS: 0.9919		
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
-1.9	1	1	0.1666	-1.9155	0.0281	0.1385
0.0	2	3	0.5000	0.0000	0.5000	0.0000
0.5	2	5	0.8333	0.5040	0.6915	0.1418
0.9	1	6	1	0.9073	0.8159	0.1841

2920 cm⁻¹ Formulación III						
			Promedio: 0.5666	DS: 1.0424		
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
-1	1	1	0.1666	-1.5028	0.0668	0.0998
0	1	2	0.3333	-0.5435	0.2946	0.0387
0.5	2	4	0.6666	-0.0638	0.4761	0.1905
1.5	1	5	0.8333	0.8954	0.8133	0.0200
1.9	1	6	1	1.2791	0.8980	0.1020

Como se puede observar en todos los casos $D_{max} < N$ (a cualquier nivel de α) por lo tanto:

D es insignificante a cualquier nivel razonable y por lo tanto se acepta H_0 que me dice que mis datos se ajustan a *Distribución normal*.

Análisis de varianza de un factor para los cambios en números de onda de la banda de estiramiento simétrico a 2850 cm⁻¹.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	11.2411	2	5.6205	10.8528	0.0012	3.6823
Dentro de los grupos	7.7683	15	0.5178			
Total	19.0094	17				

Análisis de varianza de un factor para los cambios en números de onda para la banda de estiramiento simétrico a 2920 cm⁻¹.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1.2844	2	0.6422	0.8854	0.4330	3.6823
Dentro de los grupos	10.88	15	0.72533			
Total	12.1644	17				

Del ANOVA realizado para la banda de estiramiento simétrico a 2850 cm⁻¹ se tiene $F_{calculada} > F_{Tablas}$ por tanto se rechaza H_0 que suponía todas las medias iguales, por tanto hay diferencia en al menos un par de medias.

Prueba de Tukey

$$DVS = q_{a, k, N-k} (\text{Promedio de Cuadrados}/n)^{1/2}$$

Donde:

DVS = Diferencia verdaderamente significativa

a = Nivel de significancia elegido

k = Número de medias del experimento

N = Número total de observaciones del experimento

n = Número total de observaciones en el tratamiento

PC = Promedio de los cuadrado dentro de los grupos (Error)

q = Se obtiene de tablas con los valores de a, k y N-k (Daniel, 1993)

Si DVS es mayor al cambio absoluto entonces no hay diferencia (las diferencias están subrayadas en negritas)

$$DVS = \mathbf{1.0482}$$

	Blanco	Formulación II	Formulación III
Blanco	0	0.8833	1.9333
Formulación II	X	0	1.05
Formulación III	X	X	0

b) Uso de iontoforesis (Digluconato de clorhexidina)

10.2.4. Estudios de penetración clorhexidina

- Evaluaciones *in vitro* por difusión pasiva e iontoforesis

Cantidad de DGC (μg) permeado a través de piel de oreja de cerdo

Replicas	DGC 0.1% DP	DGC 1% DP	Hibitane® DP	DGC 0.1% Iont	DGC 1% Iont	Hibitane® Iont.
1	51.1264	168.5340	201.5550	191.1800	248.7000	351.486
2	42.5088	100.6560	147.3390	196.348	265.9500	381.652
3	67.0688	180.4140	200.5020	172.6426	217.9140	372.36
Promedio	52.6277	145.1885	181.2494	186.7235	244.1880	368.4993
DS	12.4607	43.0307	31.0021	12.4652	24.3337	15.4491
CV	23.6770	29.6378	17.1046	6.6757	9.9651	4.1924

Para determinar si los datos obtenidos se ajustaron a una distribución normal fue necesario realizar la prueba de Bondad de Ajuste de Kolmogorov-Smirnov.

Donde se establece que:

H_0 = La muestra se ajusta o proviene de una distribución normal

H_1 = La muestra no se ajusta a una distribución normal o proviene de una distribución diferente a la normal

FS = Frecuencia acumulada/total de datos

FT = Se obtiene a partir de z y la tabla F del Daniel

D = (FS-FT)

FA = Frecuencia acumulada

Se acepta H_0 si $D_{max} < N$

(D_{max} en los datos se resalta en negritas)

Cuadro N (para n = 3) Daniel: Prueba bilateral

p = 0.80	p = 0.90	p = 0.95	p = 0.98	p = 0.99
N = 0.565	N = 0.636	N = 0.708	N = 0.785	N = 0.829

Cuadro de prueba de Bondad de ajuste de Kolgomorov-Smirnov para la cantidad de DGC recuperada en los tapes al aplicar las soluciones de DGC (0.1, 1% e Hibitane[®] al 0.5% en etanol al 70%) en piel de oreja de cerdo

DGC 0.1% DP		Promedio: 52.6277			DS: 12.4607	
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
42.5088	1	1	0.3333	-0.8120	0.2090	0.1243
51.1264	1	2	0.6666	-0.1204	0.4522	0.2144
67.0688	1	3	1	1.1589	0.8749	0.1251

DGC 1% DP		Promedio: 145.1885			DS: 43.0307	
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
100.6560	1	1	0.3333	-1.0349	0.1515	0.1818
168.5340	1	2	0.6666	0.5425	0.7054	-0.038
180.4140	1	3	1	0.8186	0.7910	0.2090

Hibitane[®] DP		Promedio: 181.2494			DS: 31.0021	
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
147.3390	1	1	0.3333	-1.0938	0.1379	0.0287
200.5020	1	2	0.6666	0.6210	0.7324	-0.0658
201.5550	1	3	1	0.6549	0.7422	0.2578

DGC 0.1% Iontoforesis		Promedio: 186.7235			DS: 12.4652	
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
172.6426	1	1	0.3333	-1.1296	0.1314	0.2019
191.1800	1	2	0.6666	0.3575	0.6368	0.0298
196.348	1	3	1	0.7721	0.7794	0.2206

DGC 1% Iontoforesis		Promedio: 244.1880			DS: 24.3337	
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
217.9140	1	1	0.3333	-1.0797	0.1423	0.1910
248.7000	1	2	0.6666	0.1854	0.5714	0.0952
265.9500	1	3	1	0.8943	0.8133	0.1867

Hibitane® Iontoforesis		Promedio: 368.4993			DS: 15.4491	
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
351.486	1	1	0.3333	-1.1012	0.1357	0.1976
372.36	1	2	0.6666	0.2498	0.5448	0.1218
381.652	1	3	1	0.8513	0.8023	0.1977

Como se puede observar en todos los casos $D_{max} < N$ (a cualquier nivel de α) por lo tanto:

D es insignificante a cualquier nivel razonable y por lo tanto se acepta H_0 que me dice que mis datos se ajustan a *Distribución normal*.

Análisis de varianza de un factor para la cantidad de DGC permeada a través de piel de oreja de cerdo.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	166344.3133	5		53.4955	8.68575E-08	3.1058
Dentro de los grupos	7462.7966	12	621.8997			
Total	173807.11	17				

Del ANOVA realizado se tiene $F_{calculada} > F_{Tablas}$ por tanto se rechaza H_0 que suponía todas las medias iguales, por tanto hay diferencia en al menos un par de medias.

Prueba de Tukey

$$DVS = q_{\alpha, k, N-k} (\text{Promedio de Cuadrados}/n)^{1/2}$$

Donde:

DVS = Diferencia verdaderamente significativa

α = Nivel de significancia elegido

k = Número de medias del experimento

N = Número total de observaciones del experimento

n = Número total de observaciones en el tratamiento

PC = Promedio de los cuadrado dentro de los grupos (Error)

q = Se obtiene de tablas con los valores de α , k y N-k (Daniel, 1993)

Si DVS es mayor al cambio absoluto entonces no hay diferencia (las diferencias están subrayadas en negritas)

$$DVS = \mathbf{68.39008}$$

	DGC 1% DP	Hibitane® DP	DGC 0.1% DP	DGC 1% Ionto	Hibitane® Ionto	DGC 0.1% Ionto
DGC 1% DP	0	X	X	X	X	X
Hibitane® DP	-41.712	0	X	X	X	X
DGC 0.1% DP	88.318	130.031	0	X	X	X
DGC 1% Ionto	-102.1018	-60.3893	-190.42	0	X	X
Hibitane® Ionto	-226.4131	-184.7006	-314.7313	-124.3113	0	X
DGC 0.1% Ionto	-44.6373	-2.9248	-132.9555	57.4644	181.7758	0

Evaluaciones *in vivo* para la solución de hibitane® por difusión pasiva e iontoforesis

Cantidad de DGC (μg) permeado a través de EC humano en voluntarios sanos

Voluntarios	Hibitane® DP	Hibitane® Ionto
1	37.6200	147.7240
2	25.9020	158.0760
3	39.2580	162.3400
4	32.256	153.14
Promedio	33.3290	155.2236
DS	6.0315	6.3068
CV	18.0969	4.0630

Para determinar si los datos obtenidos se ajustaron a una distribución normal fue necesario realizar la prueba de Bondad de Ajuste de Kolmogorov-Smirnov.

Donde se establece que:

H_0 = La muestra se ajusta o proviene de una distribución normal

H_1 = La muestra no se ajusta a una distribución normal o proviene de una distribución diferente a la normal

FS = Frecuencia acumulada/total de datos

FT = Se obtiene a partir de z y la tabla F del Daniel

D = (FS-FT)

FA = Frecuencia acumulada

Se acepta H_0 si $D_{max} < N$

(D_{max} en los datos se resalta en negritas)

Cuadro N (para n = 4) Daniel: Prueba bilateral

p = 0.80	p = 0.90	p = 0.95	p = 0.98	p = 0.99
N = 0.493	N = 0.565	N = 0.624	N = 0.689	N = 0.734

Cuadro de prueba de Bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov para la cantidad de DGC recuperada en los tapes al aplicar la solución de hibitane[®] al 0.5% en etanol al 70% *in vivo*.

Hibitane[®] DP		Promedio: 33.3290			DS: 6.0315	
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
25.9020	1	1	0.25	-1.2313	0.1093	0.1407
32.2560	1	2	0.50	-0.1778	0.4325	0.0675
37.6200	1	3	0.75	0.7114	0.7611	-0.011
39.2580	1	4	1	0.9830	0.8365	0.1635

Hibitane[®] Iontoforesis		Promedio: 155.2236			DS: 6.3068	
X	Frecuencia	FA	FS= (FA/FT)	Z= (X-prom)/DS	FT (tabla)	FS-FT
147.7240	1	1	0.25	-1.1891	0.1190	0.1310
153.14	1	2	0.50	-0.3303	0.3707	0.1293
158.0760	1	3	0.75	0.4522	0.6736	0.0764
162.3400	1	4	1	1.1283	0.8686	0.1314

Como se puede observar en todos los casos $D_{max} < N$ (a cualquier nivel de α) por lo tanto:

D es insignificante a cualquier nivel razonable y por lo tanto se acepta H_0 que me dice que mis datos se ajustan a *Distribución normal*.

Análisis de varianza de un factor para la cantidad de DGC permeada a través de piel de oreja de cerdo.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	29554.1534	1	29554.1534	776.1567	1.41474E-07	5.9873
Dentro de los grupos	228.4653	6	38.0775			
Total	2978.6187	7				

Del ANOVA realizado se tiene $F_{\text{calculada}} > F_{\text{Tablas}}$ por tanto se rechaza H_0 que suponía todas las medias iguales, por tanto hay diferencia en al menos un par de medias. En este caso solo se tienen dos medias por lo que la prueba de Tukey nos comprobará si existe una diferencia verdaderamente significativa entre ellas.

Prueba de Tukey

$$DVS = q_{a, k, N-k} (\text{Promedio de Cuadrados}/n)^{1/2}$$

Donde:

DVS = Diferencia verdaderamente significativa

a = Nivel de significancia elegido

k = Número de medias del experimento

N = Número total de observaciones del experimento

n = Número total de observaciones en el tratamiento

PC = Promedio de los cuadrado dentro de los grupos (Error)

q = Se obtiene de tablas con los valores de a, k y N-k (Daniel, 1993)

Si DVS es mayor al cambio absoluto entonces no hay diferencia (las diferencias están subrayadas en negritas)

$$DVS = \mathbf{10.6753}$$

	Hibitane [®] DP	Hibitane [®] Ionto
Hibitane [®] DP	0	X
Hibitane [®] Ionto	-121.8950	0

10.2.5 Estudios microbiológicos

- Evaluaciones *in vitro*

Análisis de varianza de un factor para las UFC obtenidas para la dilución 1:100 después removidos los “tape strippings” a piel de oreja de cerdo.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	29554.1534	1	29554.1534	776.1567	1.41474E-07	5.9873
Dentro de los grupos	228.4653	6	38.0775			
Total	2978.6187	7				

Del ANOVA realizado se tiene $F_{calculada} > F_{Tablas}$ por tanto se rechaza H_0 que suponía todas las medias iguales, por tanto hay diferencia en al menos un par de medias. En este caso solo se tienen dos medias por lo que la prueba de Tukey nos comprobará si existe una diferencia verdaderamente significativa entre ellas.

Prueba de Tukey

$$DVS = q_{\alpha, k, N-k} (\text{Promedio de Cuadrados}/n)^{1/2}$$

Donde:

DVS = Diferencia verdaderamente significativa

α = Nivel de significancia elegido

k = Número de medias del experimento

N = Número total de observaciones del experimento

n = Número total de observaciones en el tratamiento

PC = Promedio de los cuadrados dentro de los grupos (Error)

q = Se obtiene de tablas con los valores de α , k y N-k (Daniel, 1993)

Si DVS es mayor al cambio absoluto entonces no hay diferencia (las diferencias están subrayadas en negritas)

$$DVS = \mathbf{33.9774}$$

	NT Ionto	DGC 0.1% Ionto	DGC 1% Ionto	Hibitane® Ionto	NT DP	DGC 0.1% DP	DGC 1% DP	Hibitane® DP
NT Ionto	0	X	X	X	X	X	X	X
DGC 0.1% Ionto	-10.2500	0	X	X	X	X	X	X
DGC 1% Ionto	-16	-5.7500	0	X	X	X	X	X
Hibitane® Ionto	-18	-7.7500	-2.	0	X	X	X	X
NT DP	25.7500	36	41.7500	43.7500	0	X	X	X
DGC 0.1% DP	19.6666	29.9166	35.6666	37.6666	-6.0833	0	X	X
DGC 1% DP	13.3333	23.5833	29.3333	31.3333	-12.4166	-6.3333	0	X
Hibitane® DP	7.3750	17.6250	23.3750	25.375	-18.3750	-12.2916	-5.9583	0

- Evaluaciones *in vivo*

Análisis de varianza de un factor para las UFC obtenidas después de removidos los tape strippings en EC humano.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3537.67628	5	707.5352	66.0604	9.6378E-12	2.7108
Dentro de los grupos	214.208333	20	10.7104			
Total	3751.88462	25				

Del ANOVA realizado se tiene $F_{\text{calculada}} > F_{\text{Tablas}}$ por tanto se rechaza H_0 que suponía todas las medias iguales, por tanto hay diferencia en al menos un par de medias. En este caso solo se tienen dos medias por lo que la prueba de Tukey nos comprobará si existe una diferencia verdaderamente significativa entre ellas.

Prueba de Tukey

$$DVS = q_{\alpha, k, N-k} (\text{Promedio de Cuadrados}/n)^{1/2}$$

Donde:

DVS = Diferencia verdaderamente significativa

a = Nivel de significancia elegido

k = Número de medias del experimento

N = Número total de observaciones del experimento

n = Número total de observaciones en el tratamiento

PC = Promedio de los cuadrado dentro de los grupos (Error)

q = Se obtiene de tablas con los valores de a, k y N-k (Daniel, 1993)

Si DVS es mayor al cambio absoluto entonces no hay diferencia (las diferencias están subrayadas en negritas)

DVS = **5.6403**

	NT DP	Hibitane® DP	DGC 0.5% ac DP	NT Ionto	Hibitane® Ionto	DGC 0.5%ac Ionto
NT DP	0	X	X	X	X	X
Hibitane® DP	7.375	0	X	X	X	X
DGC 0.5 % DP	7.4583	0.0833	0	X	X	X
NT Ionto	-36.875	-44.2500	-44.3333	0	X	X
Hibitane Ionto	7.7916	0.4166	0.3333	44.6666	0	X
DGC 0.5%ac Ionto	7.5214	0.1464	0.0631	44.3964	-0.2702	0

