

Universidad CEU Cardenal Herrera

Departamento de Farmacia



Estudio *in vitro* de la absorción transdérmica de
pizotifeno y paliperidona

In vitro transdermal absorption study of pizotifen
and paliperidone

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

César Eulogio Serna Jiménez

Dirigida por:

Alicia López Castellano

Virginia Merino Sanjuán

VALENCIA

2013

LOMO

TESIS DOCTORAL

CÉSAR EULOGIO SERNA JIMÉNEZ

2013

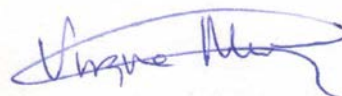
*Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias de la Salud*

La Memoria del trabajo de investigación para la obtención del grado de Doctor realizada por D. César Eulogio Serna Jiménez titulada: “Estudio *in vitro* de la absorción transdérmica de pizotifeno y paliperidona” ha sido realizada bajo la dirección de Dña. Alicia C. López Castellano, Profesora Agregada del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad CEU Cardenal Herrera y Dña. Virginia Merino Sanjuán, Profesora Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Lo que suscriben en Moncada, a 2 de Octubre de 2013



Dña. Alicia C. López Castellano



Dña. Virginia Merino Sanjuán

Agradecimientos

Comenzaré señalando una cosa, siempre que he leído un libro, me salto las páginas de agradecimientos, así que espero que los que normalmente hagáis como yo, no os arrepintáis a mitad de la lectura.

En primer lugar, agradecer a mis directoras de tesis por su cercanía y familiaridad. Por haberme abierto las puertas a la investigación y haberme acompañado en mis primeros “pasitos” en la ciencia. Agradecer a todo el grupo de investigación a Andrés, Cristina, Araceli y María, pero especialmente a Sergio, juntos hemos conquistado planetas, ganado la liga con el Albacete (pobre filipino) y hasta habremos defendido la tesis. Una mención muy especial se merecen el resto de compañeros de otros grupos del CEU, como las chicas fisio, siempre recordaré lo que os metáis con nosotros, hemos tenido suerte de no tener heridos por vuestras armas arrojadas...

Como “hijo de farmacéutico” la farmacia ha sido parte de mi casa, literalmente. Me crie en el mostrador de la farmacia y así es que después de rey, quería ser farmacéutico. Bien sabe Dios, que nada me hubiese gustado más que haber podido aprender de mi padre el oficio, compartir más tiempo él y haber aprendido de su buen hacer. Gracias papá por lo que me diste y lo que me sigues dando.

Gracias a mi madre por su fuerza, por su apoyo, por estar ahí, por sus consejos, por el amor que nos da, por ser el pilar de la familia, por ser una luchadora y sacar adelante a “toda” la familia. Gracias por ser mi madre. Gracias a mis hermanos Víctor y Román, por haberme acompañado y sufrido durante todos estos años. Y gracias a toda mi familia por cada domingo juntos ¡eso sí es una familia!

Esto ha sido todo, espero no haberme olvidado de nadie importante, pero total, como nadie lee los agradecimientos... ¡Maje! Gracias por todo, porque siempre estás a mi lado y me aguantas, que no es poco; porque sin ti, nada sería lo mismo; y porque te quiero. Gracias también a la “cuñi”, a José Luis y a M^a Luisa por acogerme en vuestra casa y por los buenos ratos que hemos compartido.

A todos y todas (como diría la ministra), mil gracias.

Índice

Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Hipótesis y objetivos.....	7
Capítulo 3. Antecedentes.....	11
1. La migraña	12
1.1. Fisiopatología de los ataques de migraña.....	13
1.2. Tratamiento preventivo y del ataque agudo de migraña	14
2. Pizotifeno malato.....	17
3. La esquizofrenia.....	19
3.1. Fisiopatología de la esquizofrenia.....	19
3.2. Tratamiento farmacológico.....	22
4. Paliperidona.....	23
5. Administración transdérmica de fármacos	24
5.1. Estructura y funciones de la piel y sus anexos.....	24
5.2. Vías de penetración cutánea.....	30
5.3. Estrategias promotoras de la absorción transdérmica	33
6. Sistemas Terapéuticos de Administración Transdérmica (STAT)	45
6.1. Clasificación de los STAT	47
7. Métodos experimentales in vitro para el estudio de la absorción transdérmica	51
7.1. Células de difusión con membrana limitante	51
7.2. Técnicas experimentales.....	51
7.3. Aplicación de la teoría de difusión	54
Capítulo 4. Material y métodos.....	59
1. Fármacos de estudio.....	60
2. Método analítico	61
2.1. Condiciones cromatográficas	61
2.2. Validación del método analítico.....	62
2.3. Preparación de la soluciones.....	64
3. Caracterización físico-química.....	65

3.1. Determinación de pKa de pizotifeno	65
3.2. Determinación de log D de pizotifeno	66
3.3. Determinación de solubilidad de pizotifeno.....	67
3.4. Determinación de solubilidad de paliperidona.....	67
4. Estudio de estabilidad de pizotifeno en disolución.....	68
5. Ensayos de absorción transdérmica.....	69
5.1. Preparación de la piel.....	69
5.2. Células de difusión	70
5.3. Promotores de absorción.....	72
5.4. Formulaciones	78
5.5. Ensayos de absorción transdérmica.....	83
5.6. Toma de muestras.....	87
5.7. Extracción del fármaco retenido en piel	88
6. Análisis de datos	89
Capítulo 5. Resultados y discusión.....	93
1. Pizotifeno malato.....	94
1.1. Método analítico	94
1.2. Caracterización físico-química	103
1.3. Estudio de estabilidad	106
1.4. Ensayos <i>in vitro</i> de absorción transdérmica	108
1.5. Caracterización de los STAT	129
2. Paliperidona.....	136
2.1. Método analítico	136
2.2. Caracterización físico-química	140
2.3. Ensayos <i>in vitro</i> de absorción transdérmica	142
Capítulo 6. Conclusiones	159
Capítulo 7. Abstract and conclusions.....	163
Capítulo 8. Bibliografía	167

Capítulo 1. Introducción

Con frecuencia se prescribe a la población infantil medicamentos no autorizados para menores, con posología sólo evaluada en adultos; ante la carencia de formulaciones pediátricas, los profesionales de la salud y los padres recurren a menudo a la peligrosa práctica de utilizar fracciones de formas farmacéuticas destinadas a los adultos o a otras soluciones improvisadas, como la de triturar comprimidos o disolver en agua parte del contenido de una cápsula. Estos hechos dejan al descubierto el gran vacío que existe en la medicación para este grupo de población específico. A nivel mundial, existe una gran inquietud y se intenta fomentar la investigación en el estudio de medicamentos para este grupo de población. En Europa se pretende fomentar esta línea de investigación, así el nuevo Reglamento Europeo de Medicamentos Pediátricos, entre otras medidas, establece la obligatoriedad de presentar proyectos de investigación pediátrica para los nuevos medicamentos que vayan a salir al mercado y sean susceptibles de ser utilizados en población pediátrica. Esta falta de recursos terapéuticos atañe a la dosificación, a las formas farmacéuticas y la falta de información sobre dosis adecuadas a los niños y pone de manifiesto la necesidad de estudios pediátricos.

En este sentido, en mayo de 2007 la Asamblea de la Salud aprobó la resolución WHA60.20 sobre mejora de los medicamentos de uso pediátrico, en la que se fijan objetivos y se piden acciones de los estados miembros y de la OMS para atender la necesidad mundial de medicamentos de uso pediátrico. Más tarde, el 6 de diciembre de 2007, la OMS lanzó una campaña con el título “Medicamentos a la medida de los niños”, cuyo objetivo consiste en aumentar la sensibilización y acelerar las acciones destinadas a mejorar la disponibilidad y el acceso a medicamentos específicos para los menores de 15 años. Un reciente estudio asegura que todavía hoy existe una gran discrepancia entre los ensayos clínicos realizados en adultos y niños. De 440 ensayos analizados, únicamente el 12% fueron pediátricos, de los cuáles cerca del 60% no contaron con financiación privada en comparación con el 35% de los realizados en adultos. Además, gran parte de los ensayos pediátricos no cuentan con estudios exhaustivos de seguridad de los fármacos (Bourgeois *et al.*, 2012).

La administración transdérmica de fármacos con fines sistémicos puede ser de elección en el caso de fármacos utilizados para el tratamiento de patologías de

carácter crónico que requieren un tratamiento continuado, ya que es posible diseñar sistemas transdérmicos que permitan controlar la liberación del principio activo desde el mismo, de modo que la absorción del fármaco a través de la piel se mantiene constante. Esto permite reducir el riesgo de una dosificación incorrecta y facilita el adecuado cumplimiento del tratamiento por parte del paciente. También se considera ventajosa para los fármacos cuya administración por vías convencionales presente inconvenientes relacionados con la biodisponibilidad. Los sistemas terapéuticos de administración transdérmica (STAT) pueden resultar interesantes para estos fármacos y sus futuras indicaciones, gracias a que son de fácil manejo y aplicación y carecen de los inconvenientes asociados a la administración parenteral, ya que al no ser una vía traumática tiene buena aceptación entre la población pediátrica, no requieren de la colaboración del enfermo y facilitan el cumplimiento. Además evitan el efecto de primer paso hepático, proporcionan niveles plasmáticos de fármaco estables mientras dure su administración y por último, permiten la interrupción del tratamiento de forma fácil y segura, puesto que únicamente habría que retirarlo de la zona de aplicación.

Actualmente, las investigaciones en el campo de la administración transdérmica se centran en la búsqueda de procedimientos que permitan mejorar el paso de sustancias a través de la piel. Ello se debe a que los fármacos destinados a ser administrados vía transdérmica deben cumplir una serie de características, bastante restrictivas, no generalizables a todos los fármacos. Estas sustancias deben poseer una elevada actividad intrínseca, así como un paso favorable a través de la piel para que mediante su aplicación en forma de sistema transdérmico se alcancen niveles terapéuticos en biofase.

El grupo de investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera llamado "Desarrollo de formas farmacéuticas de aplicación sobre la piel", en el cual se ha desarrollado el presente trabajo, se ha dedicado a la investigación y desarrollo de formas farmacéuticas tópicas para el tratamiento agudo y preventivo de la migraña enfermedades de larga duración, entre otras.

La aparición de migraña en edades cada vez más tempranas ha aumentado de un modo considerable en los últimos años. En nuestro entorno, aproximadamente el 8% de la población infantil y adolescente es propensa a sufrir migrañas durante al menos un periodo de 3 meses {Abu-Arafeh, 2010 #433}. El empleo de fármacos como los antagonistas de receptores 5-HT₂ o anti-serotoninérgicos como el pizotifeno, está ampliamente justificado en cuanto a su eficacia en la población adulta e infantil. Debido a la respuesta favorable de la población pediátrica al tratamiento con este fármaco y a la seguridad que presenta, actualmente se encuentra entre los fármacos más utilizados en la prevención de migraña en niños.

En la actualidad, el pizotifeno, junto con propranolol, topiramato, ácido valproico y amitriptilina entre otros, han sido objeto de numerosos estudios acerca de su utilización como fármacos preventivos de migraña en la población infantil (Israil *et al.*, 2013). A pesar de la controversia que existe acerca de la efectividad de este tipo de fármacos, no existe un estudio realmente consistente que ayude a descartar uno u otro fármaco (Barnes, 2011).

La eficacia de los serotoninérgicos (Newman-Tancredi *et al.*, 1997), el grupo terapéutico al que pertenece el pizotifeno, ha sido ampliamente evaluada. Entre los fármacos más utilizados como preventivos se encuentran la ergotamina y la dihidroergotamina, la metisergida y otros como pizotifeno y lisurida de eficacia comprobada para el tratamiento preventivo de la migraña (Snow *et al.*, 2002). En concreto se recomienda la administración de pizotifeno a pacientes que tengan más de cuatro crisis de migraña al mes (Cleland *et al.*, 1997). La ausencia de efectos inesperados de este fármaco comercializado desde hace más de dos décadas, deja patente el buen perfil de seguridad del mismo. Además, sus características físico-químicas lo presentan como un buen candidato para su administración por la vía transdérmica.

Por otra parte, la esquizofrenia es una enfermedad mental que puede dificultar en gran medida las labores de la vida diaria de los individuos que la padecen y su integración en la sociedad. La falta de adherencia al tratamiento de los pacientes que sufren enfermedades mentales es un problema bien conocido. La paliperidona es un

antipsicótico muy utilizado en pacientes jóvenes y adultos con demostrada eficacia (Nussbaum Abraham y Stroup, 2008; Joshi *et al.*, 2013), y presenta mejor tolerancia en niños que la risperidona (Fernandez-Mayoralas *et al.*, 2012). La comercialización de la paliperidona de liberación prolongada supone un avance en esta línea, al mejorar la tolerancia al fármaco como consecuencia de la reducción de la fluctuación de los niveles plasmáticos del mismo respecto a las formulaciones de liberación inmediata (Dolder *et al.*, 2003; Birnbaum y Sharif, 2008). No obstante, debido a que las formulaciones OROS (de liberación prolongada) no son fraccionables, ya que se produciría una liberación del 100% del principio activo, no se pueden adaptar las dosis a los pacientes más jóvenes. En esta línea, una formulación de paliperidona para administración transdérmica podría reducir el número de administraciones necesarias al mantener los niveles plasmáticos constantes.

La tesis doctoral que se presenta se enmarca dentro de un proyecto de investigación mucho más amplio que pretende desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades de larga duración desarrollando sistemas de administración transdérmica, que ha sido llevado a cabo gracias a la financiación obtenida del Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ministerio de Sanidad y Consumo) (Proyecto PI060108), y la Universidad CEU Cardenal Herrera (Proyecto PRCEU-UCH01/09).

Capítulo 2. Hipótesis y objetivos

En el presente trabajo de tesis doctoral se plantea como hipótesis la posibilidad de utilizar la vía transdérmica para la administración de dos fármacos: el pizotifeno y la paliperidona.

Los sistemas de absorción transdérmica presentan ventajas que son muy interesantes en el tratamiento de patologías que afectan a la población infantil. Diversos fármacos, como el pizotifeno y la paliperidona, presentan inconvenientes relacionados con la vía de administración que se emplea actualmente y podrían ser susceptibles de absorberse por vía transdérmica.

El trabajo de tesis doctoral que se presenta tiene dos objetivos principales que se detallan a continuación:

1. Desarrollar un sistema terapéutico de absorción transdérmica de pizotifeno malato.
 - a. Validar un método analítico para cuantificar el pizotifeno en las muestras de los estudios de forma exacta y precisa.
 - b. Estudiar *in vitro* la difusión a través de la piel de cerdo del pizotifeno.
 - c. Estudiar las estrategias para incrementar la absorción transdérmica del pizotifeno (promotores químicos e iontoforesis) con el fin de obtener concentraciones plasmáticas eficaces y de reducir el período de latencia.
 - d. Desarrollar un sistema de administración transdérmica con el pizotifeno, que sea estable y que incluya las estrategias promotoras necesarias para proporcionar concentraciones plasmáticas eficaces
 - e. Caracterizar físicamente la formulación desarrollada.
2. Evaluar la viabilidad de la administración transdérmica de paliperidona.
 - a. Validar un método analítico para cuantificar la paliperidona en las muestras de los estudios de forma exacta y precisa.
 - b. Estudiar *in vitro* la difusión a través de la piel de cerdo de paliperidona.

- c. Estudiar la microporación láser como estrategia para incrementar la absorción transdérmica de la paliperidona con el fin de obtener concentraciones plasmáticas eficaces y de reducir el período de latencia.
- d. Desarrollar una formulación preliminar de paliperidona para administrar sobre la piel.

Capítulo 3. Antecedentes

1. La migraña

La migraña es una patología crónica que afecta a un 10-15% de la población, siendo su prevalencia de 2 a 4 veces mayor en la mujer que en el hombre. Su base puede ser hereditaria y se sabe que la persona que la padece tiene en el 60% de los casos algún familiar directo con esta patología. En los últimos 20 años, la prevalencia de la migraña ha aumentado tanto en la población adulta como en la infantil (Sillanpaa y Pirjo Anttila, 1996). Mientras que el porcentaje de prevalencia en la población adulta es del 11.7% (17.1% del total de mujeres y 5.6% de varones) (Lipton *et al.*, 2007), entre el 4.4 y el 11.1% de los niños de edades comprendidas entre 3 y 15 años padecen migraña (Artigas *et al.*, 1997; Hamalainen *et al.*, 1997).

Según la Sociedad Internacional de Cefaleas (SIC), la migraña es un trastorno neurológico y crónico caracterizado por ataques recurrentes e intermitentes de dolor de cabeza combinados con náuseas, vómitos y/o sensibilidad a la luz, sonidos y otros estímulos sensoriales (INFAC, 2003; Yoon *et al.*, 2005).

En numerosas ocasiones, la causa desencadenante de un ataque de migraña es la mayor sensibilidad de estos pacientes a una serie de estímulos. Diversas situaciones como el estrés y los cambios hormonales, factores dietéticos como el alcohol (particularmente el vino tinto), el café y ciertos alimentos (ricos en grasas o que contienen sustancias de tipo feniletilamina como chocolates, tiramina como quesos o nitritos como embutidos y ahumados), alteraciones en el ritmo del sueño, cambios de horario, ejercicio físico en exceso y algunos fármacos (anticonceptivos, analgésicos, ergotamina, cafeína, anti-H₂, etc.) son capaces de provocar una crisis de migraña (Cleland *et al.*, 1997; MacGregor y Wikinson, 1999; Pascual Gómez, 2001; Radat, 2013).

Según el perfil temporal y el origen de las cefaleas, la *Sociedad Internacional de Cefaleas* establece dos grandes grupos (HCS, 2004):

- **Cefaleas primarias**, suponen el 95% de los dolores de cabeza. Entre ellas, las más prevalentes son la cefalea por tensión (47.5%) y la migraña (24.5%). No existe un motivo orgánico o de otro tipo como causa desencadenante de las mismas.

- **Cefaleas secundarias**, representan el 5% restante. Son cefaleas agudas y repentinas, consecutivas a enfermedades o lesiones craneales.

De todas ellas, la cefalea por tensión es la más frecuente. No obstante, la migraña es la que más trastornos produce a nivel social, económico y psicológico. Se trata de una patología que afecta al paciente hasta tal punto que en la mayoría de los casos debe abandonar su actividad social y laboral.

En la clasificación que publicó la Sociedad Internacional de Cefaleas (HCS, 2004), se incluía por primera vez el subgrupo de "síndromes periódicos de la infancia relacionados con la migraña", entre los que se encuentran además las siguientes categorías: vómitos cíclicos, migraña abdominal y vértigo paroxístico de la infancia.

1.1. Fisiopatología de los ataques de migraña

Se trata de una enfermedad cuyos síntomas aparecen de manera episódica por lo que el estudio fisiopatológico de la misma es complicado. Normalmente, un paciente que sufre una crisis de migraña suele presentar cuatro fases (Pascual y Castro, 1998; Martínez Eizaguirre, 1999):

- **Fase prodrómica**. Consiste en un periodo de 24 horas previo al dolor de cabeza en el que aparecen una serie de síntomas entre los que destacan: irritabilidad, excitabilidad, hiperactividad o depresión, malestar general, bostezos, escalofríos, aumento de apetito y cambios en la actividad intestinal.
- **Aura**. Esta fase se suele instaurar inmediatamente antes o durante el ataque. Aparecen síntomas neurológicos focales como fotopsias (sensación de chispas o relámpagos), teicopsias (sensaciones visuales de centelleo), escotoma (ausencia de visión en un punto) o hemianopsia (pérdida de visión transitoria en la mitad de ambos campos visuales). También pueden aparecer síntomas de tipo sensitivo o motor.
- **Fase de cefalea**. La cefalea es el principal síntoma de la crisis de migraña consecuencia de la activación del sistema trigémino-vascular, que da lugar a la liberación de péptidos algógenos en los vasos sanguíneos de las

meninges. Los algógenos son sustancias como la bradikina o la acetilcolina, que ponen en funcionamiento el mecanismo de la nocicepción, lo que provoca una reacción inflamatoria que dilata las arterias de las meninges provocando la sensación de pulsatilidad típica del dolor migrañoso. Ambos fenómenos, inflamación y vasodilatación, están regulados por el neurotransmisor serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT). Para este neurotransmisor existen dos subtipos de receptores que permiten un control del dolor, el subtipo 5-HT_{1B} localizado en los vasos sanguíneos de las meninges y el 5-HT_{1D} situado a nivel del nervio trigémino. La activación del subtipo 5-HT_{1B} revierte la vasodilatación. El subtipo 5-HT_{1D} es el responsable del control de la inflamación.

- **Fase de resolución.** En esta etapa el paciente adquiere un comportamiento eufórico debido al cese de los síntomas y la consecuente sensación de alivio.

1.2. Tratamiento preventivo y del ataque agudo de migraña

1.2.1. Tratamiento preventivo

El tratamiento preventivo de la migraña tiene como objetivo disminuir la frecuencia y/o intensidad de las crisis. Con dicho fin se emplean fármacos antihistamínicos, antiserotoninérgicos, calcio-antagonistas, antidepresivos, antiepilépticos y beta-bloqueantes (Andersson y E, 1990; Olesen, 1991). A pesar de ello, el tratamiento de la migraña en la población infantil no ha sido estudiado de forma exhaustiva, como así lo indican muchos de los artículos consultados (MacGregor y Wikinson, 1999; Pascual Gómez, 2001; Toldo *et al.*, 2012).

En la tabla siguiente (Eiland *et al.*, 2007) se muestran los principios activos útiles para el tratamiento preventivo de la migraña:

FÁRMACOS	DOSIS	UTILIDAD	CONTRAINDICACIONES
Beta-bloqueantes			
Propranolol*	80-160 mg/día máx 240 mg/día	Enfermedad cardiovascular concomitante	Asma Depresión Diabetes insulino dependiente Hipotensión Síndrome de Raynaud
Metoprolol*	100-200 mg/día en dos tomas		
Nadolol*	80-160 mg/día		
Antidepresivos			
Amitriptilina	50-150 mg/día	Cefalea de tipo tensional Depresión Insomnio Fibromialgia	Infarto de miocardio reciente Epilepsia Retención urinaria
Anticonvulsivantes			
Valproato sódico	500-1.000 mg/día en dos tomas	Epilepsia Trastorno bipolar Ansiedad	Embarazo Problemas hepáticos Trastornos hematológicos
Topiramato*	100 mg/día en dos tomas	Epilepsia Trastorno bipolar Ansiedad Personas obesas	Embarazo Lactancia Problemas hepáticos Nefrolitiasis
Bloqueantes de los canales del calcio			
Flunarizina*	10 mg/día	Hipertensión Angina Insomnio	Depresión Embarazo Enfermedad de Parkinson
Antiserotoninérgicos			
Pizotifeno*	1,5 mg/día	Estimulante del apetito	Embarazo Enfermedad vascular periférica Obesidad

** Principios activos autorizados en España para la prevención de la migraña.*

Tabla 1. Fármacos para el tratamiento preventivo de la migraña, sus dosis habituales, indicaciones y contraindicaciones.

Las alteraciones en la secreción neuronal de serotonina (5-HT) se encuentran en diferentes enfermedades incluyendo la migraña. En general, los receptores 5-HT pueden dividirse en tres familias principales: receptores 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₃ con varios subtipos.

Los agentes antimigrañosos profilácticos comparten la capacidad de bloquear los receptores 5-HT₂. El maleato de metisergida, el clorhidrato de ciproheptadina, el pizotifeno y el clorhidrato de amitriptilina son poderosos agentes que actúan a nivel del receptor 5-HT₂ en el cerebro humano. Se sabe que la 5-HT estimula la producción de prostaciclina y de otros subproductos del metabolismo del ácido araquidónico que conducen a una reacción inflamatoria en la pared vascular cerebral al inicio de la migraña. Los antagonistas de los receptores 5-HT₂ tienen la capacidad de inhibir a la 5-HT (Palencia, 1985; Lluch Fernández, 1997; Rojas y Espínola, 2000).

Un estudio reciente, en el cual se comprobó la eficacia preventiva de tres fármacos, el pizotifeno, propranolol y amitriptilina, demostró una reducción en la duración, frecuencia y severidad de los ataques en todos los grupos, sin encontrar diferencias entre ellos. Además los tres fármacos fueron bien tolerados y con mínimos efectos adversos (Israil *et al.*, 2013).

1.2.2. Tratamiento del ataque agudo de migraña.

El objetivo primario del tratamiento del ataque agudo de migraña consiste en la minimizar la incapacidad funcional y el impacto de los síntomas de la migraña. El tratamiento agudo se divide en inespecífico y específico.

➤ *Tratamiento inespecífico.*

Consiste en la utilización de analgésicos antiinflamatorios (ácido acetilsalicílico, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, ácido mefenámico, indometacina o asociaciones paracetamol-codeína) (Iglesias y Pascual, 1995) asociados a antieméticos y procinéticos (metoclopramida o domperidona) (Ellis *et al.*, 1993). Este tipo de tratamiento se suele administrar cuando el ataque de migraña es medio - suave y con pocas posibilidades de empeorar. En los casos de migrañas severas o con posibilidades de prologarse en el tiempo sería indicado el tratamiento específico (Tepper y Spears, 2009).

➤ *Tratamiento específico.*

- **Fármacos ergotamínicos.** Son fármacos que están indicados en enfermos cuyas crisis de migraña son muy prolongadas. Su efecto es prolongado y

pueden ser administrados tanto vía oral como rectal. Se emplean la ergotamina y la dihidroergotamina, un derivado de la ergotamina con menos efectos adversos pero menos eficaz que ésta. Los ergotamínicos están contraindicados en niños, embarazo, hipertiroidismo, y en pacientes con fallo hepático y/o fallo renal. Además, presentan riesgo elevado de desarrollar tolerancia, dependencia, cefalea crónica diaria y cefalea de rebote, también incrementan las náuseas y vómitos (Flórez, 2008).

- **Agonistas de la serotonina (triptanes).** Son fármacos estimulantes de los receptores serotoninérgicos de tipo 5-HT₁, presentes en los vasos intracraneales y en las terminaciones nerviosas del trigémino. Representan el tratamiento específico ideal, ya que manifiestan una serie de ventajas respecto a los fármacos ergotamínicos como son el índice de respuesta superior (45 - 75%), alivian el dolor del ataque de migraña y calman también las náuseas y vómitos. Debido a sus efectos adversos, principalmente cardiovasculares, se deben usar sólo en pacientes que no mejoran con la combinación de un antiemético y un AINE (Hansen *et al.*, 2000; Flórez, 2008).

Tras la aparición del *sumatriptán* han aparecido los triptanes de segunda generación (naratriptán, zolmitriptán, rizatriptán, almotriptán, eletriptán y frovatriptán) (Leira y Noya, 1998; Leira y Pascual, 2000). El último triptán incorporado al arsenal terapéutico para el tratamiento de la migraña es el *avitriptán*, que todavía no ha sido comercializado (Jhee *et al.*, 1999).

2. Pizotifeno malato

Este principio activo presenta un peso molecular de 429.53 g/mol y un coeficiente de reparto calculado en el sistema n-octanol/agua (log P) de 4.7 (ALOGPS v2.1 (Tetko *et al.*, 2005)), estos parámetros lo hacen susceptible de poder difundir a través de la piel. La biodisponibilidad del pizotifeno vía oral es del 78%, con una unión a proteínas plasmáticas del 91% y una semivida biológica de 23 horas.

El pizotifeno es un antagonista de los receptores H₁ y de los receptores 5-HT₂. Los medicamentos comercializados en España con este principio activo en forma de malato de pizotifeno (*4-(9,10-dihidro-4H-benzo[4,5]ciclohepta[1,2-b]tien-4-ilideno)-1-metilpiperidina malato*), son: Mosegor® gragea 0.5 mg, Mosegor® solución 0.25 mg/5 mL y Sandomigran® gragea 0.5 mg. La dosis diaria de pizotifeno recomendada para niños de entre 2 y 6 años oscila entre 0.25 y 0.5 mg/ día, de 6 a 12 años de 0.75 mg/día; la dosis máxima diaria es de 0.75 mg para 2-6 años, 1 mg para 6-12 años y 2.5 mg para adultos y adolescentes. En España el medicamento Mosegor® está autorizado desde el año 1972 por lo que ha sido ampliamente utilizado en la población infantil y puede considerarse un fármaco seguro.

Los primeros síntomas después de la administración de una dosis de 3 mg/Kg comenzaron a apreciarse en estudios de toxicidad subaguda llevados a cabo en perros (Speight y Avery, 1972). Los efectos adversos que se asocian al pizotifeno con mayor frecuencia son ganancia de peso y sedación. El primero de ellos, es ampliamente conocido y transformado como indicación, así puede encontrarse dentro del grupo de los estimulantes del apetito. El segundo puede reducirse iniciando el tratamiento con una dosis baja e incrementándola de forma paulatina.

El aumento de peso producido por pizotifeno está ampliamente demostrado y es debido principalmente a un aumento de apetito, cuyo efecto es independiente de la dosis (Briars *et al.*, 2008). Esta respuesta hace que pizotifeno pueda ser de interés como fármaco orexígeno, y que pueda utilizarse con esta indicación además de como profiláctico de migraña. Su utilización como orexígeno está indicada para el tratamiento de trastornos de la alimentación como la anorexia nerviosa o la bulimia, sobre todo en las primeras fases de la enfermedad, en casos en los que se necesita una recuperación de peso forzada porque peligre la vida del paciente. También puede indicarse para enfermedades en las que las causas de la anorexia son secundarias, como la falta de apetito en pacientes tratados con quimioterapia.

El problema de aceptación de la forma farmacéutica o de la medicación en general que plantean ciertos grupo de pacientes (pediátricos o con trastornos alimenticios), pueden dificultar la correcta administración del medicamento y poner en

riesgo la continuidad del tratamiento. Por ello la posibilidad de administrar el fármaco de forma que no sea necesaria la colaboración del paciente y que no sea invasiva, puede suponer una mejora tanto en la salud del enfermo como en la calidad de vida de sus cuidadores.

3. La esquizofrenia

La esquizofrenia es una enfermedad mental que afecta a entre el 0.3 y el 0.7% de la población mundial. La genética parece estar relacionada con la aparición de la enfermedad, siendo la probabilidad de padecer la enfermedad del 12% para hijos con un padre esquizofrénico y del 39% si son los dos (van Os y Kapur).

3.1. Fisiopatología de la esquizofrenia

La enfermedad se puede presentar en forma de episodio esquizofrénico o psicótico, que se presenta durante un breve periodo de tiempo y no dejan síntomas negativos (pérdida o disminución de las funciones normales, actividades que el enfermo ya no realiza y que las personas sanas pueden efectuar de forma habitual); o esquizofrenia crónica cuando las manifestaciones de la enfermedad se mantienen durante cierto tiempo, cuando vuelven a reaparecer posteriormente y cuando aparecen síntomas negativos (De Flores y Association, 2004). Así el curso de la enfermedad se puede dividir en tres fases:

- La **1ª fase** o **fase premórbida** o **prodrómica**. Es el periodo que precede a la instauración de la enfermedad. Aunque no siempre, los enfermos de corta edad pueden parecer solitarios, callados, con rendimiento bajo. Poco antes de la aparición del primer episodio pueden aparecer excitabilidad, anorexia, anhedonia, dificultad de concentración, insomnio, depresión y aislamiento entre otros síntomas.
- La **2ª fase** o **fase activa** o **de progresión**. Aparece cuando comienza la enfermedad, serían los episodios o las crisis. Afloran síntomas que no aparecen en personas sanas (síntomas positivos) como delirios, alucinaciones, etc. En esta fase es cuando se suele detectar al enfermo. Los episodios puede aparecer de forma repentina instaurando la

enfermedad por completo en pocos días o de forma lenta, pasando desapercibidos. La duración de episodios varía entre pacientes, no obstante suele presentar una duración parecida para el mismo individuo. Asimismo, el periodo de tiempo entre episodios también depende de la persona.

- La **3ª fase o fase residual**. En la cual los síntomas negativos (cosas que el paciente no realiza o siente pero que una persona sana sí) se agravan, deteriorándose en sobremanera la vida del enfermo. Esta fase no aparece en todos los enfermos.

El cuadro psiquiátrico del esquizofrénico está formado por un conjunto de trastornos mentales crónicos y graves, entre los que cabría destacar el trastorno de la personalidad. Los síntomas pueden comenzar de manera aguda o de forma progresiva a cualquier edad, siendo menos frecuente su aparición antes de los 10 años y después de los 50 años. Entre los síntomas que pueden padecer los enfermos que sufren esquizofrenia se encuentran:

- Alucinaciones, falsas percepciones de los sentidos que el paciente no puede identificar como tales y que pueden ser auditivas, visuales, táctiles, gustativas y olfativas;
- Delirios, creencias inusuales que no están basadas en la realidad y que con frecuencia contradicen las evidencias;
- Cambios de comportamiento;
- Trastornos del pensamiento, el paciente no puede controlar las ideas que fluyen por su mente, llegando a pensar que sus pensamientos son controlados por alguna “fuerza” externa;
- Otros síntomas, como angustia, excitabilidad, insomnio, palpitaciones, sudores, mareos, etc.

Algunos de estos síntomas pueden presentarse de forma más marcada en función del tipo de esquizofrenia:

- **Esquizofrenia paranoide**. Cursa con ansiedad, irritabilidad, ira, violencia, frecuentes alucinaciones auditivas y paranoia. El paciente tiende a

intentar hacer daño tanto a él mismo como a las personas de su entorno cercano.

- **Esquizofrenia desorganizada.** En la que los pacientes presentan trastornos que dificultan la organización del pensamiento, se comportan de forma infantil y con afectividad aplanada. Suele ser de inicio temprano.
- **Esquizofrenia catatónica.** Presentan una grave alteración psicomotora que puede incluir inactividad motora o actividad excesiva, abulia o apatía, muestran expresiones faciales anormales, movimientos estereotipados, mutismo, imitan lo que hace o dice otra persona y tienen poca reactividad frente a otras personas.
- **Esquizofrenia hebefrénica.** Comienza entre los 12 o 13 años, pudiendo confundirse con retraso mental al inicio, aparecen alteraciones de la conducta, delirios y afectividad aplanada.
- **Esquizofrenia indiferenciada.** Presenta síntomas de varios tipos de esquizofrenia haciendo difícil su localización en uno de los grupos anteriores.
- **Esquizofrenia residual.** Los pacientes que la sufren no muestran todos los síntomas. Aparece cuando los síntomas se hacen crónicos.

Todos estos desórdenes de la percepción y del pensamiento pueden dificultar en muchos pacientes el desarrollo de una vida normal (De Flores y Association, 2004; Vallejo Ruiloba y Pascual Ballú, 2006; Lopez Ibor Aliño y Valdés Miyar, 2010).

La esquizofrenia se encuentra asociada en muchas ocasiones al consumo de sustancias como alcohol, tabaco, cannabis o cocaína, ya que les ayudan a contrarrestar algunos síntomas de la enfermedad y la medicación, como la depresión y la ansiedad (De Flores y Association, 2004; Belloch *et al.*, 2008). Este hecho hace que algunos tratamientos farmacológicos, como los neurolépticos vean aumentado su metabolismo y por tanto se reduzcan sus niveles plasmáticos con la consiguiente reducción de su efecto y la necesidad de incrementar la dosis medias (McCloughen, 2003).

3.2. Tratamiento farmacológico

El tratamiento de la esquizofrenia, al igual que muchas enfermedades mentales, debe incidir sobre varios aspectos de la enfermedad. Así pues, además de la terapia farmacológica, se aconseja realizar terapia psicológica por parte del paciente y educación de la familia. El tratamiento farmacológico abarca un amplio grupo de fármacos debido a la naturaleza de la enfermedad, entre los cuales se encuentran los antipsicóticos y las benzodiacepinas.

- Los **fármacos antipsicóticos** actúan bloqueando los receptores D₂ del cerebro (Jablensky *et al.*, 1992). Estos a su vez se dividen en antipsicóticos típicos o de primera generación y atípicos o de segunda generación (González Hernández *et al.*, 2008). En el primer grupo se pueden encontrar el haloperidol, la clorpromazina y la flufenacina entre otros. Estos fármacos producen mayor número de efectos secundarios, principalmente extrapiramidales (como distonía, movimientos parkinsonianos, etc.) (Schultz *et al.*, 2007). Entre los antipsicóticos atípicos se encuentran la clozapina, la olanzapina y la risperidona. Este último grupo suele ser de primera elección en el tratamiento de la esquizofrenia debido a que presenta cierta reducción de los efectos secundarios extrapiramidales, aunque se han asociado a otros como aumento de peso, dislipemias o agranulocitosis (Schatzberg y Nemeroff, 2006).
- Dentro de las **benzodiacepinas** se pueden utilizar numerosos fármacos, no obstante la más habitual en esquizofrenia es el diazepam, por ser de vida media larga. Las benzodiacepinas facilitan la transmisión de GABA e inhiben la de dopamina. El tratamiento con benzodiacepinas se realiza a dosis muy elevadas para intentar reducir la excitación, los trastornos de pensamiento, delirios y alucinaciones. Pueden utilizarse como tratamiento único cuando los pacientes rechazan el tratamiento con antipsicóticos o como tratamiento combinado con los antipsicóticos (Hales y Yudofsky, 2005).

- La **terapia electro-convulsiva** puede estar recomendada en los casos en los que la terapia farmacológica no sea efectiva y existan psicosis recurrentes. No obstante debido a las pérdidas de memoria y la posibilidad de producir lesiones osteomusculares, así como a los limitados beneficios que presenta, su uso se ha visto reducido de forma considerable (Tharyan y Adams Clive, 2005).

4. Paliperidona

La paliperidona o *9-hidroxi-risperidona*, es el metabolito activo mayoritario de la risperidona y ambos son utilizados como antipsicóticos. Su peso molecular es de 426.5 g/mol; su coeficiente de reparto (log P) en el sistema octanol/agua es de 1.8, lo que lo hace prácticamente insoluble en agua. En España se comercializa en comprimidos de liberación prolongada (sistema OROS, Invega®) y en solución inyectable, también de liberación prolongada (Xeplion®). La biodisponibilidad vía oral es del 28%, se une a proteínas plasmáticas en un 74% y su semivida de eliminación es de 23 horas (Knox *et al.*, 2011).

Aunque el mecanismo de acción no está completamente definido, se piensa que actúa de forma similar a la risperidona. La paliperidona actúa como bloqueante selectivo de los efectos de las monoaminas, uniéndose a los receptores serotoninérgicos 5-HT₂ y dopaminérgicos D₂, bloqueando los adrenérgicos α_1 y de forma menos marcada, los receptores H₁ y α_2 (Kozielska *et al.*, 2012).

Además de en la esquizofrenia, la paliperidona ha mostrado ser eficaz en el tratamiento del trastorno esquizoafectivo (Bellantuono y Santone, 2012), y en el tratamiento de mantenimiento de pacientes con trastorno bipolar primario, después de una manía aguda o episodios mixtos (Berwaerts *et al.*, 2012).

Los efectos secundarios más frecuentes producidos por el uso de paliperidona son la excitación y los trastornos extrapiramidales como movimientos involuntarios, temblores y rigidez muscular. El síndrome neuroléptico maligno es muy poco frecuente. Los efectos adversos son dosis dependientes, algunos de ellos sólo aparecen tras el uso prolongado del fármaco, desapareciendo la gran mayoría de ellos al reducir o interrumpir el tratamiento (Bellantuono y Santone, 2012).

5. Administración transdérmica de fármacos

Tradicionalmente la aplicación de medicamentos sobre la piel ha tenido como finalidad la obtención de efectos terapéuticos locales, considerándose como indeseables los efectos sistémicos que pudieran derivarse. Debido a las intoxicaciones producidas por la absorción cutánea de sustancias de uso cotidiano, se puso en evidencia la permeabilidad de la piel y la posibilidad de ser atravesada por sustancias de distinto origen.

A partir de ese momento se consideró la piel como una vía de administración de medicamentos destinados a ejercer un efecto sistémico. Al principio los fármacos se incorporaron en pomadas y hacia finales de 1970 aparecieron los denominados Sistemas Terapéuticos de Administración Transdérmica (STAT).

En la actualidad existe un gran número de formulaciones de aplicación tópica que forman parte del arsenal terapéutico cotidiano y que han aumentado en gran medida la especificidad de actuación de los fármacos. Es muy frecuente la utilización de estas formulaciones para enfermedades o trastornos que afectan a un área determinada, como pueden ser dolores musculares, procesos inflamatorios localizados, patologías dérmicas superficiales como la dermatitis, las infecciones fúngicas, etc. Sin embargo la piel también se puede utilizar para obtener efectos terapéuticos sistémicos. Para ello se utilizan los Sistemas terapéuticos de Administración Transdérmica: se explican detalladamente más adelante (punto 6).

5.1. Estructura y funciones de la piel y sus anexos

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano. Presenta una superficie total de unos 1.6 m² y pesa aproximadamente unos 4 Kg. Debido a su composición, se encarga de mantener la homeostasia de los fluidos corporales evitando la evaporación excesiva de agua interna, regular la temperatura corporal, proteger al individuo de agresiones externas (microorganismos, luz ultravioleta, traumas mecánicos) y establecer las relaciones sensoriales.

En su estructura se diferencian cuatro capas bien caracterizadas y funcionalmente diferentes: capa superficial, epidermis, dermis e hipodermis. Además,

en la piel se encuentran dos tipos de estructuras denominadas anexos: el sistema pilosebáceo y las glándulas sudoríparas. La capa superficial está en contacto con el medio externo y la hipodermis separa la piel de los tejidos subyacentes.

La **capa superficial** es una cutícula irregular, sin estructura aparente y discontinua de espesor comprendido entre 0.4 y 10 μm . Se trata de una capa que recubre la superficie de la piel y está constituida por una mezcla de secreciones lipídicas (sebo) y acuosas (sudor) procedentes de las glándulas sebáceas y sudoríparas. Engloba además células descamadas, bacterias y cierta cantidad de suciedad sólida y líquida procedente del exterior. Además, es miscible con el agua y su pH es ácido (5.2 por término medio, aunque con variaciones zonales), lo que a su vez le permite actuar como defensa eficaz frente a infecciones cutáneas, produciéndose un incremento del mismo cuando aparecen alteraciones o infecciones.

La **epidermis** es una capa epitelial estratificada y no vascularizada. Sus células sufren modificaciones químicas enriqueciéndose en queratina a medida que progresan hacia el exterior. Estas células nacen en una capa basal interna o también llamada capa germinativa. Esta capa constituye la zona de separación entre la epidermis y la dermis, y se prolonga hacia el exterior dando origen primero a la llamada capa espinosa y más adelante, a la capa granulosa, que enlaza con el estrato córneo mediante una zona de transición. A medida que las células crecen van cambiando de células metabólicamente activas a células muertas, dando origen, finalmente, al estrato córneo.

Por tanto, en función del grado de diferenciación celular, dentro de la epidermis se pueden distinguir varios estratos que aparecen esquematizados en la Figura 1.

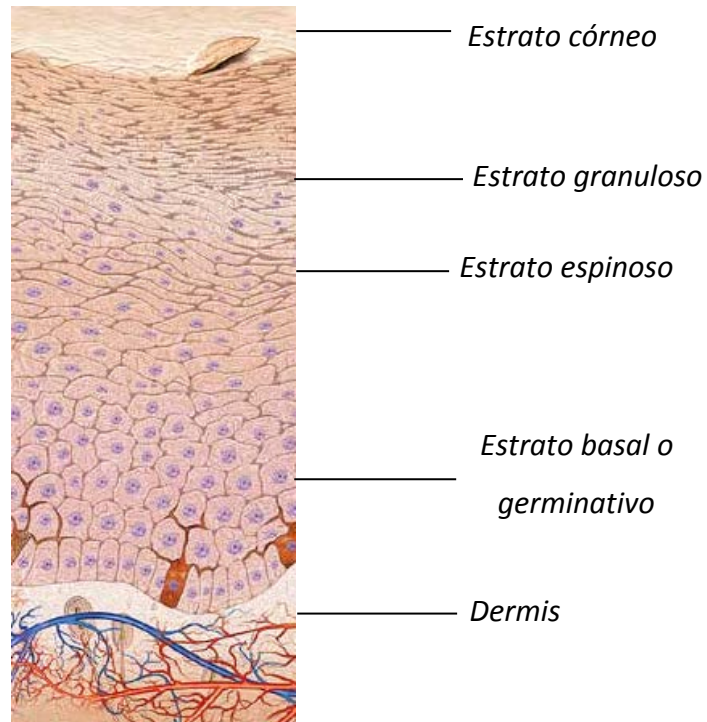


Figura 1. Estructura microscópica de la epidermis. Imagen obtenida de: <http://www.skin-care-forum.basf.com/>

La **capa germinativa** es un tapiz continuo de células que residen a lo largo de la lámina basal (frontera entre epidermis y dermis). Estas células epiteliales columnares se enlazan entre sí mediante desmosomas y con la lámina basal por hemidesmosomas. Las células basales son relativamente indiferenciadas y carecen de marcadores bioquímicos característicos de las células más diferenciadas de las capas superiores. La proliferación de estas células basales está regulada por una variedad de factores intrínsecos y extrínsecos. Entre los reguladores extrínsecos destacan: el factor de crecimiento epidérmico, los factores de crecimiento tumoral α y β , progesterona, epinefrina, vitaminas A y D. Incluso se ha podido ver que la composición de la dermis influye tanto en la morfología como en la diferenciación de la epidermis.

La **capa espinosa** está situada directamente sobre la capa basal. Su nombre se debe a la morfología que le confiere la existencia de gran número de desmosomas que unen a células adyacentes.

La denominación de **capa granulosa** deriva de la presencia, en estas células, de gránulos ricos en profilagrina, precursora de la proteína filagrina, de cuya degradación

proviene el aminoácido ácido glutámico e histidina, que a su vez darán lugar al ácido pirrolidín carboxílico (PCA) que constituye el denominado factor de hidratación natural (NMF) y al ácido urocánico respectivamente. El NMF juega un papel muy importante en el mantenimiento del contenido en agua de la piel.

La **zona de transición** es la zona que se encuentra ubicada entre la capa granulosa y el estrato córneo (epidermis viva y muerta). Se trata de una región de amplia transformación celular, donde la mayoría de los orgánulos celulares existentes son destruidos por la acción de proteasas y nucleasas. Así, los lípidos contenidos en la membrana de revestimiento de los gránulos son liberados a la matriz extracelular, los filamentos de queratina se reestructuran en una forma más estable formando la cubierta córnea.

El **estrato córneo** se considera la barrera más importante para la penetración cutánea de xenobióticos. Se debe a que está constituido por 10-15 capas de células queratinizadas denominadas corneocitos, estas células a su vez forman un delgado y resistente estrato (10 y 20 μm , según la zona del cuerpo), que es el responsable de su función protectora frente al ataque por agentes externos.

Los corneocitos son células poliédricas, aplanadas y sin actividad metabólica, que han perdido sus elementos intracelulares y el núcleo, y son el resultado de la fase final de diferenciación. El componente mayoritario de estas células es la queratina, una proteína de estructura α -helicoidal, rica en puentes disulfuro, que se dispone en forma de haces macrofibrilares y que confiere al estrato córneo una gran resistencia. Los corneocitos se enlazan entre sí por desmosomas modificados, tonofibrillas y distintas sustancias intercelulares sintetizadas durante la diferenciación celular (Bouwstra *et al.*, 1995).

La estructura y disposición de los corneocitos en el estrato córneo se asemeja a un muro de ladrillos, donde los ladrillos serían los corneocitos, que se encuentran superpuestos y unidos mediante un cemento intercelular, formado por los lípidos celulares expulsados al exterior durante el proceso de queratinización. Gracias a la polaridad de estos lípidos, el estrato córneo es capaz de retener una cantidad importante de agua e incluso puede hidratarse de forma temporal aumentando su

volumen. De este modo, el estrato córneo permite la conservación del agua corporal, impidiendo la excesiva evaporación del agua interna.

Los lípidos de esta matriz intercelular se encuentran organizados en múltiples bicapas, que se disponen de forma paralela a la superficie de la piel (Elías y Friend, 1975). Estas bicapas se han podido observar utilizando microscopía electrónica (Garson *et al.*, 1991). El número de bicapas entre dos células es variable (4-20 o más). El hecho de que estas bicapas se orienten de forma paralela a la superficie implica que una molécula que atraviese el estrato córneo debe cruzar las sucesivas bicapas que lo constituyen, lo cual representa una dificultad. El que las membranas plasmáticas, constituidas también por bicapas lipídicas, no sean barreras significativas para la penetración de xenobióticos, hace pensar que la naturaleza de los lípidos que constituyen el estrato córneo puede ser un factor condicionante de su permeabilidad.

Los lípidos que intervienen en mayor proporción en el estrato córneo son colesterol, ácidos grasos y ceramidas (Elías, 1983; Wertz y Downing, 1989). La naturaleza y ordenación de los mismos en el estrato córneo constituye, sin duda, un aspecto muy importante en las propiedades de la piel como barrera. De todos ellos, las ceramidas se consideran muy importantes. Concretamente, se han diferenciado 6 tipos distintos de ceramidas. Estas, se pueden encontrar bien libres en los espacios intercelulares donde forman una película continua o bien unidas a las proteínas de los corneocitos mediante enlaces covalentes formando una cubierta celular lipídica a la que se le atribuye una función de cohesión entre las células. Las últimas investigaciones dan más importancia a la organización y al empaquetamiento lipídico como limitante del flujo transdérmico.

La **dermis**, está situada inmediatamente por debajo de la epidermis. Se trata de un tejido sensible y ricamente irrigado; a nivel de los capilares sanguíneos de la dermis los fármacos pasan a la circulación sistémica, aunque para ello, es necesario atravesar el estrato córneo y la epidermis viva.

Está formada por un parénquima de células conjuntivas entre las que se encuentran vasos (1 m de vasos/cm² de superficie) y nervios (terminaciones sensibles al calor, al frío y a la presión, y otras que proporcionan el tacto). Los tipos celulares

más importantes de la dermis son: fibroblastos, macrófagos y mastocitos, aunque hay otras células (linfocitos, células plasmáticas, etc.) que se pueden encontrar en la dermis en respuesta a lesiones y otros estímulos.

Se estructura en dos capas principales: la capa papilar (más externa) y la capa reticular (en contacto con la hipodermis), cuyas células sintetizan, como producto mayoritario, haces de colágeno que aumentan progresivamente de tamaño hacia la hipodermis.

La **hipodermis** o **tejido subcutáneo**, constituye la zona de separación entre la dermis y los tejidos subyacentes y varía en su constitución según la región del cuerpo. Contiene células adiposas que constituyen una reserva de energía y protección frente al frío, además de dotar a la piel de su elasticidad y capacidad de movimiento.

Aunque en algunas zonas, muy circunscritas, las glándulas sebáceas aparecen como estructuras independientes, normalmente están asociadas al folículo piloso, el conjunto de folículos pilosos y glándulas sebáceas se conoce como **sistema pilosebáceo**.

Los folículos pilosos nacen en la hipodermis o en la dermis, atraviesan la epidermis y desembocan en la superficie de la piel. En su base (matriz o bulbo piloso), están constituidos por células conjuntivas de gran vitalidad y muy bien irrigadas. Estas células se dividen rápidamente y, a medida que crecen, desplazan a las ya existentes, que por una parte dan origen a la cutícula que envuelve al pelo y por otra se queratinizan y forman el pelo propiamente dicho. La queratinización no es tan rápida como en el estrato córneo, de modo que el núcleo de la célula se va haciendo denso y picnótico gradualmente hasta que aparece englobado por la queratina.

Hacia el primer tercio de su longitud, las glándulas sebáceas conectan con el folículo. El alveolo sebáceo consiste en una masa de células epiteliales especiales rodeadas de una membrana basal que se confunde con la cutícula del pelo; dichas células proliferan y desplazan hacia arriba, por el interior del folículo, a las preexistentes, que van acumulando lípidos en su interior en tal proporción que, finalmente, se rompen y la secreción se vierte al exterior por la abertura del folículo.

Las **glándulas sudoríparas** son las que vierten una secreción (sudor), de naturaleza fundamentalmente acuosa, cuya evaporación desempeña un importante papel termorregulador. Se trata de estructuras independientes que nacen en la hipodermis y se continúan en forma de conducto rectilíneo o espiral hasta la superficie de la piel.

5.2. Vías de penetración cutánea

Cuando un fármaco se aplica sobre la piel lo primero que debe suceder es que acceda a la superficie de la piel y se disuelva en la capa superficial de la misma, a continuación dispone de dos caminos para su penetración: vía transapendicular, a través de los apéndices cutáneos y vía transepidérmica, a través de la epidermis (Figura 2).

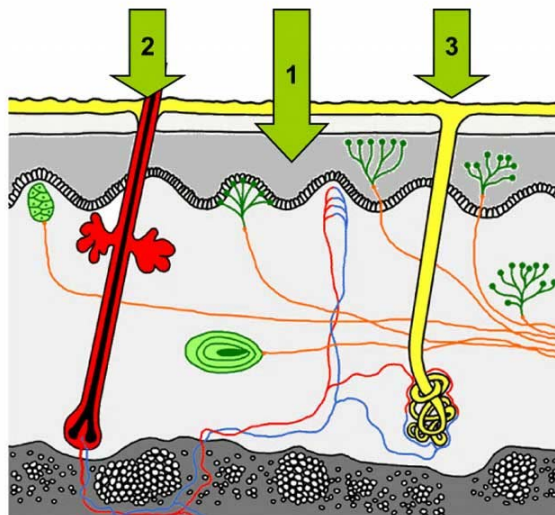


Figura 2. Principales vías de penetración a través de la piel: 1 vía transepidérmica, 2 y 3, vía transapendicular. Imagen obtenida de: <http://www.skin-care-forum.basf.com/>

La vía transepidérmica es sin duda el camino más importante, aunque no permite una penetración rápida. En dicho caso, el paso de las sustancias a través de la epidermis se produce, bien por difusión a través de los espacios intercelulares, vía intercelular, o bien a través de las células constituyentes de este estrato, vía transcelular (Scheuplein y Blank, 1973) (Figura 3).

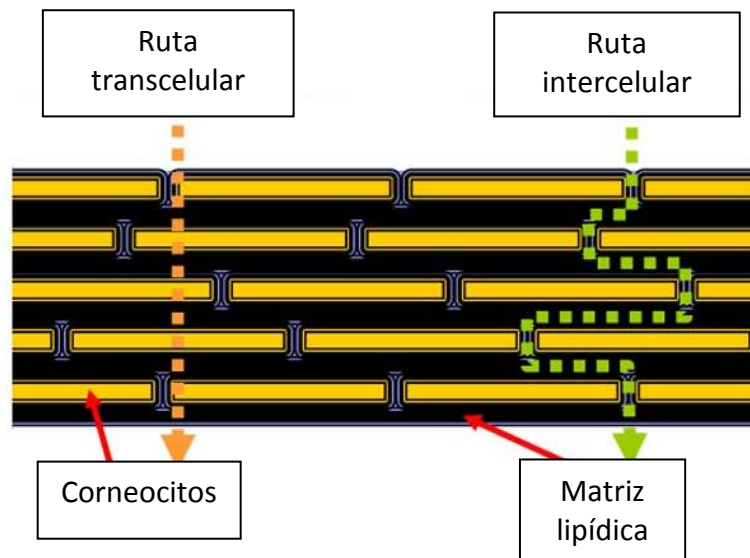


Figura 3. Vías de penetración transcelular e intercelular a través de la epidermis. Imagen obtenida de: <http://www.skin-care-forum.basf.com/>

En la vía intercelular, el permeante atraviesa el estrato córneo siguiendo un camino tortuoso a través de los lípidos de la matriz intercelular (Elías, 1983). Esta vía intercelular de penetración se considera el camino más importante para la mayoría de las sustancias ya que, a diferencia de la vía transcelular, el fármaco no debe repetir varias veces el paso a través de los corneocitos y las bicapas lipídicas que los separan. La impermeabilidad característica de los corneocitos, junto al hecho de que esta vía transcelular de penetración requiere repetidos repartos del permeante entre regiones hidrófilas y lipófilas, hace que su contribución en el proceso de penetración a través del estrato córneo se considere menos importante que la vía intercelular.

La vía transapendicular no es un camino general de entrada de fármacos, debido a la escasez de estructuras en comparación con la superficie útil que representa el estrato córneo.

En referencia a la vía transapendicular, el paso de sustancias se realiza a través de las glándulas sudoríparas y folículos pilosebáceos (Figura 4).

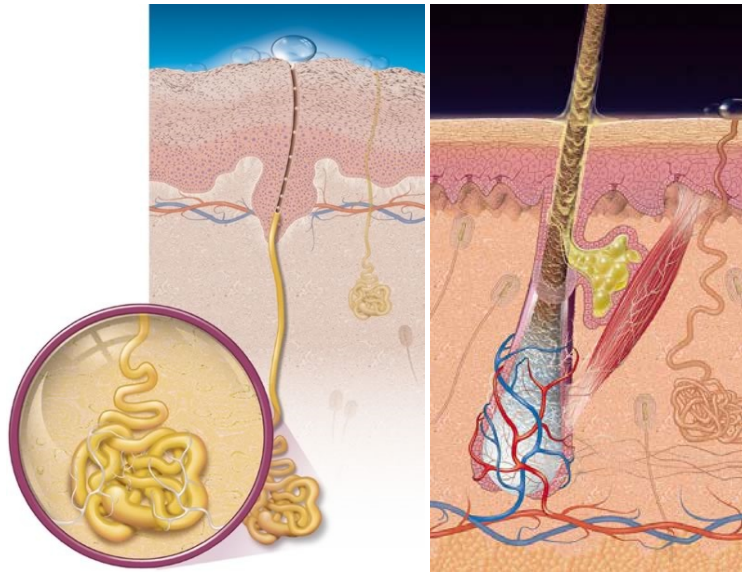


Figura 4. Absorción de fármacos vía transapendicular. A la izquierda glándula sudorípara, a la derecha sistema pilosebáceo. Imagen obtenida de: <http://www.skin-care-forum.basf.com/>

Las glándulas sudoríparas desembocan en la superficie de la piel por un poro, que continúa por un canal estrecho lleno de secreción acuosa y de cubierta queratinizada que el fármaco no puede traspasar. La glándula terminal, sin embargo, no posee cubierta epidérmica y está en contacto con los capilares sanguíneos de la hipodermis. Por consiguiente, si un fármaco es capaz de difundir por el líquido acuoso intraluminal y acceder a la base de la glándula, puede absorberse y acceder a la circulación sistémica, de este modo, salvando la barrera del estrato córneo. Se trata de una vía de penetración idónea para sustancias hidrófilas de bajo peso molecular y algunos electrolitos.

En referencia al sistema pilosebáceo, si un fármaco es capaz de difundir a través de la secreción altamente lipófila del canal folicular y llegar a la base de una de estas dos estructuras, se absorberá fácilmente. Esto se debe a que la base del pelo, es de cubierta no queratinizada y, está próxima a los capilares sanguíneos; por su parte las glándulas sebáceas, tienen cubierta epidérmica poco consistente y discontinua, por lo que resulta fácil la difusión por la dermis hasta los vasos sanguíneos. El paso de fármacos a través de ésta vía resulta más efectivo que el anterior, ya que transcurre por los poros acuosos de las glándulas sudoríparas. No obstante, debido a la escasez

de folículos pilosos en comparación con el volumen total útil que representa el estrato córneo, tampoco parece una vía general de entrada de fármacos. Existen, sin embargo, sustancias que difunden con facilidad en los folículos y se absorben preferentemente por esta vía. Se trata de moléculas de gran volumen y de elevado peso molecular, como pueden ser corticoides antiinflamatorios, cuya difusión en el estrato córneo se ve dificultada por la formación de enlaces con la queratina hidratada (Franz, 1975).

También hay que tener en cuenta el efecto del metabolismo de los enzimas que se encuentran en la piel, mayoritariamente en la epidermis, glándulas sebáceas y folículos pilosos. Aunque el efecto metabólico de estos enzimas no es tan marcado como el producido por el hígado, sí que puede reducir la biodisponibilidad de los fármacos aplicados por esta vía (Williams, 2003).

5.3. Estrategias promotoras de la absorción transdérmica

Para que un fármaco aplicado sobre la piel produzca un efecto sistémico ha de ser capaz de atravesar el estrato córneo en cantidad suficiente para acceder a la circulación sistémica.

La liberación del fármaco desde el dispositivo que lo contiene, debería ser el factor limitativo de su absorción transdérmica y, por tanto, el que controlara la obtención de niveles plasmáticos terapéuticos en el estado estacionario. Sin embargo, este no es generalmente el caso, ya que el máximo flujo posible del fármaco a través del estrato córneo intacto suele ser menor que su velocidad de liberación.

Por ello, con el fin de incrementar el paso de estos fármacos a través de la piel se han desarrollado diversas metodologías, para ampliar así la cantidad de fármacos capaces de formar parte de sistemas de administración transdérmica. En la actualidad, un esfuerzo considerable se dirige a reducir la función barrera del estrato córneo, de modo que mediante un STAT de tamaño razonable pueda ser administrada una dosis efectiva.

Entre los métodos que se han mostrado eficaces, cabe destacar los promotores químicos, la iontoforesis y la microporación láser, que son los que se han utilizado en este trabajo.

5.3.1. Promotores químicos de la absorción transdérmica

Consiste en el empleo de sustancias químicas de diversa naturaleza capaces de incrementar la absorción transdérmica de fármacos (Barry, 1983, 1987; Williams, 1992; Chattaraj y Walker, 1995; Femenia-Font *et al.*, 2006a; del Rio-Sancho *et al.*, 2012; del Rio Sancho *et al.*, 2013).

Para que un promotor de absorción transdérmica se utilice como tal, idealmente debe reunir una serie de características:

- Ha de ser farmacológica y químicamente inerte y estable.
- Debe ser potente, con actividad específica y efectos reversibles en la piel.
- Tiene que ser compatible con el fármaco y el resto de excipientes de la formulación.
- No debe producir irritación, ni ser sensibilizante, fototóxico o comedogénico.
- Debe poseer unos buenos caracteres organolépticos.

Estas sustancias se pueden clasificar siguiendo diversos criterios propuestos por diferentes autores. Así, diferentes autores proponen una clasificación de los promotores en base a sus propiedades químicas (Hori *et al.*, 1990; Chattaraj y Walker, 1995; Williams y Barry, 2004).

En la actualidad, el mecanismo de acción de las sustancias promotoras de la absorción transdérmica no se encuentra totalmente aclarado, aunque se conocen ciertos aspectos de los mismos. El efecto de los distintos promotores de absorción transdérmica puede resumirse en la teoría enunciada por Barry en 1988 como “Lipid-protein-partitioning” (Barry, 1988). De ella se deduce que en líneas generales, las modificaciones que los promotores provocan en la piel pueden relacionarse con la estructura de los lípidos intercelulares y con la conformación de las proteínas intracelulares. Además pueden modificar el coeficiente de reparto del fármaco en la piel.

A continuación, se describen algunas de las sustancias químicas más estudiadas como promotores de absorción transdérmica y que pueden ser incluidas en un sistema de administración transdérmica:

- El **agua** es una de las sustancias de la que más se han estudiado sus efectos como promotor de la permeabilidad cutánea.

Por lo general, el incremento de la hidratación del tejido cutáneo aparece relacionado con el aumento de la absorción transdérmica de sustancias hidrófilas y lipófilas. La oclusión aumenta el efecto farmacológico tópico de un gran número de fármacos. Este efecto se ha relacionado con la hidratación de la queratina y de los lípidos intercelulares. Algunos estudios realizados mediante análisis calorimétrico diferencial sugieren que el agua aumenta la fluidez de la bicapa lipídica. Según ello, las moléculas de agua se asocian a las cabezas polares de los lípidos disminuyendo su grado de empaquetamiento. Además, el agua también puede afectar las moléculas de α -queratina, por un mecanismo competitivo por los puntos de unión con el hidrógeno en las cadenas proteicas, lo que se traduciría en una expansión de los corneocitos. Diferentes autores señalan que la relación entre el aumento del contenido en agua de los lípidos intercelulares y el aumento de la fluidez resultante es compleja. Por otra parte, otros autores indican que no se producen modificaciones apreciables en la estructura y organización de los lípidos del estrato córneo, incluso con porcentajes de hidratación elevados (hasta 150%). Así, por ejemplo, Wester y Maibach relacionan el efecto promotor del agua con su capacidad disolvente (Wester y Maibach, 1995).

- Los **alcoholes** son sustancias muy utilizadas y que han sido ampliamente estudiadas como promotores de la absorción transdérmica (Cooper *et al.*, 1985; Aungst *et al.*, 1986; Sarpotdar *et al.*, 1986; Kaiho *et al.*, 1987). Pueden dividirse en dos grupos: los de cadena corta (entre 2 y 6 carbonos) y los de cadena larga (entre 6 y 14 carbonos). El efecto de los primeros se cree que resulta de la desestabilización de los lípidos del estrato córneo, los segundos estarían más relacionados con el aumento de la plasticidad de la piel.

Además, se ha observado que algunos alcoholes de baja masa molecular presentan un efecto sinérgico con otros promotores no polares de penetración, incrementando así en mayor medida el flujo transdérmico de fármaco.

El **etanol** es muy utilizado en formulaciones transdérmicas debido a que es un potente solvente tanto de sustancias polares como apolares. Diversos estudios han demostrado su acción promotora de penetración cutánea de diversos fármacos. Sin embargo, su efecto promotor parece ser dependiente de su propia concentración; de modo que, a bajas concentraciones, parece que actúa incrementando la solubilidad de los fármacos en el estrato córneo, mientras que a concentraciones elevadas, se ha indicado que produce la extracción de los lípidos intercelulares y produce expansiones osmóticas en el estrato córneo (Bommannan *et al.*, 1991; Heard *et al.*, 2006). También se ha descrito que para determinados compuestos, como el estradiol, el empleo de etanol en elevadas proporciones produce una disminución de los valores de flujo transdérmico a consecuencia del efecto de deshidratación que se produce en el estrato córneo (Liu *et al.*, 1991; Kalbitz *et al.*, 1996).

Entre los **glicoles** más estudiados con efecto promotor de la absorción transdérmica destaca el propilenglicol. Se trata de un compuesto muy efectivo en la penetración de diferentes fármacos susceptibles de ser administrados sobre la piel, siendo utilizado en numerosas formas farmacéuticas de aplicación tópica. El propilenglicol parece ser más efectivo como promotor de sustancias que cuya solubilidad es mayor en alcohol que en agua (Trommer y Neubert, 2006). Cuando se combina con otros promotores, se consigue un efecto sinérgico, como por ejemplo cuando es empleado con el ácido oleico (Larrucea *et al.*, 2001). Su mecanismo de acción se ha relacionado, al igual que en el caso del etanol con un aumento de la solubilidad del fármaco en el vehículo, aunque tampoco se descarta un aumento del reparto del fármaco en el estrato córneo motivado por la presencia del propilenglicol. Esto podría deberse a que se intercala en la

cabeza polar de los lípidos de las bicapas lipídicas de los tejidos y a la solvatación de la queratina del estrato córneo por competición con agua por los sitios de unión del hidrógeno (Williams y Barry, 2004).

Los **alcoholes grasos** normalmente se aplican en la piel en un cosolvente, como el propilenglicol o el etanol. La efectividad de este grupo parece que está relacionada con el número de carbonos de forma parabólica, de manera que el decanol ha sido el que ha mostrado el efecto máximo. No obstante, este grupo de promotores produce irritación con mucha frecuencia (Kanikkannan y Singh, 2002).

- Los **ácidos grasos** se comportan como promotores de absorción percutánea de numerosos fármacos. El empleo con cosolventes, como el propilenglicol o el etanol, ha demostrado incrementar la eficacia de estos compuestos (Aboofazeli *et al.*, 2002). La influencia de la estructura de los ácidos grasos en su capacidad promotora ha sido puesta de manifiesto en diversos estudios; así la longitud de la cadena alquílica y el número, posición y configuración de dobles enlaces condicionan su eficacia como promotores (Engelbrecht *et al.*, 2011). Por ejemplo, la capacidad de los ácidos fenilalquilcarboxílicos para incrementar la absorción transdérmica del 5-fluorouracilo es mayor a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica (Williams, 2003).

Asimismo, estudios sobre la posición y configuración de los dobles enlaces en los ácidos grasos permiten demostrar que los isómeros *cis* son más eficaces que los *trans* (Engelbrecht *et al.*, 2011). Parece ser que el mecanismo de acción del ácido oleico, promotor muy estudiado, se encuentra relacionado con su capacidad para interferir en la ordenación de los lípidos intercelulares del estrato córneo. El ácido oleico es capaz de incorporarse en los lípidos del estrato córneo, alterando su estructura de empaquetamiento ordenado y alterando las capas de hidratación, facilitando la entrada de fármacos (Lewis y Hadgraft, 1990; Jiang y Zhou, 2003). Igualmente se ha descrito que a elevadas concentraciones, el ácido oleico puede existir como una fase separada entre las bicapas lipídicas

(Ongpipattanakul *et al.*, 1991; Tanojo H *et al.*, 1997) o como una única capa laminar (Engelbrecht *et al.*, 2011).

Existen estudios en los que ácidos grasos saturados con una longitud de la cadena carbonada de entre 10 y 12 carbonos junto con un grupo polar resultan potentes promotores, mientras que en los ácidos grasos insaturados parece que la longitud adecuada es de 18 carbonos (Aungst *et al.*, 1986; Aungst, 1989). Se ha observado que los ácidos grasos insaturados son más efectivos como promotores que sus homólogos saturados (Ahad *et al.*, 2009).

- El **Azone**[®] (1-dodecilazacicloheptan-2-ona o laurocapram) fue la primera molécula específicamente diseñada como promotor de la penetración cutánea de fármacos. El Azone[®] es altamente lipófilo, tiene un log P de 6.2 y es soluble en la mayoría de disolventes orgánicos, incluyendo alcoholes. Su efecto ha quedado demostrado en múltiples estudios llevados a cabo con diversos fármacos (Hadgraft, 1985; Sugibayashi *et al.*, 1988; Hadgraft *et al.*, 1993) y, a partir de éste, se han sintetizado otros análogos del mismo y estudiado sus efectos como promotores de penetración (Okamoto *et al.*, 1991).

Su mecanismo de acción se relaciona con su capacidad de interacción con los lípidos del estrato córneo, aumentando su fluidez (Bouwstra *et al.*, 1989). La inserción en las bicapas lipídicas de su cabeza voluminosa impide el empaquetamiento de los lípidos cutáneos. Otros autores indican que la cadena de 12 carbonos del Azone[®], que corresponde a las dimensiones del esqueleto del colesterol, podría facilitar la ruptura de las interacciones colesterol-colesterol y colesterol-ceramidas y así fluidificar el estrato córneo, haciéndolo más permeable (Allan, 1995). Numerosos estudios indican que el Azone[®] favorece la penetración de compuestos hidrofílicos en mayor medida (Barry y Bennett, 1987; Singh *et al.*, 2005). Ward y Tallon (Ward y Tallon, 1988) y Díez-Sales y colaboradores (Díez-Sales *et al.*, 1996) indican que ello puede ser debido a la capacidad que posee este compuesto para incrementar la hidratación de la matriz lipídica, mejorando así el reparto de compuestos

hidrófilos en el estrato corneo. Por otra parte, sus efectos dependen de la concentración a la que se emplee, resultando más efectivo a bajas concentraciones, por ello se utiliza comúnmente a concentraciones entre el 1-5% (Williams y Barry, 2004).

- Los **tensioactivos** se pueden encontrar en muchas de las formulaciones terapéuticas o cosméticas existentes en la actualidad, como champús o jabones. Estos se añaden a las formulaciones para solubilizar compuestos activos lipófilos y para solubilizar los lípidos de la superficie del estrato córneo. Por norma general su estructura está formada por una cadena alquílica o una cadena arílica (lipófila) unidos a un grupo hidrófilo. Dependiendo de sus características estructurales son clasificados en: aniónicos, como el laurilsulfato sódico, en catiónicos, no iónicos y zwitterionicos, como la dodecilbetaína. Tanto los aniónicos como los catiónicos pueden dañar la piel humana, de hecho el LSS es utilizado como control positivo en estudios de irritación (Clemmensen *et al.*, 2008; Atrux-Tallau *et al.*, 2009). Los tensioactivos pueden interactuar con proteínas e inactivar enzimas y enlaces en el estrato córneo. Se cree que los de tipo aniónico pueden actuar sobre el Factor Natural de Hidratación modificando la unión del agua con el estrato córneo (Somasundaran, 2006; Barel *et al.*, 2009). También son capaces de extraer lípidos del estrato córneo y desestabilizar el empaquetamiento lipídico en la piel (Scheuplein y Ross, 1970).
- Los **terpenos** son sustancias naturales presentes en los aceites esenciales. Ambos, aceites esenciales y terpenos, han sido descritos como promotores de la absorción transdérmica. Entre los más utilizados se encuentran cineol, d-limoneno y mentol (Rizwan *et al.*, 2008). Su mecanismo de acción, en un principio se relacionó con su capacidad de romper el empaquetamiento de los lípidos intercelulares, incrementando la difusión en el estrato córneo de fármacos hidrófilos. También se atribuyen a estos compuestos efectos disolventes que incrementan el reparto de fármacos lipófilos en este estrato. Algunos autores han descrito una cierta relación estructura-actividad

fármaco–específica para los terpenos (Williams y Barry, 1991a; Moghimi *et al.*, 1998; Doliwa *et al.*, 2001b; Ota *et al.*, 2003). Esta relación parece indicar que uno de los mecanismos de acción por el que los terpenos aumentan la absorción transdérmica de los fármacos es mediante la modificación del estrato córneo, favoreciendo el reparto del fármaco en el tejido (Williams y Barry, 1991b). Estudios posteriores señalan un incremento de la conductividad de la epidermis tras el tratamiento con estos compuestos, lo cual sugiere una acción adicional en el estrato córneo, la formación de microporos, a través de los cuales difundirían los iones y los fármacos polares. Otras acciones atribuidas a los terpenos se relacionan con la formación de microgotas de terpeno dentro de la región lipídica e incluso en el interior de los corneocitos. El D-limoneno ha demostrado una mejora relevante en la penetración de gran cantidad de compuestos lipófilos como domperidona, verapamilo, estradiol y midazolam (Obata *et al.*, 1991; Williams, 1992; Calpena *et al.*, 1994; Escribano *et al.*, 1995; Ota *et al.*, 2003).

- Las **pirrolidonas** y sus derivados también han sido estudiados como promotores de absorción transdérmica en humanos. Al igual que el Azone® y otros promotores, este grupo parece ser más efectivo para moléculas hidrófilas que para hidrófobas. Algunas de las sustancias representativas de este grupo son la N-metil-2-pirrolidona y la 2-pirrolidona. La N-metil-2-pirrolidona, ha sido utilizada con un éxito relativo en la absorción de captopril desde un parche matricial (Park *et al.*, 2001). La N-metil-2-pirrolidona es un producto intermediario de la síntesis del excipiente polivinilpirrolidona (PVP) utilizado, entre otros, en la formulación de parches matriciales (Femenia-Font *et al.*, 2006b; Balaguer-Fernandez *et al.*, 2008; Balaguer-Fernandez *et al.*, 2010).
- Los **sulfóxidos**, como el dimetilsulfóxido, la dimetilacetamida o la dimetilformamida, han sido muy estudiados y han mostrado efectos promotores tanto con xenobióticos hidrófilos como lipófilos. Su actividad depende de la concentración a la que se encuentren, se necesitan concentraciones relativamente elevadas para alcanzar un efecto óptimo. El

dimetilsulfóxido (DMSO) ha resultado eficaz para aumentar la penetración transdérmica de compuestos como prazosina (Reddy y Ghosh, 2001), azatropina (Tashtoush *et al.*, 2004) y ciclosporina A (Liu *et al.*, 2006). El problema existente con estas sustancias es que a concentraciones elevadas pueden producir irritación y desnaturalización de las proteínas del estrato córneo (Kligman, 1965). Aunque la dimetilformamida resulta eficaz como promotor de la absorción transdérmica, produce daños irreversibles en el estrato córneo (Southwell y Barry, 1983; Barry *et al.*, 1984; Bennett *et al.*, 1985). Nuevos derivados sintéticos del DMSO, los iminosulfiranos, han resultado efectivos como promotores sin resultar tóxicos (Kim *et al.*, 1999).

- La **urea** es una sustancia hidratante muy utilizada tanto en cosmética como en terapéutica. Su actividad como promotor viene dada por su efecto queratolítico tras contacto prolongado o elevadas concentraciones (Kalbitz *et al.*, 1996) y por un incremento del contenido acuoso del estrato córneo (Williams y Barry, 2004). La urea demostró producir un incremento en la absorción de la hidrocortisona y de la hidratación en un estudio llevado a cabo con 200 pacientes (Banerjee *et al.*, 1990).

5.3.2. Iontoforesis

La iontoforesis es una técnica que se engloba dentro de los promotores físicos de absorción transdérmica. Consiste en la aplicación de una corriente continua de baja intensidad en el área de administración, que en función de las propiedades y características del fármaco y la formulación, promueve el paso de sustancias mediante el fenómeno conocido como electrotransporte.

El electrotransporte puede dividirse en electroosmosis (EO) y electromigración (EM). La EO se debe fundamentalmente al flujo de solvente que se genera entre los polos (ánodo y cátodo), que arrastra al fármaco en el sentido del flujo de solvente. La EM es debida esencialmente a la carga neta de la molécula, así pues una molécula no cargada apenas se verá afectada por este fenómeno.

Como se puede observar en la Figura 5, un sistema iontoforético está formado por una fuente de energía y los dos compartimentos de los electrodos. En un compartimento se sitúa el fármaco preferiblemente ionizado y con una carga igual a la del electrodo, es decir si el fármaco tiene carga positiva se ha de introducir en el compartimento del electrodo positivo (ánodo). El otro compartimento con el electrodo contrario se situará a cierta distancia, de forma que no exista contacto entre ambos electrodos. Este compartimento se llenará con una solución rica en iones para facilitar el paso de la corriente (Kalia *et al.*, 2004).

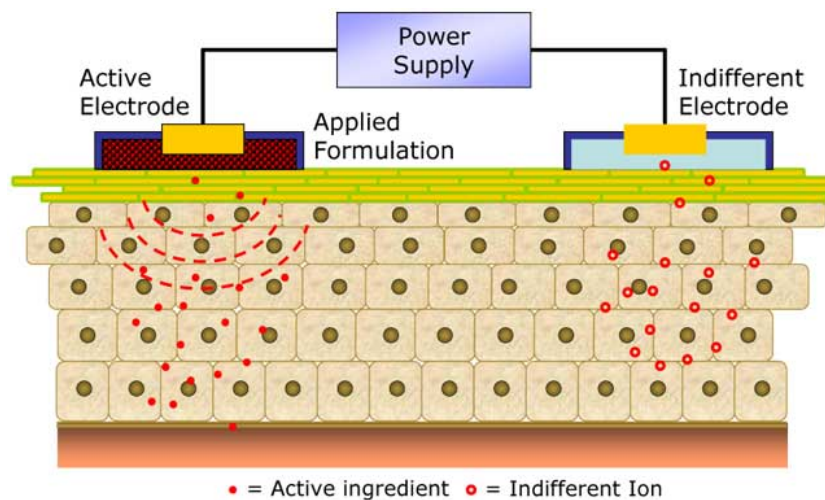


Figura 5. Esquema de aplicación de la iontoforesis. Imagen obtenida de: <http://www.skin-care-forum.basf.com/>

Aunque existen muchos tipos de electrodos, los que se utilizan con mayor frecuencia son los de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl) debido a que evitan cambios bruscos de pH, lo cual es importante ya que un aumento de protones en la solución puede producir competencia iónica reduciendo la absorción transdérmica del fármaco. Además, una bajada de pH podría afectar tanto a la estabilidad de la molécula como a la integridad de la piel (Phipps *et al.*, 1989; Sage, 1992).

Una vez se aplica la corriente, el campo eléctrico impone una direccionalidad del flujo de iones. El fármaco cargado positivamente que se encuentre en el ánodo (+) se moverá hacia el cátodo (-) mientras que los aniones se moverán en la dirección opuesta. Debido a las reacciones electroquímicas que se producen al aplicar la corriente, el electrodo del ánodo (Ag) se transformará a (AgCl) liberando electrones, y

el del cátodo (AgCl) se transformará a (Ag) liberando iones cloruro. Es importante que existan suficientes iones cloruro en el ánodo, ya que pueden ser un factor limitante en la iontoforesis. No obstante, añadir estos iones en forma de cloruro sódico aumenta los iones sodio que también son contraproducentes al competir con el fármaco, reduciendo la electromigración (Kalia *et al.*, 2004). Para evitar esta competencia iónica se puede introducir el ánodo (Ag) en una solución salina acuosa separada, que se comunica con la solución del fármaco mediante puentes salinos que permiten el paso de corriente (Gratieri *et al.*, 2011).

En la actualidad la iontoforesis es una de las técnicas más importantes y estudiadas para promover el paso de fármacos a través de la piel. Tanto es así que el número de fármacos objeto de estudio utilizando la iontoforesis se ha incrementado de forma notable desde su aparición (Saladin *et al.*, 2009). La utilización de la iontoforesis para promover el paso de péptidos o proteínas ha avanzado mucho en los últimos años. Se ha conseguido el paso de proteínas de hasta 17.4 kDa (Dubey *et al.*, 2011) sin que ello suponga una degradación de las mismas (Dubey y Kalia, 2010, 2011; Dubey *et al.*, 2011) No obstante, el uso práctico de la iontoforesis todavía se encuentra limitado, es necesario desarrollar sistemas iontoforéticos fáciles de usar y coste-efectivos que aseguren la estabilidad de los fármacos y optimicen su eficiencia de liberación (Gratieri *et al.*, 2011).

5.3.3. Microporación laser

La utilización de esta técnica es muy reciente y en la actualidad no existen muchos estudios publicados al respecto. Esta técnica fue utilizada por primera vez por Jacques *et al.* en 1987, utilizando de forma pulsátil un láser de fluoruro de argón para eliminar el estrato córneo progresivamente (Jacques *et al.*, 1987). Otros tipos de láser utilizados con posterioridad son el de rubí "Q-switching" (Lee *et al.*, 1999), el Nd:YAG (Gomez *et al.*, 2008) y el de CO₂ (Hsiao *et al.*, 2011). Los sistemas láser más utilizados en la actualidad con este propósito, utilizan láseres del tipo Er:YAG (erbium-yttrium aluminium garnet) que emiten luz a 2936 µm. Esta longitud de onda, corresponde con el mayor pico de absorción del agua (Bachhav *et al.*, 2010) y en consecuencia produce la excitación y posterior evaporación explosiva de las moléculas de agua de la piel que

crean los microporos al salir. La duración de los pulsos, menor que el tiempo de relajación térmica de las moléculas de agua, evita la transferencia térmica a los tejidos adyacentes y reduce el daño de los mismos. Este tipo de ablación se conoce como “ablación fría”.

La energía láser aplicada por unidad de área (fluencia) controla la profundidad de cada microporo, y debido a la alta tasa de repetición del aparato es posible crear cientos de poros en unos pocos segundos. La posibilidad de controlar el número de poros creados en la piel y su profundidad, permite un mayor control de la liberación de la dosis, que a su vez hace posible la individualización de la administración. Existen otros sistemas láser en los que el número de microporos que producen es fijo y depende del aparato (Fang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006; Bachhav *et al.*, 2011).

Esta técnica permite abrir poros en el estrato córneo, la capa más superficial de la piel y por tanto, es de esperar que aumente la absorción de moléculas con un carácter más hidrófilo. No obstante, la mayoría de compuestos pueden ver mejorada su absorción sean hidrófilos o no, como consecuencia del daño físico que se produce al estrato córneo.

En la siguiente imagen se puede observar el diseño del sistema P.L.E.A.S.E.[®] o “Precise Laser Epidermal System” para aplicación transdérmica que se encuentra todavía en fase de desarrollo:



Figura 6. "P.L.E.A.S.E.[®] Private". Imagen obtenida de: <http://www.pantec-biosolutions.com/en/products-and-services/please-devices>

Con este sistema se ha conseguido el paso de anticuerpos de aproximadamente 155 kDa, funcionalmente activos y a concentraciones terapéuticas sin necesidad de agujas (Yu *et al.*, 2011). Esto supone un gran avance respecto a otras técnicas promotoras como la iontoforesis donde la proteína de mayor tamaño que ha conseguido pasar es de 17.4 kDa (Dubey *et al.*, 2011).

Una técnica que hace uso de una tecnología láser similar ya ha sido utilizada en tratamientos estéticos. La técnica conocida como “resurfacing” elimina selectivamente una fracción de la superficie de la piel mediante ablación, produciendo un aumento del proceso regenerativo del área y estimulando los procesos de curación y la producción de colágeno y elastina. Esta técnica se considera apropiada para la reducción de arrugas y del tamaño de los poros, mejorar la textura de la piel y su elasticidad, el acné y las cicatrices derivadas del mismo, entre otras aplicaciones (Teikemeier y Goldberg, 1997).

6. Sistemas Terapéuticos de Administración Transdérmica (STAT)

Un Sistema Terapéutico de Administración Transdérmica es un sistema destinado a ser aplicado sobre una zona determinada de la piel, que debe estar intacta, limpia y seca, y que sirve de soporte o vehículo para uno o varios principios activos destinados a ejercer un efecto sistémico tras su liberación y absorción a través de las estructuras cutáneas.

Frente a otras formas de administración, los Sistemas Terapéuticos de Administración Transdérmica presentan una serie de ventajas:

- Proporcionan una liberación controlada del principio activo es decir, permiten mantener de forma prolongada y constante la concentración de fármaco en el organismo, dentro de los valores eficaces.
- Minimizan la aparición de efectos secundarios, relacionados con la oscilación de los niveles plasmáticos máximos y mínimos que proporciona la administración oral, por ejemplo, y se reduce la frecuencia en la dosificación.

- Posibilitan la modificación de la dosis de fármaco administrado cambiando únicamente el tamaño de sistema terapéutico.
- Permiten la interrupción de la administración de forma inmediata, simplemente separando el sistema transdérmico de la piel.
- Ofrecen comodidad de aplicación y mantenimiento, de modo que aumentan la aceptación por parte del paciente e incrementan por lo tanto la adherencia al tratamiento.

No obstante, el empleo de Sistemas Terapéuticos de Administración Transdérmica de fármacos también presenta una serie de inconvenientes:

- La piel representa una gran barrera al paso de sustancias, principalmente, su capa más externa, el estrato córneo, capa resistente e hidrofóbica dificulta la difusión de principios activos y la pérdida de agua (Knepp *et al.*, 1987). Lo que supone una limitación del número de principios activos capaces de ser administrados mediante estos dispositivos terapéuticos.
- Los principios activos empleados deben ser farmacológicamente potentes debido a que los flujos transdérmicos pasivos son relativamente bajos y las cantidades que penetren deben permitir alcanzar niveles plasmáticos terapéuticamente eficaces.
- Por otra parte, existe una limitación en el área máxima y, por tanto, en la dosis del parche transdérmico. Se considera que de 40 a 50 cm² es la superficie máxima que puede ocupar un diseño de este tipo por motivos estéticos y económicos.
- Los sistemas de administración transdérmica son relativamente más caros que las formas convencionales de dosificación. Además, contienen grandes cantidades de fármaco de las que sólo un pequeño porcentaje se absorberá durante el periodo de aplicación. El principio activo residual supone una pérdida económica y puede ocasionar intoxicaciones accidentales.
- No es posible administrar fármacos que sean potencialmente irritantes o que puedan provocar una posible respuesta alérgica en la piel. Es necesario considerar la irritación de la piel a nivel local que se puede

producir, ocasionada tanto por el principio activo como por el contacto del dispositivo transdérmico (adhesivos, polímeros, efecto oclusivo, etc.) con la piel en el sitio de aplicación.

- Determinados fármacos pueden sufrir una biotransformación debido a los enzimas de la epidermis y dermis o bien debido a los microorganismos presentes en la superficie cutánea. Por este motivo, es fundamental conocer cuál es la pérdida de principio activo debida al metabolismo.

6.1. Clasificación de los STAT

Un Sistema Terapéutico de Administración Transdérmica está constituido por una serie de capas consecutivas y cada una de ellas posee una función específica. El tipo de capa y su organización dependerán del tipo de parche. Las principales capas son: la lámina protectora externa o “liner”, protege el STAT durante el almacenamiento y se ha de retirar antes de usarlo; el adhesivo, sirve para fijar el STAT a la piel; el fármaco, bien puede estar en forma de reservorio o disuelto en una matriz polimérica en función del tipo de sistema; la membrana, controla la liberación del fármaco; la lámina de soporte o “backing”, que protege al parche del daño externo durante su utilización.

Hay que tener en cuenta que si el fármaco se libera a una velocidad menor a su velocidad de absorción, el sistema transdérmico será el factor que controle su absorción; si el fármaco se libera a mayor velocidad que la velocidad de absorción a través de la piel, el estrato córneo será el que controle la velocidad de absorción del fármaco.

Los STATs se clasifican, según posean en el módulo de liberación una membrana que controla la liberación del principio activo o no, en dos tipos (Femenía-Font *et al.*, 2004; Dhiman *et al.*, 2011):

6.1.1. Sistemas de tipo matricial

- *Matriz polimérica adhesiva monocapa*

Los sistemas transdérmicos de una única capa adhesiva presentan una excelente aceptación por parte del paciente (es un STAT muy fino) y ciertas ventajas tecnológicas

(facilidad en su fabricación si se compara con los sistemas reservorio). Estas características hacen que, actualmente, sean los sistemas de elección. Por ello numerosos principios activos se incorporan en dispositivos de este tipo (Nitro – Dur II®).

En este tipo de sistemas el fármaco se encuentra disperso en el adhesivo, es decir la matriz la constituye el sistema afianzador. Por ello el adhesivo que constituye estas matrices debe permitir incorporar gran cantidad de fármaco sin perder sus propiedades adhesivas. Este tipo de parche se caracteriza por la inclusión de una matriz semisólida que contiene al fármaco y que se encuentra en contacto directo con la lámina protectora externa.

Los componentes utilizados para la matriz suelen ser polímeros hidrofílicos, como polivinilalcohol, polivinilpirrolidona, derivados celulósicos, polímeros del ácido acrílico, polisacáridos naturales de elevado peso molecular como las gomas y alginatos, etc. Estos polímeros presentan una excelente adaptación y compatibilidad con la piel, son permeables a los principios activos y carecen de efectos irritantes. Un ejemplo de estos sistemas de administración transdérmica lo constituye Nitrodur®, que contiene nitroglicerina dispersa en una matriz polimérica formada por glicerol, polivinilalcohol y polivinilpirrolidona.

También hay matrices constituidas por agentes elastoméricos, mezclados con el principio activo, y posteriormente polimerizados con ayuda de un catalizador. Los elastómeros que más se utilizan son los de silicona (Snorraddottir *et al.*, 2009).

Como se puede observar en la Figura 7 estos sistemas están formados por: la lámina de soporte, la capa adhesiva en la cual se encuentra el fármaco, los polímeros y el resto de excipientes, y la lámina protectora externa.

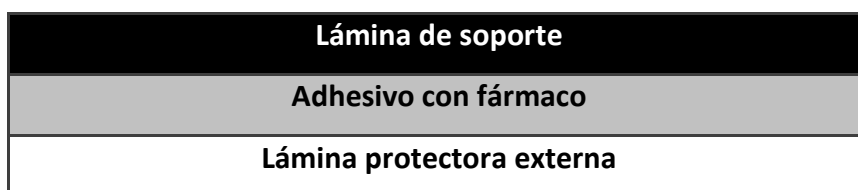


Figura 7. Sistema terapéutico de administración transdérmica con matriz polimérica de única capa adhesiva.

Según las características concretas de cada sistema, algunos pueden incluir una lámina protectora externa, que puede hacer el sistema más oclusivo, lo que favorece la absorción transdérmica del fármaco que incorpora.

➤ *Matriz polimérica adhesiva multicapa*

Las multilaminares se elaboran de tal modo que la concentración de fármaco en las diferentes capas va decreciendo y así se consigue que la liberación del fármaco siga una cinética de pseudo orden cero (Deponit®). Este tipo de parches es muy parecido a los monocapa en cuanto a composición pero puede incorporar varias capas que en ocasiones van separadas por una membrana como se muestra en la Figura 8.



Figura 8. Sistema terapéutico de administración transdérmica con matriz polimérica adhesiva multicapa.

➤ *Matrices provistas de microdepósitos*

En este tipo de sistema la matriz está constituida por multitud de microcompartimentos hidrófilos de tamaño entre 10 y 40 μm dispersos en un polímero hidrófobo. El proceso de liberación del principio activo es más complejo que en los sistemas anteriores, ya que inicialmente debe difundir el fármaco del compartimento acuoso a la matriz polimérica y de ésta a la piel. De esta manera se obtiene una cesión de pseudo orden cero. Un ejemplo de este tipo de matriz es el STAT Nitrodisc®.

6.1.2. Sistemas de tipo reservorio o de membrana

Presentan una membrana porosa que controla la liberación del fármaco. Por ello proporcionan una velocidad de liberación del principio activo de orden cero, mientras la concentración de fármaco en el reservorio permanezca constante. Se diferencian

unos de otros en su estructura, según estén diseñados para contener un reservorio de fármaco líquido (ej. Nitroderm®), semisólido (ej. Duragesic®) o sólido (ej. Catapress®).

Para evitar las posibles pérdidas de fármaco desde el reservorio, estos sistemas incorporan una lámina protectora. Estas láminas, están fabricadas de material plástico (como poliéster o polietileno), metálicas (de aluminio) o bien mixtas (aluminio plastificado).

A fin de posibilitar la fijación de éste tipo de dispositivo a la piel, por debajo de la membrana que controla la liberación, se sitúa una capa adhesiva.

Para elaborar la capa adhesiva se utilizan sustancias adhesivas que se adhieren a un sustrato cuando se aplica una pequeña presión (“Pressure Sensitive Adhesives” o PSA), que al retirar el sistema no dejan residuos. Además se adhieren a todo tipo de piel (grasa, húmeda, hirsuta, etc.). Las propiedades adhesivas del sistema transdérmico no se deben de modificar por las variaciones en las condiciones ambientales como la humedad o la inmersión en agua y es deseable que los adhesivos tengan elevada porosidad o que permitan la respiración de la piel, para prevenir el daño de la misma. Los polímeros que se suelen utilizar como adhesivos son derivados de poliisobutileno, poliacrilatos y siliconas y su elección dependerá de las propiedades específicas que se desee para el sistema transdérmico.

En la Figura 9 se puede ver la disposición de las capas en un parche tipo reservorio:



Figura 9. Sistema terapéutico de administración transdérmica de tipo reservorio o membrana.

7. Métodos experimentales *in vitro* para el estudio de la absorción transdérmica

7.1. Células de difusión con membrana limitante

Para la realización de los experimentos *in vitro* de absorción percutánea la mayoría de los sistemas empleados se basan en la utilización de células de difusión formadas por dos compartimentos separados por una membrana, uno dador con la solución del penetrante, y otro receptor que contiene la solución receptora. De esta forma se dispone un sistema en desequilibrio termodinámico que favorece el paso del compartimento dador al receptor, como se explica en el punto 6.

La membrana que se emplea puede ser de distinta naturaleza según la finalidad del ensayo planteado. En algunos casos se emplean membranas artificiales, de fácil adquisición y normalmente reutilizables, como las de polidimetilsiloxano (Hatanaka *et al.*, 1990), acetato de celulosa o poliuretano. Sin embargo, las membranas naturales son las que permiten una mayor aproximación a la realidad, y de ellas la piel humana sería la de elección (Díez-Sales *et al.*, 1993). No obstante, la utilización de piel humana se ve supeditada a la dificultad de abastecimiento de la misma, por lo que no siempre es posible obtenerla. Consecuentemente, de forma habitual se utilizan con buenos resultados, pieles procedentes de otras especies animales muy variadas: rata (Ohara *et al.*, 1995), conejo (van de Sandt y Rutten, 1995), cerdo (Rudy y Senkowski, 1973; Marro *et al.*, 2001), etc. De entre todos los modelos posibles, el más utilizado y el que mejor correlación suele presentar con los resultados con piel humana es la piel de oreja de cerdo (Priborsky y Muhlbachova, 1990; Bhatia y Singh, 1996; Barbero y Frasch, 2009).

7.2. Técnicas experimentales

Para que un sistema reproduzca las condiciones que prevalecen *in vivo*, debe permitir que se establezcan gradientes de hidratación y temperatura a través de la membrana (Akhter y Barry, 1983).

Se han diseñado diferentes tipos de células (o celdas) de difusión para la realización de ensayos de absorción transdérmica. Las células están formadas por dos compartimentos: el compartimento dador se sitúa sobre el receptor y entre ellos se dispone la membrana en posición horizontal. De esta forma, el fármaco difunde desde el compartimento dador a través de la membrana hasta el receptor. En general, este tipo de células pueden diferenciarse en dos grupos: células de difusión estáticas, propuestas por Coldman (Coldman *et al.*, 1969) y modificadas por Franz (Franz, 1978), en las cuales la solución del compartimento receptor se mantiene, extrayendo exclusivamente el volumen para la toma de muestras y reponiéndolo con solución fresca; y las células de flujo continuo (Foreman *et al.*, 1977), en las que el contenido del compartimento receptor está en continua renovación tratando de simular el drenaje vascular, lo que resulta muy útil en el caso de sustancias penetrantes poco solubles en el fluido receptor, o por el contrario sustancias que alcancen elevadas concentraciones en el mismo, ya que en ambos casos la velocidad de difusión puede estar limitada por la pérdida de las condiciones de sumidero (Crutcher y Maibach, 1969). Las condiciones “sink” o “sumidero” permiten que la concentración de la sustancia permeada sea lo más cercana a cero posible en el compartimento receptor, favoreciendo así la difusión de la misma por efecto del gradiente de concentraciones entre los dos compartimentos.

Algunas células pueden presentar una camisa externa que las recubre. Esta se conecta a un flujo de agua a la temperatura deseada para de esta forma mantener la temperatura controlada. No obstante, con este fin también se pueden utilizar baños termostáticos con un soporte especial para las células sin camisa.

Normalmente el vehículo dador no se agita durante el tiempo de ensayo con el fin de reproducir las condiciones en las que el medicamento se aplica sobre la piel, donde se dan fenómenos de evaporación, difusión y depleción.

Las células diseñadas para este tipo de ensayos pueden utilizarse con cualquier clase de vehículos, y hacen posible controlar en el compartimento dador, variables como la humedad, la temperatura y otros factores ambientales. De este modo, mediante ensayos comparativos, se pueden determinar los efectos de las técnicas

oclusivas (Kubota y Yamada, 1990) entre otros. Además, la membrana puede tratarse, previamente o durante el ensayo, con promotores, disolventes u otras sustancias para determinar su efecto sobre la permeabilidad.

En los experimentos *in vitro*, generalmente se determinan las cantidades de soluto acumuladas en el compartimento receptor en función del tiempo. Al representarlo gráficamente, se pueden obtener perfiles de absorción como los mostrados en la figura, dependiendo de si la dosis administrada es finita (administración puntual) o infinita (continua):

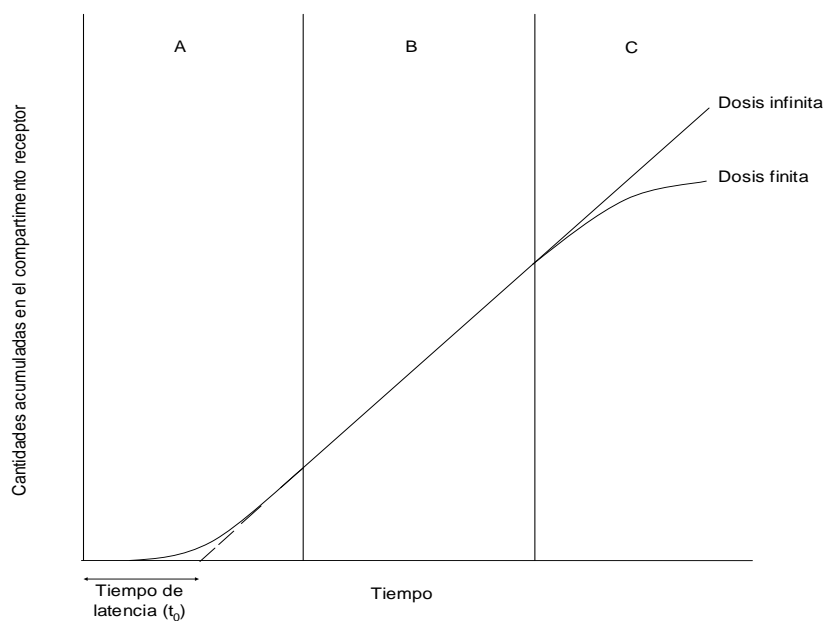


Figura 10. Perfil de las cantidades acumuladas en el compartimento receptor en función del tiempo, para las metodologías de la dosis finita e infinita.

La mayor información relativa a la absorción percutánea se obtiene a partir del estado estacionario (región B en la dosis finita y B y C en la dosis infinita), como por ejemplo el flujo de absorción transdérmica, el cual corresponde a la pendiente en el estado estacionario. A partir del primer tramo del perfil de absorción (el tramo A), puede obtenerse el tiempo de latencia “ t_0 ” que hace referencia al tiempo que tarda en alcanzarse el estado estacionario y se correspondería con el corte en el eje de abscisas consecuencia de la prolongación de la recta resultante en el estado estacionario. En la dosis finita, debido a que el perfil no es siempre lineal, pueden presentarse dificultades para obtener las medidas seguras en estado estacionario (Williams, 2003).

7.2.1. Metodología de la dosis infinita para la determinación del flujo transdérmico en el estado estacionario.

En este tipo de sistemas, en el compartimento dador de la célula de difusión se mantiene una concentración invariable de la sustancia penetrante (dosis infinita), y en el compartimento receptor se mantienen unas condiciones de sumidero durante todo el tiempo de ensayo. Se admite una disminución de concentración en la fase dadora, o un incremento de la misma en la fase receptora, no superior al 10%, ya que ello no supone una variación importante en las condiciones de flujo de orden cero (Barry, 1983). De este modo, tras un período de latencia, el gradiente de concentración a través de la membrana y, por tanto, la velocidad de penetración de la sustancia, se mantiene constante.

Diversos autores utilizan esta metodología aunque con diferencias de unos a otros, relacionados con la geometría de las células utilizadas, la disposición de las membranas utilizadas y el modo de agitación de las soluciones contenidas en ambos compartimentos (Barry y Brace, 1977).

7.2.2. Metodología de la dosis finita: simulación de las condiciones in vivo.

Esta metodología se utiliza con sistemas en los que la dosis de fármaco aplicada en el compartimento dador es finita, lo que produce la disminución progresiva del gradiente de concentraciones y de la absorción transdérmica.

Aunque en este tipo de ensayos las predicciones son más complicadas que en los ensayos de dosis infinita, son los que más se acercan a la realidad y los que nos ofrecerán una mayor similitud con la aplicación clínica. Tienen una elevada importancia para el estudio de absorción de formas farmacéuticas de aplicación tópica, ya que una vez se abandona el estado estacionario, permite predecir el comportamiento del fármaco con mayor precisión.

7.3. Aplicación de la teoría de difusión

La finalidad del empleo de métodos experimentales *in vitro* es llegar a conocer los factores que influyen en el paso o transporte de una molécula a través de la piel,

establecer las correlaciones entre los datos obtenidos por estos métodos y la absorción transdérmica observada *in vivo* (Franz, 1978) y desarrollar modelos predictivos de la absorción transdérmica. Las directrices de los estudios de absorción transdérmica han sido estandarizados según las guías 428 (*in vitro*) y 427 (*in vivo*) de la OECD.

Los métodos experimentales *in vitro* permiten profundizar en los diferentes aspectos y factores que influyen en la absorción percutánea de fármacos, ya que permiten fijar y controlar las condiciones en el experimento de modo que la elección de un determinado diseño experimental depende de la finalidad buscada en cada caso. Entre los aspectos que se pueden estudiar destacan: el esclarecimiento de los procesos limitantes de la absorción, el análisis de las propiedades intrínsecas de la membrana como barrera, la identificación de la vía de difusión predominante, la detección de los efectos producidos por los componentes del vehículo, el estudio de la capacidad de difusión del fármaco, la detección de la variabilidad existente entre membranas de distinto origen, la acción de compuestos promotores de la penetración cutánea, etc.

Desde un punto de vista termodinámico, un sistema que no está en equilibrio tiende a evolucionar hacia el equilibrio y asimismo, cuanto más lejos se encuentre del equilibrio más rápido evolucionará hacia él. En un sistema dividido en dos compartimentos por una membrana semipermeable, en el que uno de los compartimentos presenta una concentración más elevada, el sistema tenderá a igualar las concentraciones de ambos compartimentos mediante un proceso de **difusión** pasiva entre ambos. Esto es lo que ocurre cuando se aplica un sistema de liberación transdérmica sobre la piel, debido al gradiente de concentraciones entre la forma farmacéutica y el organismo, el sistema evolucionará hacia el equilibrio produciendo un flujo del fármaco a través de la piel.

Como base teórica para predecir el proceso de difusión transdérmica se utilizan las leyes de Fick. La **primera ley de Fick** establece que, la velocidad de difusión o flujo de una sustancia que difunde perpendicularmente a través de una membrana, es proporcional al gradiente de concentraciones (Crank, 1975). Lo que se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$J = \frac{\delta M}{A \cdot \delta t} = -D \frac{\delta C}{\delta x} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde “J” es el flujo ($\text{g cm}^2 \text{ h}^{-1}$), “M” la cantidad de soluto que difunde por área “A” en un tiempo determinado “t”. El coeficiente de difusión “D” ($\text{cm}^2 \text{ h}^{-1}$) cuyo signo negativo indica matemáticamente que ocurre en dirección opuesta al gradiente de concentraciones “C”, siendo “x” la distancia recorrida medida de forma perpendicular a la superficie de difusión. Además, el coeficiente de difusión “D” es un valor promedio calculado para toda la membrana es decir, no tiene en cuenta la estructura interna de la piel.

Para un sistema en el que exista una membrana que separe dos compartimentos (dador y receptor) con dos concentraciones “C_d” y “C_r”, respectivamente, en el estado estacionario de la difusión, se establece un gradiente de concentración constante en el interior de la membrana. Debido a un reparto preferente del soluto en la membrana, las concentraciones del mismo en las zonas límite de la membrana “C₁” y “C₂”, serán diferentes de las concentraciones en las zonas adyacentes a la misma (Figura 11). Analizando este reparto mediante la primera ley de Fick quedaría de la siguiente forma:

$$J = D \cdot \frac{(C_1 - C_2)}{H} \quad \text{Ecuación 2}$$

donde “H” es el espesor de la membrana que separa a ambos compartimentos.

Si se considera que se ha alcanzado el estado estacionario, donde la cantidad de soluto que atraviesa la membrana es constante, la difusión se desarrollará de acuerdo a un proceso de orden 0. Si se asume que el coeficiente de reparto “P” es el mismo entre el estrato córneo y el compartimento dador y entre la capa más profunda de la piel y el compartimento receptor, puesto que “C₁” y “C₂” se refieren a la concentración en el interior de la membrana, se cumpliría que:

$$P = \frac{C_1}{C_d} = \frac{C_2}{C_r} \quad \text{Ecuación 3}$$

Por tanto, $C_1 = P \cdot C_d$; y $C_2 = P \cdot C_r$; que sustituyéndolo en la ecuación 2 quedaría de la siguiente forma:

$$J = D \cdot P \cdot \frac{(C_d - C_r)}{H} \quad \text{Ecuación 4}$$

Puesto que en organismos vivos, la dermis presenta un sistema de irrigación capilar que hace que el fármaco difunda rápidamente a la circulación sistémica, la concentración en el compartimento receptor se puede considerar despreciable:

$$C_r \lll C_d;$$

$$J = D \cdot P \cdot \frac{C_d}{H} = \frac{D \cdot P \cdot C_d}{H} = K_p \cdot C_d \quad \text{Ecuación 5}$$

Siendo “ K_p ” la constante de permeabilidad (cm h^{-1}), la cual es independiente de la concentración en el compartimento dador (Flynn *et al.*, 1974).

En los estudios *in vitro* con células de Franz se acepta como concentración límite del soluto en el receptor el 10% de su solubilidad máxima, de esta forma el estado estacionario no sufre alteraciones (Barry, 1983).

Mientras que la primera ley de Fick considera el flujo de la sustancia proporcional al gradiente de concentración, la **segunda Ley de Fick** contempla las variaciones del flujo y del gradiente de concentración en función del tiempo. Esto permite la caracterización de la difusión durante todo el proceso, es decir, tanto dentro como fuera del estado estacionario. La ecuación quedaría así:

$$\frac{\delta C}{\delta t} = D \cdot \frac{\delta^2 C}{\delta x^2} \quad \text{Ecuación 6}$$

En la Figura 11 se encuentran representadas de forma ilustrativa la primera y la segunda ley de Fick:

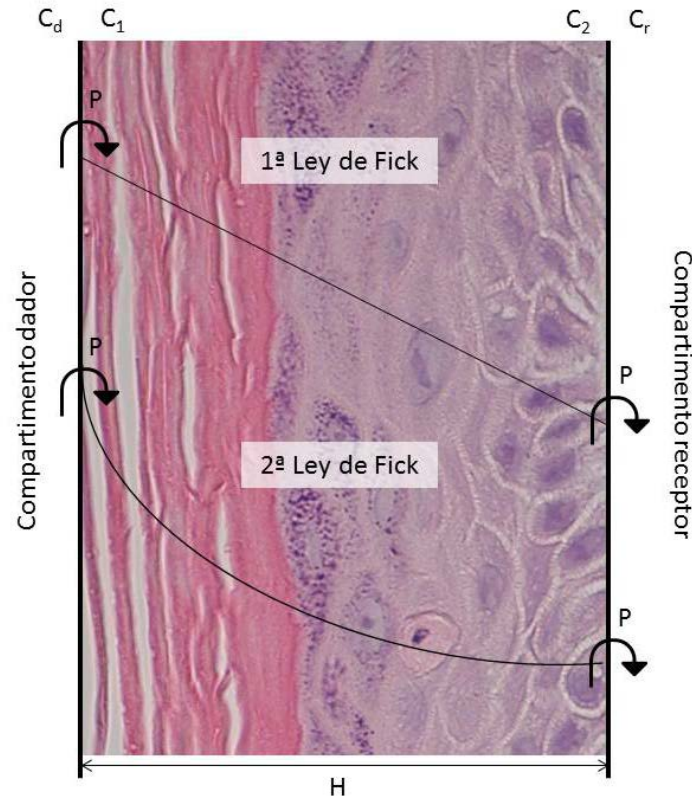


Figura 11. Ejemplo ilustrativo de la 1ª y 2ª ley de Fick.

A partir de la segunda ley de Fick se puede obtener, mediante su integración cuando $\delta^2 C / \delta x^2 = 0$, la ecuación de Scheuplein (Scheuplein, 1965):

$$Q = (PH)C_{veh} \left[\frac{D}{H^2}t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(\frac{-Dn^2\pi^2t}{H^2}\right) \right] \quad \text{Ecuación 7}$$

En la ecuación, “Q” es la cantidad de fármaco acumulada en el compartimento receptor por unidad de área durante un determinado tiempo “t”. La concentración de fármaco en el vehículo se representa como “C_{veh}”, que en nuestro caso corresponde a la concentración de fármaco en el compartimento dador. “P” es el coeficiente de reparto estrato córneo/vehículo, “D” es el coeficiente de difusión en la piel y “H” es la longitud del camino de difusión que ha de atravesar el fármaco (espesor de la piel).

Capítulo 4. Material y métodos

1. Fármacos de estudio

El **pizotifeno malato** (4-(9,10-dihidro-4H-benzo[4,5]ciclohepta[1,2-b]tien-4-ilideno)-1-metilpiperidina malato), con una pureza del 99.86% fue suministrado por GalChimia S.L. (O Pino, España). En su forma de sal tiene un peso molecular de 429.53 g/mol y está cargada positivamente. Según la “British Pharmacopoeia” es ligeramente soluble en agua y etanol y moderadamente soluble en metanol. Su estructura química se muestra a continuación en la Figura 12:

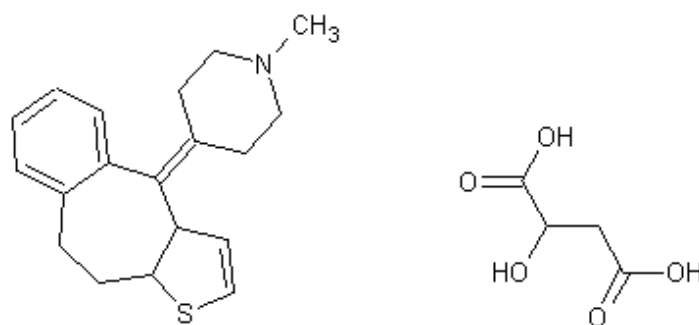


Figura 12. Estructura química del pizotifeno malato. (ACD/ChemSketch software v12.01)

La **paliperidona** (9-hidroxisperidona o 3-{2-[4-(6-fluoro-1,2-benzoxazol-3-il) piperidin-1-il]etil}-9-hidroxi-2-metil-4H,6H,7H,8H,9H-pirido[1,2-a]pirimidin-4-ona) con un 97% de pureza, fue suministrada por Watson International (China). Se considera una molécula de pequeño tamaño, tiene un peso molecular de 426.5 g/mol. Presenta un coeficiente de reparto en el sistema n-octanol/agua (log P) de 1.8 y es prácticamente insoluble en agua (Knox *et al.*, 2011). Su estructura química puede verse en la Figura 13:

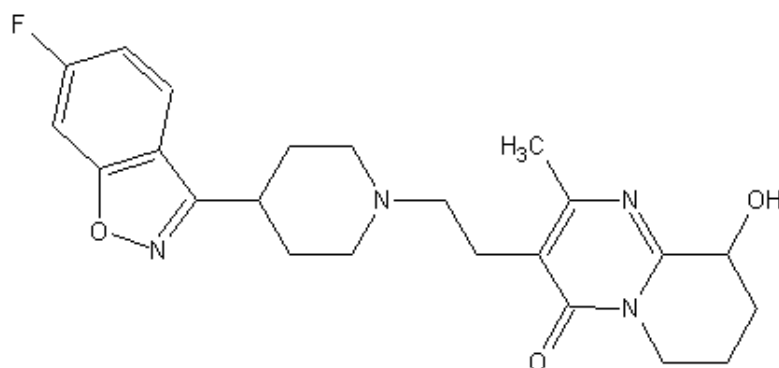


Figura 13. Estructura química de la paliperidona. (ACD/ChemSketch software v12.01)

2. Método analítico

2.1. Condiciones cromatográficas

Para el análisis de *pizotifeno*, se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), consistente en una bomba Waters 600, un controlador Waters 600, un inyector automático Waters 717 plus y un detector UV PDA Waters 996. El programa informático utilizado para la interpretación y el tratamiento de los datos fue el “Millenium Chromatography Software®”.

La separación se llevó a cabo a temperatura ambiente con una columna de fase reversa de 250 mm x 4.0 mm con un empaquetamiento formado por partículas de sílice C₁₈ de 5 µm de diámetro medio (Kromasil C₁₈). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 254 nm. El volumen de las alícuotas inyectadas fue de 50 µL.

Como fase móvil se utilizó solución acuosa de amonio dihidrógeno fosfato monobásico 0.05 M y acetonitrilo en una proporción de (50:50 v/v) a pH 4.6. El pH de la solución final se ajustó con ácido ortofosfórico 0.05 M. La fase móvil se filtró, una vez preparada, a través de filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) MF Monitor Refills® (Millipore Corporate, Billerica, MA, USA) con un tamaño de poro de 0.45 µm. Asimismo, se realizó una desgasificación de la fase móvil mediante agitación en vacío. Se utilizó un flujo constante de 1 mL/min.

El análisis de *paliperidona* se realizó en dos equipos HPLC y un UPLC previa validación de los métodos analíticos. El primer HPLC era un sistema Ultimate 3000 Autosampler y bomba, acoplado a un detector UV “AD25 Absorbance detector”. El segundo equipo HPLC estaba formado por una bomba “Dionex P680 HPLC” con inyector de muestras automático” y un detector UV “Dionex UVD 170U”. El sistema Waters Aquity UPLC utilizado estaba equipado con un detector UV, Sample Manager y Binary Solvent Manager. La fase móvil utilizada en ambos casos fue una mezcla de solución amortiguadora de pH de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) 0.05 M a pH 3.7 y acetonitrilo en una proporción de 24:76 a la cual se le añadió un 0.30% de trietilamina. El pH se ajustó con ácido fosfórico. Todas las soluciones fueron filtradas

con filtros GH Polypro (GHP) con un tamaño de poro de 0.2 μm y desgasificadas mediante ultrasonidos antes de su utilización. Asimismo la longitud de onda se fijó a 278 nm.

En los análisis realizados mediante HPLC se utilizó una columna LiChrospher 100 RP18 (5 μm , 125 x 4 mm) con precolumna. El flujo de fase móvil se mantuvo constante a 1.00 mL/min. El volumen de inyección de muestra se fijó en 75.0 μL .

Finalmente, en los análisis realizados mediante UPLC se utilizó una columna Acquity UPLC® BEH C18 (1.7 μm , 2.1 x 50 mm) con filtro precolumna acoplado. El flujo de la fase móvil se estableció a 0.3 mL/min y el volumen de inyección de muestra a 5.00 μL . Antes de analizar las muestras mediante UPLC, estas se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 minutos recuperando el 80 % del volumen de muestra inicial de sobrenadante.

2.2. Validación del método analítico

La determinación de la concentración de fármaco en cada una de las muestras analizadas parte del supuesto de que la relación entre las concentraciones de las muestras y la respuesta obtenida en los cromatogramas responde a un modelo lineal, de manera que para asegurar la calidad de los resultados, es necesario verificar la linealidad del modelo y validar el método analítico.

Las rectas de calibrado se obtienen mediante regresión por mínimos cuadrados de las áreas calculadas a partir de los cromatogramas como función de la concentración del fármaco en la muestra, según la siguiente ecuación:

$$y = m \cdot x + b \qquad \text{Ecuación 8}$$

donde, **y** es el área del cromatograma, **x** la concentración, **m** la pendiente de la recta y **b** la ordenada en el origen.

La linealidad de cada recta de calibrado, es decir, la dependencia lineal entre **x** e **y** viene expresada por el coeficiente de correlación, **r**. En todos los casos se investigó si existía una relación lineal entre las áreas de los cromatogramas y las concentraciones del fármaco patrón.

Para completar la validación del método se han de realizar ensayos que verifiquen la **reproducibilidad intradía** y la **reproducibilidad interdía**:

- La determinación de la *reproducibilidad intradía* se realiza mediante el análisis por triplicado, en un mismo día, de varias alícuotas de cada dilución, preparadas el mismo día del análisis.
- La *reproducibilidad interdía* se calcula a partir del análisis por triplicado de una alícuota de cada una de las diluciones, preparadas el mismo día del análisis, en cada uno de los días en los que se lleven a cabo dichos análisis.

Para determinar si un método analítico es reproducible tanto interdía como intradía, han de tenerse en cuenta varios parámetros:

- La **precisión** se expresa a través del coeficiente de variación (C.V.) de la media de las concentraciones estimadas, tanto en los ensayos intradía como en los realizados en días distintos (interdía).

$$C.V. \% = \frac{D.E.}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

donde "D.E." es la desviación estándar y " \bar{x} ", la concentración media estimada de cada una de las soluciones patrón.

El límite establecido en ensayos con muestras biológicas para la precisión es del 10% (Jenke, 1996a, b; Doliwa *et al.*, 2001a).

- La **exactitud** viene dada por el error relativo de la media (Er), de acuerdo con la siguiente expresión:

$$Er (\%) = \frac{\hat{x}_i - x_i}{x_i} \quad \text{Ecuación 10}$$

donde " \hat{x}_i " es la concentración estimada o medida, y " x_i " es la concentración teórica del fármaco en el patrón analizado. Para ensayos con muestras biológicas el " Er " máximo no debe superar el 10% (Jenke, 1996a, b; Doliwa *et al.*, 2001a).

- La **especificidad** del método analítico se determina mediante el análisis de 10 blancos. En los que no ha de observarse la señal cromatográfica asignada al

analito o interferencias de otros compuestos al mismo tiempo de retención del analito.

- El **límite de detección** y el **límite de cuantificación** se calcularon a partir de la desviación estándar residual de los datos de la regresión utilizando las siguientes ecuaciones (Miller JC, 1993; Lister, 2005):

$$LOD = 3.3 \cdot \frac{DE}{b} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{DE}{b} \quad \text{Ecuación 12}$$

donde “DE” es la desviación estándar y “b” es la pendiente de la ecuación de la regresión lineal.

- La **robustez** hace referencia a la capacidad del método analítico para permanecer inalterado tras realizar modificaciones deliberadas en las condiciones cromatográficas. Para determinarla se ha de valorar el área de una concentración patrón conocida alterando la longitud de onda, el pH y las proporciones de fase orgánica/fase acuosa de la fase móvil (Vander Heyden et al., 2001). En los experimentos realizados con pizotifeno se modificaron los siguientes parámetros según se indica a continuación: pH \pm 0.2; composición fase móvil (50 \pm 2:50 \pm 2); flujo de la fase móvil \pm 0.1 mL/min; y longitud de onda \pm 2 nm.

2.3. Preparación de la soluciones

Para la preparación de las soluciones de **pizotifeno** se utilizó como solución amortiguadora de pH, la misma a la que más tarde se recurriría como fase receptora, como se explica posteriormente. La solución amortiguadora es una solución de [NaCl (150 mM)-HEPES (20 mM)] ajustada a un pH de 4.6. Para la preparación de la misma se añadieron 8.76 g de cloruro sódico (Sigma-Aldrich CO.; St. Louis, USA), 4.76 g de HEPES (Sigma-Aldrich CO.; St. Louis, USA) y agua ultrapura en cantidad suficiente para 1 litro. El agua ultrapura utilizada para todas las soluciones se obtuvo del sistema de purificación Barnstead NANOpure system (Barnstead International, Boston, MA, USA).

Antes de la utilización de la solución receptora se comprobó el pH final de la solución ajustándose en caso necesario a pH 4.6 con NaOH 5N o con HCl 5N (también suministrados por Sigma-Aldrich CO.). Seguidamente, se filtró a vacío a través de filtros desechables de PTFE, de 0.45 μm de diámetro MF Monitor Refills® (Millipore Corporate, Billerica, MA, USA).

A partir de la solución patrón de pizotifeno (2.4 mg/mL) se prepararon ocho soluciones de concentración conocida mediante diluciones de la misma en fase receptora (0.24, 0.6, 1.2, 2.4, 3, 6, 12 y 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las soluciones patrón obtenidas se utilizaron para hacer la recta de calibrado necesaria para validar el método de cuantificación del pizotifeno.

La solución madre utilizada para la valoración de **paliperidona**, debido a su baja solubilidad, se preparó en metanol (2 mg/mL). Las soluciones patrón, se prepararon mediante diluciones de la solución madre con una solución amortiguadora de pH de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) 0.05 M a pH 2.2 hasta obtener las siguientes concentraciones: 1.00, 5.00, 10.0, 50.0 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3. Caracterización físico-química

Debido a que no se disponen de estudios experimentales de las propiedades fisicoquímicas de pizotifeno, como son el pK_a y el log P, fue necesaria la realización de los ensayos correspondientes para su determinación. Asimismo, se realizó la determinación de la solubilidad de ambos fármacos.

3.1. Determinación de pK_a de pizotifeno

Para la determinación del pK_a se utilizó como punto de partida la propuesta de la nueva guía 122 de la OECD titulada "Partition Coefficient (n-Octanol/Water), pH-Metric Method for Ionisable Substances". En primer lugar se preparó una solución saturada de pizotifeno malato en agua ultrapura ($n=3$) y se descendió el pH mediante la adición de HCl. De forma continua se fue añadiendo solución NaOH 1 N y midiendo el pH tras cada adición para obtener la curva de titulación. Los ensayos realizados se llevaron a cabo a una temperatura de 25 ± 2 °C. El pK_a se determinó matemáticamente partir de los resultados obtenidos por medio del método de la primera derivada. Este método

consiste en realizar la derivada del pH en función del volumen de base añadida y representar los valores obtenidos frente al volumen de base añadida.

3.2. Determinación de log D de pizotifeno

El coeficiente de distribución (log D) es una constante que se define como el cociente del fármaco (ionizado o no) disuelto en n-octanol y en fase acuosa, dos disolventes inmiscibles entre sí. El coeficiente de distribución es dependiente de pH y por tanto para determinarlo, se deben utilizar soluciones tamponadas que mantengan el pH constante a pesar de la adición del fármaco. El coeficiente de partición (log P), se utiliza en moléculas no ionizables y por tanto, no dependientes del pH de la solución.

Aunque existen aproximaciones o predicciones de este parámetro realizadas por programas informáticos especializados, estas pueden no ajustarse a la realidad, pues no dejan de ser predicciones. Para la determinación experimental del log D se tomó como referencia la guía 107 de la OECD titulada "Partition Coefficient (n-Octanol/Water): Shake Flask Method" (OECD) y el artículo de Medic-Saric et al. (Medić-Šarić, 2004).

En primer lugar, se preparó una solución patrón de pizotifeno malato (2.4 mg/mL) en solución amortiguadora de pH HEPES (20 mM) a pH 7.4 (n=3), a partir de la cual se prepararon diluciones de concentración: 240, 120, 24, 12, 2.4 y 1.2 µg/mL.

Independientemente, se mantuvieron en agitación constante durante 24 horas, 3 mezclas de n-octanol y solución amortiguadora de pH HEPES (20mM) a pH 7.4 de acuerdo a las siguientes proporciones: 50/50, 33/66 y 66/33 (octanol/agua). Por último, se adicionaron 0.5 mL de las diluciones de pizotifeno en 1.5 mL de cada una de las mezclas de octanol y agua, se agitaron mecánicamente durante 20 minutos y se almacenaron a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 3600 rpm durante 20 minutos para permitir la separación de fases. A continuación se analizó la concentración de pizotifeno malato en la fase acuosa mediante el método analítico descrito previamente.

El coeficiente de distribución "D" se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$D = \frac{y-x}{x} \cdot \frac{V_{aq}}{V_{oc}} \quad \text{Ecuación 13}$$

donde “D” es el coeficiente de distribución a un pH determinado; “y” es la cantidad inicial de pizotifeno en la fase acuosa empleada; “x” es la cantidad de pizotifeno valorada en la fase acuosa tras el ensayo (ionizado o no); “V_{aq}” es el volumen de fase acuosa al final del ensayo; y “V_{oc}” es el volumen de n-octanol.

Seguidamente se obtuvo el log D para todas las concentraciones de pizotifeno y se compararon en función de las diferentes proporciones de octanol y solución amortiguadora de pH utilizadas.

3.3. Determinación de solubilidad de pizotifeno

Para llevar a cabo la determinación de la solubilidad de pizotifeno malato en solución amortiguadora de pH [NaCl (150 mM)-HEPES (20 mM), pH 4.6], se añadió pizotifeno malato en exceso bajo temperatura controlada (37 ± 2 °C) y se mantuvo bajo agitación durante al menos 12 horas para asegurar la saturación de la solución. Seguidamente se tomaron 3 alícuotas y se filtraron utilizando filtros de jeringa de PTFE con 0.45 µm de poro de Minisart® (Sartorius Stedim Biotech, New York, USA). Por último, las soluciones obtenidas se diluyeron en la misma solución amortiguadora de pH y se cuantificaron mediante el método analítico descrito previamente.

3.4. Determinación de solubilidad de paliperidona

Debido a la baja solubilidad en agua de la paliperidona y ya que la absorción transdérmica de fármacos está directamente relacionada con el gradiente de concentraciones, es importante determinar bajo qué condiciones se puede ver mejorada su solubilidad. En este estudio los co-solventes estudiados fueron:

- Cremophor EL®, aceite de ricino polietoxilado (obtenido de BASF), se trata de un surfactante no iónico;
- Labrasol®, Caprilcaproil macrogol-8 glicéridos (obtenido de Gattefossé), es un surfactante no iónico;

- Transcutol P[®], dietilen-glicol-monoetil-éter (obtenido de Gattefossé), disolvente y solubilizante;
- Tween 20[®], polisorbato 20 (obtenido de AppliChem); es un surfactante no iónico;
- Tween 80[®], polisorbato 80 (obtenido de Sigma-Aldrich) es un surfactante no iónico;
- Propilenglicol, propano-1,2-diol (obtenido de Sigma-Aldrich), es humectante, solubilizante;
- (2-hidroxi)propil- β -ciclodextrina, HP β CD (obtenido de CycloLab R&B Ltd.), forma complejos de inclusión gracias a su exterior hidrófilo y su interior hidrofóbico.

Se prepararon soluciones con cada co-solvente al 1 y al 5 % (v/v) en solución salina amortiguadora de fosfatos, excepto de propilenglicol, que se empleó al 20 % (v/v). La mayor parte de las soluciones ensayadas se realizaron utilizando solución salina amortiguadora de fosfatos ajustada a pH 7.4, el resto se realizó con la misma solución a pH 5.0 ajustando el pH en la solución antes de incorporar el cosolvente. A las mezclas se añadió la paliperidona en exceso y se mantuvieron bajo agitación a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 24 horas. Transcurrido este tiempo todas las soluciones se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 minutos entonces, una alícuota del sobrenadante se diluyó en solución salina amortiguadora de fosfatos para ajustar la concentración de la muestra al rango de concentraciones validado en el método analítico. Se realizaron al menos 3 replicados de cada solución.

4. Estudio de estabilidad de pizotifeno en disolución

La estabilidad en disolución puede definirse como la capacidad del fármaco para permanecer inalterado y mantener tanto su concentración como su estructura química durante un periodo de almacenamiento. En consecuencia el objetivo del estudio de la estabilidad es valorar cómo las características del fármaco varían con el tiempo bajo la influencia de factores ambientales tales como: temperatura, humedad y luz; y establecer las condiciones de almacenamiento apropiadas y el periodo de caducidad.

En el estudio de estabilidad se realizaron repetidas mediciones de la concentración de las muestras, las cuales fueron almacenadas bajo diferentes condiciones ambientales: 37, 25, 4, -20 y -80 °C y exposición o no a la luz, según se detalla más adelante. Las condiciones ensayadas se adaptaron a las posibles condiciones de almacenamiento del fármaco y la formulación.

En primer lugar, para conocer si el fármaco se mantenía estable durante todo el experimento de absorción transdérmica, que se realiza a 37 °C, se llevó a cabo un estudio de estabilidad a corto plazo (32 horas) en estas condiciones. Para la realización de este estudio, se utilizaron las células de Franz con una lámina de parafilm® a modo de membrana impermeable, para evitar el paso de la solución del compartimento dador al receptor. Una vez llenado el compartimento dador con solución madre (2.4 mg/mL) se cubrió con parafilm® para reducir en la medida de lo posible las pérdidas por evaporación, al igual que se realiza en los experimentos de difusión. Todos los ensayos se realizaron en un baño a una temperatura constante de 37 ± 2 °C. Las muestras se tomaron de hora en hora durante las 8 primeras horas y a las 24, 25, 26, 28, 30 y 32 horas.

Para determinar la estabilidad del pizotifeno a largo plazo se utilizó la solución madre de pizotifeno a 2.4 mg/mL. Esta solución se repartió en eppendorfs® y se almacenó bajo diferentes condiciones: a temperatura ambiente con luz, a temperatura ambiente en oscuridad, a -20, -80, 4 y 37 °C en estufa. Se realizaron mediciones de la concentración los días: 0, 1, 2, 6, 13 y 316.

5. Ensayos de absorción transdérmica

5.1. Preparación de la piel

Para investigar la absorción transdérmica de los fármacos se utilizó como modelo la piel de oreja de cerdo por su facilidad de obtención respecto a la piel humana y porque presenta características similares a ésta (van de Sandt y Rutten, 1995; Marro *et al.*, 2001).

La piel empleada en los experimentos de absorción transdérmica de **pizotifeno**, fue generosamente suministrada por la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Para mantener la homogeneidad de las condiciones del ensayo, se seleccionaron cerdos blancos sin ningún tipo de manchas. Se utilizó la cara exterior de la oreja del animal por ser una zona con poco vello.

Tras el sacrificio del animal se cortaron las orejas por su base. Seguidamente se separó la piel de la cara exterior de la oreja del cartílago mediante un bisturí quirúrgico ayudado de unas pinzas quirúrgicas, teniendo especial cuidado en mantener la integridad de la piel.

A continuación, con ayuda de un dermatomo eléctrico modelo Aesculap-Wagner C. GA 176 suministrado por B. Braun Surgical S.A. (Barcelona), se procedió a cortar la piel obtenida a 600 μm de grosor. Para ello se fijó la piel sobre una placa de poliestireno. A continuación, se seleccionó el espesor de corte en el dispositivo (600 μm) y finalmente, se procedió al corte de la piel mediante deslizamiento horizontal paralelo a la superficie de la piel. El resultado de este proceso son porciones de piel de espesor constante. Estas porciones se envasaron inmediatamente en sobres de papel de aluminio y fueron almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Para los experimentos con **paliperidona**, la piel fue generosamente suministrada por el matadero CARRE (Rolle, Suiza) y se procesó el mismo día de su llegada al laboratorio. Las orejas se lavaron con agua corriente fría para eliminar la suciedad y seguidamente la piel se cortó a 750 μm de grosor mediante un dermatomo de aire "ZIMMER Dermatome 3 in. (7.6 cm) Width Plate". Las porciones de piel se afeitaron con una máquina de afeitar eléctrica y se recortaron con un sacabocados en forma circular de acuerdo al tamaño de las células de Franz. Por último, la piel procesada se empaquetó en papel de aluminio y se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

5.2. Células de difusión

Los experimentos de absorción transdérmica con **pizotifeno** se realizaron a temperatura controlada ($37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para ello, se utilizaron células de difusión (DISA, Milán, Italia) que son una variante del modelo de célula de Franz. El área útil de

difusión de cada una de las células es de 0.6 cm^2 y su compartimento receptor tiene una capacidad de 4.2 mL.

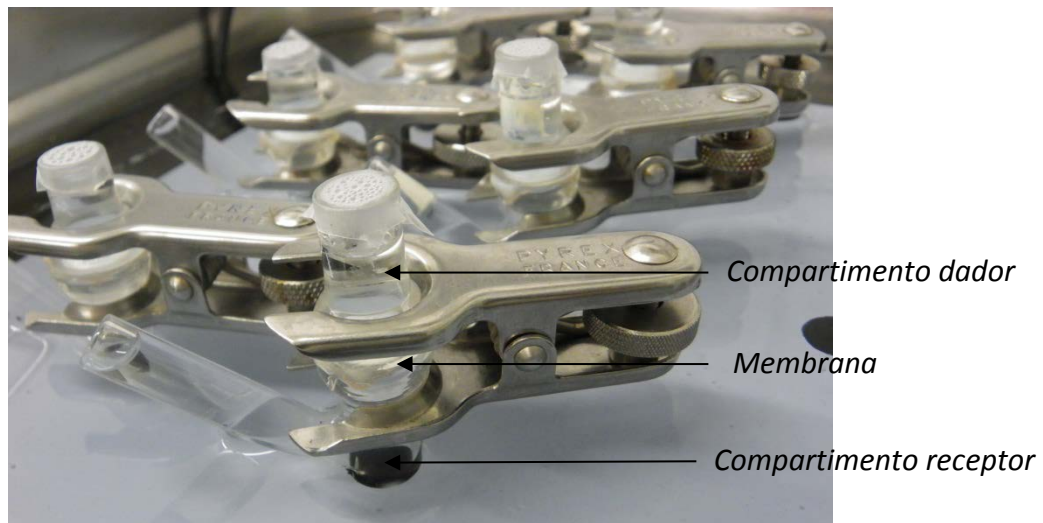


Figura 14. Célula de Franz modificada.

Los experimentos realizados con *paliperidona* se llevaron a cabo con células de Franz similares a las anteriores pero de mayor tamaño, cuya área de difusión es de 3 cm^2 y el volumen del compartimento receptor de 10 mL.

El material con el que han sido elaboradas, vidrio neutro, garantiza la no cesión de partículas y evita la adsorción de solutos, ya que éstos podrían falsear los resultados obtenidos en la posterior valoración.

Ambos compartimentos, dador y receptor, son cilíndricos pero el receptor posee además una tubuladura en el lado que permite la toma de muestras y la reposición del volumen muestreado con fase receptora. Tras el muestreo y reposición, el compartimento receptor ha de permanecer cerrado con Parafilm® para evitar las posibles pérdidas por evaporación. El compartimento dador, al igual que el receptor, también es sellado con Parafilm® o con tapones herméticos para evitar pérdidas por evaporación. Ambos compartimentos poseen un reborde esmerilado en la zona en contacto con la membrana, que garantiza la estanqueidad de los mismos. La piel se fija sobre el compartimento receptor con el estrato córneo hacia arriba, donde se coloca el

compartimento dador. Los dos compartimentos se fijan con una pinza de acero de dimensiones adecuadas.

Como se observa en la Figura 15, las células se sitúan en un baño termostático, sobre un multiagitador magnético a fin de mantener el sistema a temperatura constante y en agitación continua, gracias al imán agitador que se coloca en el compartimento receptor. Con esto se logra la perfecta homogeneización de la fase receptora y se evita la formación de capas estáticas de difusión en las proximidades de la membrana.



Figura 15. Células de Franz sobre un multiagitador durante un ensayo de difusión transdérmica.

5.3. Promotores de absorción

5.3.1. Promotores químicos

En los ensayos con promotores realizados con **pizotifeno** se utilizaron diversos promotores químicos intentando abarcar diferentes grupos químicos.

El promotor **Azone**[®] (1-dodecilazacicloheptan-2-ona o laurocapram) fue suministrado por Netqem (USA); del grupo de los terpenos con estructura hidrocarbonada se emplearon el **cineol** (1,8-cineol o eucaliptol) y el **limoneno** (R-(+)-Limoneno). El primero, de la marca Fluka con una pureza $\geq 98.0\%$ fue suministrado por Sigma Aldrich, el segundo también de Fluka y con una pureza $\geq 96.0\%$ fue suministrado por Análisis Vínicos S.L.

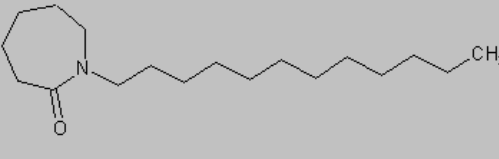
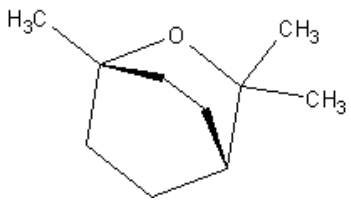
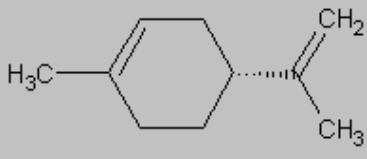
Nombre común	Nombre IUPAC	log P	Estructura
Azone®	1-dodecilazacicloheptan-2-ona	6.2*	
Eucaliptol	4,7,7-trimetil-8-oxabicyclo[2.2.2]octano	2.5	
Limoneno	(4R)-1-metil-4-prop-1-en-2-ilciclohexeno	3.3	

Tabla 2. Nombre común, nombre IUPAC, logaritmo del cociente de reparto octanol/agua ($\log P$) y representación molecular de los promotores utilizados en este estudio. Estructuras obtenidas mediante el software ACD/ChemSketch v12.01. *(ACD Labs software, versión 5.09) (Bolton E, 2008).

Entre los ácidos grasos utilizados como promotores en el estudio se encuentran: el **ácido oleico** de la marca Fluka, suministrado por Análisis Vínicos S.L.; el **ácido decenoico** (ácido 9-decenoico) con una pureza $\geq 90.0\%$ y el **ácido dodecanoico** (ácido láurico) $\geq 98.0\%$ ambos de la marca SAFC, suministrados por Sigma Aldrich; el **ácido decanoico** (ácido cáprico) $\geq 98.0\%$ y el **ácido linoleico** $\geq 99.0\%$ ambos de marca Sigma y suministrados por Sigma Aldrich.

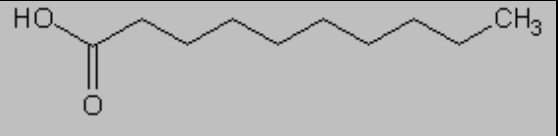
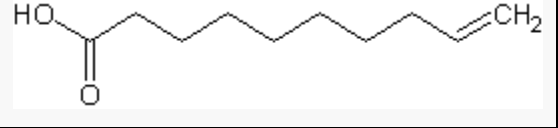
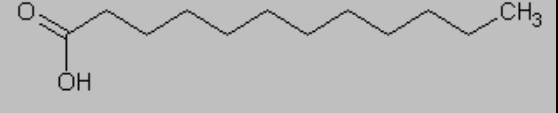
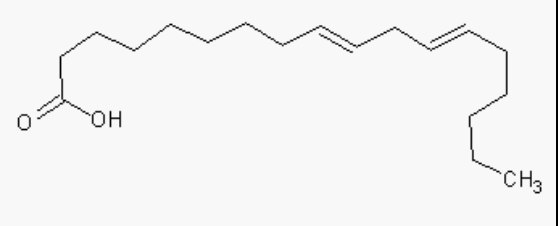
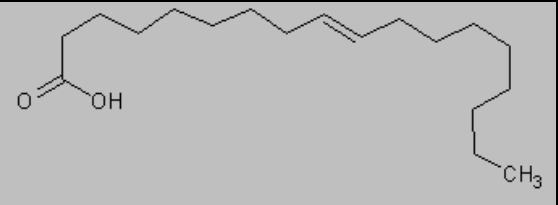
Nombre común	Nombre IUPAC	C:I	log P	Estructura
Ácido cáprico	Ácido decanoico	10:0	4.1	
Ácido decenoico	Ácido dec-9-enoico	10:1	3.3	
Ácido láurico	Ácido dodecanoico	12:0	4.2	
Ácido linoleico	Ácido (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoico	18:2	6.8	
Ácido oleico	Ácido (9Z)-Octadec-9-enoico	18:1	6.5	

Tabla 3. Nombre común, nombre IUPAC, número de carbonos e insaturaciones (C:I), logaritmo del cociente de reparto octanol/agua (log P) y representación molecular de los ácidos grasos utilizados como promotores en este estudio (Bolton E, 2008). Estructuras obtenidas mediante el software ACD/ChemSketch v12.01.

Las soluciones de los promotores (Azone®, 1,8-cineol, R-(+)-limoneno, ácido oleico, ácido decenoico, ácido dodecanoico, ácido decanoico, ácido linoleico) se prepararon a una concentración del 5% en etanol. Para lo cual se disolvieron 50 µL de promotor en 950 µL de etanol.

5.3.2. Iontoforesis

Los experimentos de iontoforesis se llevaron a cabo con electrodos Ag/AgCl debido a que no producen hidrólisis en solución acuosa y como consecuencia evitan las variaciones de pH del medio.

Para la fabricación de los electrodos se utilizó hilo de plata (99%) de 1.0 mm de diámetro de la marca Sigma Aldrich, obtenidos de Sigma-Aldrich S.A. (Tres Cantos, España). En primer lugar, el hilo de plata se cortó en fragmentos de 5 cm de largo y se moldeó uno de los extremos dándole forma de “palo de golf”.

En un recipiente de porcelana sobre un mechero bunsen, se calentó cantidad suficiente de AgCl hasta que quedó completamente líquida. El AgCl (99%) de marca Sigma Aldrich, fue obtenido de Sigma-Aldrich S.A. (Tres Cantos, España). Seguidamente se sumergió cada electrodo, por el extremo doblado, en la solución de AgCl, este paso se repitió hasta conseguir que lo recubriese y formase una bola del tamaño adecuado.

Los diferentes pasos del proceso de fabricación de los electrodos utilizados en los experimentos de iontoforesis pueden observarse en la Figura 16.



Figura 16. Proceso de fabricación de los electrodos AgCl.

Una vez alcanzado el tamaño deseado, se dejaron reposar varias horas hasta que se enfriaron completamente y se cubrió el hilo de plata descubierto con una funda termo-retráctil.

Previamente a su utilización en los experimentos de absorción transdérmica, la mitad de los electrodos “AgCl” obtenidos se han de “platear” para obtener los electrodos “Ag”. Como se puede observar en la Figura 17, en diferentes vasos se sumergieron los electrodos seleccionados en una solución de NaCl saturada, conectándolos al polo negativo. En cada vaso, para cerrar el circuito en serie, se introdujo un hilo de platino conectado al polo positivo. El hilo de platino se obtuvo de Sigma-Aldrich S.A. (Tres Cantos, España). Una vez cerrado el circuito, se mantuvo el

sistema en agitación constante, bajo una intensidad de corriente de 50 mA durante al menos 12 horas. Tras esta operación los electrodos quedaron listos para su utilización en los experimentos de iontoforesis.



Figura 17. Plateado de los electrodos.

Otra parte importante en los estudios con iontoforesis son los puentes salinos, estos forman parte del circuito y ayudan al estudio de la iontoforesis, ya que al utilizarlos se evita la competencia iónica entre el fármaco y el NaCl de la solución. Para su fabricación se preparó una solución con NaCl 0.1 M en 100 mL de agua en la que se dispersó agarosa 3%. Esta solución se calentó y agitó hasta que se formó un gel homogéneo, entonces se inyectó esta solución en tubos huecos flexibles de silicona de la longitud deseada, obtenidos de Levantina de Laboratorios, S.L. (Valencia, España). Los puentes se dejaron reposar hasta que el gel solidificó. Para evitar la deshidratación de los puentes salinos, se almacenaron sumergidos en solución salina acuosa hasta su utilización.

Como se puede observar en la Figura 18, la piel se situó en las células de Franz y el compartimento receptor se llenó con solución isotónica de [NaCl (150 mM)-HEPES (20 mM) a pH 4.6]. Para realizar el experimento de iontoforesis anodal, se introdujo el electrodo AgCl en el compartimento receptor de la célula de Franz y se conectó al polo negativo, el cátodo; en el compartimento dador se emplazó un extremo del puente salino y el otro extremo se colocó en un vaso con solución salina acuosa, cuya cantidad mínima de NaCl se puede calcular mediante la ecuación:

$$n_{NaCl} = \frac{I(A) \cdot t(s)}{96500} \quad \text{Ecuación 14}$$

donde “ n_{NaCl} ” son los moles de NaCl, “ I ” es la intensidad en amperios y “ t ” el tiempo en segundos.

En el mismo vaso se introdujo además el electrodo Ag y se conectó al polo positivo, el ánodo. Las células se enlazaron formando un circuito en serie de forma que el electrodo Ag de una célula se conecta con el electrodo AgCl de la siguiente, quedando los extremos del circuito conectados al generador de corriente Kepco, BHK, 0-2000 V. En el compartimento dador se dispuso la solución con el fármaco y a continuación se conectó el generador de corriente.

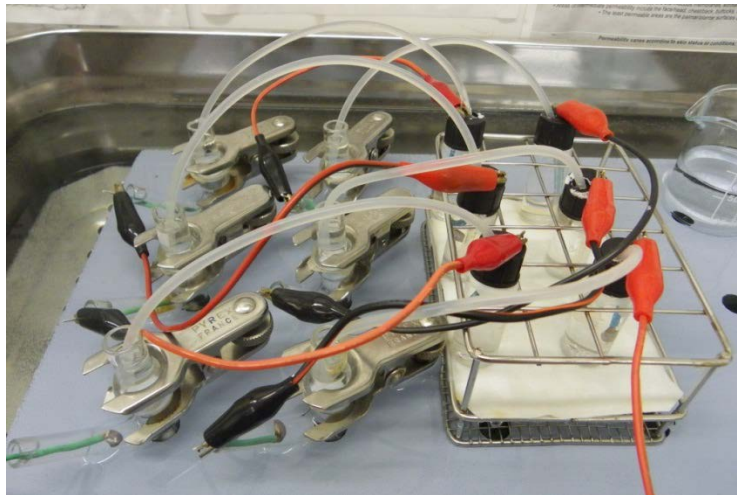


Figura 18. Ensayo de absorción transdérmica de iontoforesis con puentes salinos.

Para determinar si durante la absorción por iontoforesis del pizotifeno se produce alguna alteración en la dirección del flujo de disolvente, se calcula el factor de inhibición (IF) del flujo de ACM debido a la presencia de pizotifeno en la disolución. El acetaminofén (ACM) es una molécula con carga neta nula a $pH < 9.38$, y que por tanto solo sufre transporte atribuido a electroosmosis.

El cálculo del factor de inhibición se realizó por medio de la siguiente ecuación:

$$IF = Q_{ACM} / Q_{ACM,F} \quad \text{Ecuación 15}$$

donde “ Q_{ACM} ” es la cantidad de ACM acumulada en el compartimento receptor en ausencia de fármaco, y “ $Q_{ACM,F}$ ” sería la cantidad de ACM acumulada en presencia del fármaco, en este caso pizotifeno.

5.3.3. Microporación láser

El equipo utilizado para el tratamiento de microporación de la piel mediante láser fue P.L.E.A.S.E.[®] (Painless Laser Epidermal System), suministrado por Pantec Biosolutions AG. El equipamiento consta de cuatro componentes principales: el controlador, en el cual se puede observar la configuración del aparato y configurar algunos parámetros además de comenzar el tratamiento láser; el sistema de refrigeración, que mantiene el resto del equipo a una temperatura adecuada; el sistema láser, el cual consta de una sujeción para mantener la piel inmóvil durante el tratamiento y el emisor láser; por último el equipo está conectado a un ordenador de mesa con software específico para el ajuste de la configuración del equipo para el experimento (número de poros y pulsos, plantilla, etc.).

Con la configuración utilizada en los experimentos llevados a cabo, la fluencia dada por el láser en cada pulso fue de 4.53 J/cm².

5.4. Formulaciones

5.4.1. Sistemas terapéuticos de absorción transdérmica de pizotifeno

Tras la realización de los ensayos con soluciones, se desarrolló una formulación de pizotifeno compatible con las estrategias promotoras que demostraron ser más efectivas. Debido a la baja solubilidad que presenta el pizotifeno malato, un gran número de formulaciones fueron descartadas por no ser compatibles con los disolventes que proporcionaban mayor concentración del fármaco, por problemas de cristalización, baja bioadhesión y/o baja cohesión, entre otros problemas. De entre todas las combinaciones de polímeros y excipientes ensayados la polivinilpirrolidona (PVP) fue el que presentó las características físicas más favorables para su desarrollo. Así pues las formulaciones que se evaluaron fueron las siguientes:

	STAT Control	STAT Ácido oleico	STAT Ácido decenoico
PVP K90	17.0	17.0	17.0
Plastoid E35H	10.0	10.0	10.0
Propilenglicol	51.7	51.7	51.7
Etanol	20.0	15.0	15.0
Ácido oleico	-	5.00	-
Ácido decenoico	-	-	5.00
Pizotifeno malato	1.34	1.34	1.34

Tabla 4. Composición de los STAT de pizotifen (% p/p).

El PVP K90 fue obtenido de Sigma-Aldrich Química S.A. (Tres Cantos, España). Los compuestos necesarios para la fabricación del Plastoid E35H fueron: Eudragit E100® que fue suministrado por Evonik Industries-Degussa (Darmstadt, Alemania) y ácido láurico, ácido adípico y glicerol que fueron obtenidos de Laboratorios Guinama S.L. (Alboraya, Valencia).

El Plastoid E35H usado en las formulaciones se preparó conforme al protocolo Degussa. Para ello se calentó agua ultrapura en un intervalo de temperaturas de 78 – 82 °C y se adicionó Eudragit E100®, ácido láurico y ácido adípico y se mantuvo en agitación constante hasta que se obtuvo una dispersión. Seguidamente se añadió el glicerol y se homogeneizó la dispersión (Balaguer-Fernandez *et al.*, 2010). Una vez preparado el adhesivo, se almacenó en recipientes herméticamente cerrados a temperatura ambiente.

Para la formulación del STAT se adicionó en primer lugar el pizotifeno, el etanol y el propilenglicol, manteniéndose en agitación hasta que el fármaco quedó completamente disuelto. A continuación se añadió cuidadosamente el PVP para evitar en lo posible la formación de burbujas y se agitó suavemente durante 12 horas. Seguidamente se añadieron el resto de componentes y se agitaron hasta que la dispersión quedó homogénea. El gel obtenido se vertió en el laminador y se dejó

reposar unos minutos para que desapareciesen las burbujas que se hubiesen podido formar en el proceso.

Finalmente se laminó con un grosor de 600 μm sobre una lámina de soporte oclusiva (Scotchpack™ 9733 backing layer) y se dejó secar a temperatura ambiente en oscuridad hasta que su peso se mantuvo constante.



Figura 19. Vertido y laminación del gel de pizotifeno sobre la lámina de soporte.

5.4.2. Caracterización física de los STAT

Con los STAT formulados se realizaron ensayos de homogeneidad, estabilidad, desecación y humectación, bio-adhesividad *in vivo*, tracción y resistencia a la rotura. Asimismo también se realizó un estudio de la morfología externa mediante microscopía de luz polarizada.

El **ensayo de homogeneidad** se llevó a cabo con el fin de verificar que el fármaco se encontraba distribuido de forma uniforme en la formulación. Para ello se tomaron 3 muestras de 1 cm^2 de 3 zonas de cada STAT una vez laminado y seco. Estas se pusieron con 1 mL de solución amortiguadora de pH en agitación constante durante 12 horas. Transcurrido el tiempo se filtró la solución con un filtro de jeringa PTFE Minisart® (Sartorius AG, Hannover, Alemania) con un diámetro de poro de 0.45 μm . Las muestras se analizaron mediante el método cromatográfico previamente validado. El STAT se consideró homogéneo cuando las concentraciones de las muestras no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p > 0.05$).

Los **estudios de estabilidad** de la formulación se llevaron a cabo almacenando los STAT en condiciones controladas de oscuridad y temperatura ambiente (25 ± 2 °C)

durante 1 mes. Transcurrido ese tiempo se tomaron muestras aleatorias del STAT (n=4) y se procedió a la determinación del pizotifeno como en los ensayos de homogeneidad. Se consideró que la formulación era estable si la concentración de principio activo no bajaba del 90% de la concentración inicial.

Los **ensayos de desecación o grado de humedad final** se realizaron poniendo muestras de 1 cm² en una estufa a 37 ± 1 °C (n=5). Las muestras se pesaron diariamente hasta que el peso se mantuvo constante, entonces se retiraron de la estufa durante dos días para determinar la capacidad de recuperación de la formulación. La desecación se expresa como porcentaje de la pérdida de peso respecto al peso inicial.

Los **estudios de humectación** se efectuaron con muestras de 1 cm² de los STAT (n=5). Las cuales se situaron dentro de una campana en cuya base se vertieron 100 mL de solución acuosa saturada de NaCl para mantener una humedad relativa del 75%. Las muestras se pesaron diariamente hasta que el peso permaneció constante, momento en el que se sacaron de la campana. Las muestras siguieron pesándose hasta que el peso permaneció constante para determinar la adaptación a la humedad ambiente de la formulación.

Las **propiedades mecánicas (resistencia y elongación)** se evaluaron con la ayuda de un dinamómetro electrónico de Instruments J. Bot, S.A. (Barcelona, España) equipado con una célula de carga de 5 Kg. Antes de realizar los ensayos se fijó un periodo de acondicionamiento de las formulaciones después de su fabricación, de forma que se mantuvieron durante una semana a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Seguidamente se recortaron los STAT en porciones de 7 x 1 cm² y se fijaron en el dinamómetro dejando un área efectiva de 3 cm² para realizar los ensayos de tracción. La velocidad de la pinza superior se fijó a 300 mm/min. A partir de los resultados obtenidos se calcularon los parámetros descriptivos “Fuerza de tracción” y “Elongación hasta rotura” con la ayuda de las siguientes ecuaciones (Peh *et al.*, 2000):

$$\text{Fuerza de tracción} \left(\frac{N}{mm^2} \right) = \frac{\text{Fuerza de rotura (N)}}{\text{Área sección de la muestra (mm}^2\text{)}} \quad \text{Ecuación 16}$$

$$\text{Elongación hasta rotura (\%)} = \frac{\text{Long. en punto de rotura (mm)}}{\text{Longitud original (mm)}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 17}$$

Los **ensayos de bioadhesión** se realizaron aplicando el STAT sobre el dorso de la mano con muestras de 1 x 7 cm (n=4). Cada muestra se pegó por los extremos a dos trozos de 10 cm cinta adhesiva, que a su vez se unieron entre sí formando un triángulo, en cuya base quedaba el STAT con la matriz orientada hacia abajo. Antes de aplicar el STAT sobre el dorso de la mano se humedeció la zona de aplicación con 200 µL de agua destilada y una vez fijado el STAT se esperaron al menos 30 minutos antes de proceder a medir la bioadhesión. Transcurrido ese tiempo el vértice superior del triángulo se sujetó con la pinza superior de forma que en la base se situase el STAT y con la palma de la mano apoyada en la pinza inferior. El movimiento tractor se realizó en sentido vertical ascendente a una velocidad de 300 mm/min. La bioadhesión se define como la energía necesaria para despegar el STAT de la piel, que corresponde al área bajo la curva cuando se representan gráficamente la fuerza y la distancia.

El análisis de la **morfología externa** de los STAT de pizotifeno se llevó a cabo tras el secado de los STAT utilizando un microscopio óptico con videocámara a color (Labophot II Nikon, Tokyo, Japan) aumentando la imagen a 20x. Mediante esta prueba se puede determinar la presencia o ausencia de cristales en la formulación, lo que indicaría una cristalización o precipitación del principio activo.

5.4.3. Gel de paliperidona

Con la intención de probar que la paliperidona puede administrarse vía tópica, se desarrolló una formulación preliminar básica y sencilla de forma que mantuviese un alto grado de semejanza con las soluciones de paliperidona utilizadas en los experimentos y con la cual realizar los experimentos de absorción del fármaco tras el pretratamiento con microporación láser.

Partiendo de una solución salina amortiguadora de fosfatos a pH 5.0 con HPβCD (50 mM) y una cantidad conocida de paliperidona (3.47 mg/mL), una vez todos los componentes se encontraron perfectamente disueltos, se añadió carbopol lentamente hasta alcanzar el 1% (p/p) agitando durante al menos 5 horas para que se embebiese en la solución. El carbopol 980 NF se obtuvo de Noveon (Oudergem, Bélgica).

Transcurrido el tiempo se añadió gota a gota trietanolamina obtenida de Acros Organics (Chemie, Brunschwig; Basel, Suiza) hasta alcanzar un rango de pH entre 7 y 8 consiguiendo así la neutralización del polímero.

La formulación se preparó el día anterior a la realización del experimento y se almacenó hasta su uso en un recipiente de plástico con cierre hermético a temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

Para asegurar la homogeneidad y la estabilidad del gel se tomaron muestras de la formulación de diferentes partes del recipiente de almacenamiento para analizar su concentración. También se realizó inspección visual del gel para identificar los primeros signos de precipitación o cristalización del principio activo. El gel resultó ser estable en todos los casos durante más de una semana (n=3).

5.5. Ensayos de absorción transdérmica

5.5.1. Estudio *in vitro* de difusión a través de la piel

Antes de comenzar los experimentos, la piel se dejó durante al menos 30 minutos en solución salina amortiguadora de fosfatos a pH 7.4 para descongelarla y favorecer el equilibrio iónico. A continuación se situó con el estrato córneo orientado hacia arriba, sobre el compartimento receptor, en el que previamente se introdujo un imán agitador. Se colocó sobre la piel el compartimento dador de forma que quedaran ambos compartimentos alineados, fijándolos con una pinza de acero y cerrando así la célula de forma hermética. Seguidamente se procedió a llenar el compartimento receptor de cada una de las células del ensayo con la fase receptora y el compartimento dador de las células de Franz se llenó con la fase dadora.

En los experimentos con **pizotifeno** la fase receptora utilizada para llenar el compartimento receptor (4 mL) de las células de Franz fue una solución isotónica de [NaCl (150 mM)-HEPES (20 mM)] a pH 4.6. El agua ultrapura utilizada para todas las soluciones se obtuvo del sistema de purificación Barnstead NANOpure system (Barnstead International, Boston, MA, USA).

Antes de la utilización de la fase receptora se comprobó el pH final de la solución, ajustándose en caso necesario a pH 4.6 con NaOH 5N o con HCl 5N. Seguidamente, se filtró a vacío a través de filtros desechables de PTFE de 0.45 μm de diámetro MF Monitor Refills® (Millipore Corporate, Billerica, MA, USA). Tanto el cloruro sódico como el HEPES de grado analítico fueron suministrados por Sigma-Aldrich CO. (St. Louis, USA). Una vez preparada la solución, se almacenó en frascos topacio a 4 °C hasta su utilización.

La solución dadora de pizotifeno malato, de concentración 2.4 mg/mL, se preparó en la solución amortiguadora de pH e isotónica [NaCl (150 mM) - HEPES (20 mM), pH 4.6]. En los ensayos se empleó 1 mL de esta solución.

Una vez ensambladas las células y llenas con sus correspondientes soluciones, se colocaron en un baño a 37 ± 2 °C, sobre un agitador magnético para mantener la fase receptora en agitación constante mientras dura el experimento.

Por último, los dos compartimentos fueron sellados con Parafilm® para evitar así cualquier posible pérdida por evaporación.

La fase dadora de cada célula se renovó a tiempos pre-establecidos para asegurar la condición de dosis infinita. Para asegurar que la concentración en el compartimento dador no se reducía por debajo del 10% durante el tiempo que duraba el ensayo y por lo tanto mantenía las condiciones de “dosis infinita”, se analizaron las soluciones dadoras al finalizar el experimento. En ningún caso la concentración se encontró por debajo del 10% de la concentración inicial, por lo que mantuvo las condiciones experimentales idóneas para la realización de los ensayos de difusión.

No obstante, para determinar el efecto del pH de la fase receptora en la piel, puesto que se utilizó a pH 4.6, se realizó un experimento, en el que se sustituyó únicamente la fase receptora de pH 4.6 por fase receptora de la misma composición pero a pH 7.4. Los resultados obtenidos en ambos estudios de difusión se compararon para establecer si existían diferencias que pudiesen interferir en la absorción del pizotifeno.

En los experimentos llevados a cabo con *paliperidona* se utilizaron unas células de Franz con mayor capacidad y un área de difusión efectiva de $3.0 \pm 0.1 \text{ cm}^2$. La fase receptora utilizada estaba compuesta por 10 mL de solución salina amortiguadora de fosfatos a pH 7.4 con HP β CD 75 mM. Como solución dadora se utilizaron 2 mL de PBS pH 5.0 con HP β CD 50 mM y 3.47 mg/mL de paliperidona. La solución amortiguadora de pH estaba compuesta por:

Cloruro sódico	8.00 g
Fosfato monobásico de potasio	0.19 g
Fosfato monobásico de sodio	3.60 g
Agua ultrapura	c.s.p 1000 mL

5.5.2. Estudio in vitro de absorción transdérmica de pizotifeno con pretratamiento de promotores químicos al 5%.

Para la realización de los estudios con promotores químicos se utilizaron las células de difusión como se explica en el punto anterior. Una vez ensambladas las células (compartimentos dador y receptor, piel e imán) en algunas de ellas se dispuso 200 μL de una solución promotora al 5% (v/v) en etanol en el compartimento dador; en otras 200 μL de etanol, como control del vehículo; y en las últimas 200 μL de fase receptora, como control sin promotor. Para terminar, se cubrieron los compartimentos dadores con Parafilm[®]. Transcurridas 12 horas, se desecharon las soluciones de los dadores y se llenó cada uno de los compartimentos con las soluciones mencionadas en el apartado anterior. A partir de este momento el experimento se realizó igual que en los ensayos de difusión.

La concentración utilizada en las soluciones de tratamiento de los promotores de absorción transdérmica se fijó al 5% (v/v) considerando que la capacidad de promoción de los mismos depende de la concentración (Borrás-Blasco *et al.*, 1997; López *et al.*, 2000).

5.5.3. Estudio in vitro de absorción transdérmica de pizotifeno con iontoforesis.

Los experimentos con iontoforesis se realizaron como se explica en la sección 5.3.2. Para poder determinar el factor de inhibición, se realizaron diferentes ensayos incluyendo las siguientes condiciones: pizotifeno (2.4 mg/mL) + ACM (2.27 mg/mL) y

ACM solo (2.27 mg/mL). La intensidad de corriente utilizada en los experimentos fue de 0.5 mA/cm², debido a que se acepta como el valor máximo que no produce molestias al paciente.

El compartimento dador se rellenó con 1 mL de la solución dadora y el compartimento receptor con 4.2 mL de la solución receptora. Las muestras se tomaron cada hora durante las 8 horas que duraron los experimentos, las células de Franz se mantuvieron en agitación y a temperatura constante (37 ± 1 °C).

5.5.4. Estudio in vitro de absorción transdérmica de pizotifeno con STATs.

Para la realización de los estudios de absorción transdérmica de pizotifeno con STATs se utilizaron las mismas células de Franz que en el resto de experimentos con el fármaco. Las células se montaron con el estrato córneo hacia arriba, sobre el cual se vertieron 50 µL de agua destilada para ayudar a fijar el STAT (1 cm²). Seguidamente se colocó encima del STAT el compartimento dador y se fijó con ayuda de una pinza. El compartimento receptor de cada célula se llenó con solución amortiguadora de pH isotónica (4.2 mL). Se mantuvo a temperatura (37 ± 1 °C) y agitación constantes durante las 56 horas que duró el experimento. Los compartimentos receptores fueron cerrados herméticamente con Parafilm® para evitar la evaporación de solución.

5.5.5. Estudio in vitro de absorción transdérmica de paliperidona con pretratamiento de microporación láser.

Debido a que el láser excita principalmente las moléculas de agua, antes de realizar el tratamiento láser, se secó la superficie de la piel con un papel absorbente para evitar cualquier posible interferencia.

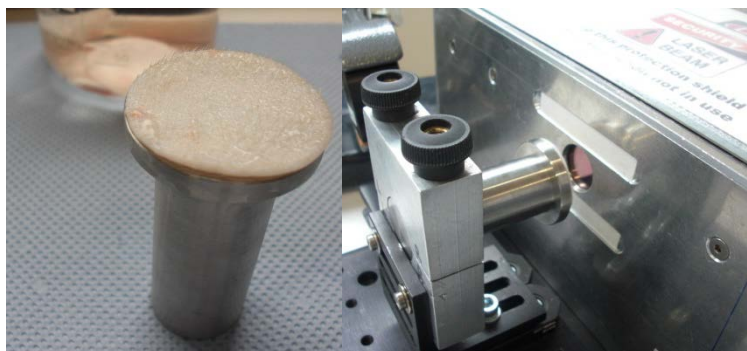


Figura 20. Piel colocada en el soporte para tratamiento láser.

Una vez realizada la microporación láser de la piel, se procedió como en los ensayos de difusión. Además de estudiar la difusión pasiva de paliperidona en solución y en gel se estudiaron los siguientes tratamientos láser (número de poros: número de pulsos): 450:3, 900:3, 1800:3, 900:1, 900:5 para solución; y 900:3 para el gel. De forma que la correspondencia entre pulsos y fluencia es la siguiente: 1 pulso = 4.53 J/cm^2 ; 3 pulsos = 13.59 J/cm^2 ; y 5 pulsos = 22.65 J/cm^2 . Tras la realización del tratamiento láser se comprobó de forma visual que el tratamiento se había realizado correctamente mediante un microscopio estereoscópico LEICA S6D. A continuación las pieles se montaron en células de Franz y se llenaron los compartimentos receptor y dador de la misma forma que en los estudios de difusión, excepto las condiciones en que se estudió el efecto en la absorción de paliperidona desde el gel, para lo cual se sustituyeron los 2 mL de paliperidona en solución amortiguadora de fosfatos a pH 5.0 con HP β CD (50 mM) por 600 μg de gel. Los dadores se cerraron herméticamente bien con parafilm o con tapones. El experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 24 horas.

5.6. Toma de muestras

En los experimentos de **pizotifeno** la toma de muestras se realizó de la siguiente forma. Durante las 32 horas que duraron los experimentos de difusión pasiva y pretratamiento con promotores químicos se tomaron muestras del compartimento receptor (200 μL) a tiempos prefijados. El volumen de muestra se repuso cada vez con el mismo volumen de fase receptora, con el fin de mantener el volumen constante. En

concreto, se tomaron muestras cada hora durante las 8 primeras horas y a las 24, 25, 26, 28, 30 y 32 horas, cuando finalizó el ensayo. También se tomaron muestras de 200 μL de los dadores a las horas 4, 8, 24, 28 y 32.

En los experimentos de iontoforesis las muestras se tomaron cada hora durante las 8 horas que duró el experimento.

En los experimentos de *paliperidona* se tomaron muestras (600 μL) cada dos horas hasta la hora 12 y a partir de la hora 20 hasta el fin del experimento (24 horas). Asimismo, todo el volumen extraído con la toma de muestras se repuso con la solución receptora original. Al finalizar los experimentos se analizó la solución del compartimento dador para asegurar que la concentración no había descendido del 90 % de la inicial.

5.7. Extracción del fármaco retenido en piel

Una vez concluidos los ensayos de *pizotifeno*, se recortó la piel con tijeras quirúrgicas tomando como referencia el borde del área de difusión. El trozo de piel obtenido se lavó con 600 μL de solución receptora y se introdujo en un frasco pequeño con un imán y 2 mL de fase receptora, se colocó sobre un multiagitador magnético y se mantuvo 12 horas bajo agitación constante. Transcurrido ese tiempo se filtró la solución con un filtro PTFE Minisart® de 0.45 μm de diámetro de poro (Sartorius AG, Hannover, Alemania) para su posterior análisis cromatográfico.

Asimismo se realizó un ensayo para determinar si existía degradación del pizotifeno por la piel y en qué grado, así como para evaluar la capacidad de extracción del método empleado. Esta información es útil tanto en el transcurso de los experimentos de absorción, en los que la solución de pizotifeno está en contacto directo con la piel, así como en el análisis de la cantidad de fármaco retenida en la piel. Con este propósito, tras montar las células de Franz con la piel, se llenaron el compartimento dador y el receptor con solución isotónica amortiguadora de pH [NaCl (150 mM)-HEPES (20 mM)] a pH 4.6, a la cual se adicionó pizotifeno malato hasta obtener una concentración de 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El sistema se mantuvo a una temperatura de 37 ± 1 °C y en agitación constante durante 32 horas. Se tomaron muestras de ambos

compartimentos al principio y al final del experimento y a continuación se extrajo el fármaco retenido en la piel como se indicó anteriormente, seguidamente las muestras se analizaron con el método analítico HPLC-UV previamente validado.

Para la extracción de la **paliperidona** retenida en piel, tras finalizar los experimentos se recortó la piel por el área de difusión y se lavó con 600 µL de fase receptora. Seguidamente, la piel se cortó repetidas ocasiones para aumentar su superficie de contacto y a continuación se sumergieron todos los pedacitos en 5 mL de metanol y manteniéndolo en agitación durante al menos 6 horas. Pasado este tiempo, las muestras se filtraron con filtros de jeringa EXAPURE™ PTFE 0.45-25 (tamaño de poro de 0.45 µm y membrana de PTFE de 25 mm de diámetro) y se analizaron con el método analítico validado.

A modo de control de la extracción de paliperidona de la piel tras los experimentos, se puso en contacto una porción de piel fresca en una solución conocida de metanol con paliperidona (100 µg/mL) hasta que se evaporó el solvente (n=3). Entonces se procesó la piel como en los experimentos.

Para determinar si los filtros de jeringa empleados podían retener la paliperidona y enmascarar los resultados se determinó la recuperación de paliperidona en solución filtrada con los filtros. Para ello, se hizo pasar a través de los mismos la solución de paliperidona en metanol (100 µg/mL) y se analizó la solución filtrada.

6. Análisis de datos

Con el fin de estudiar la absorción transdérmica de ambos fármacos (pizotifeno y paliperidona) se construyeron gráficas de las cantidades acumuladas de fármaco por unidad de superficie (Q_a) en el compartimento receptor frente al tiempo (t). En la ecuación 18, utilizada para el cálculo de las cantidades acumuladas a partir de la concentración de cada una de las muestras, se tuvo en cuenta el volumen de fase del compartimento receptor que se extraía como muestra y se reponía más tarde.

$$Qa_n = \frac{C_n \cdot V_r + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \cdot V_m}{S} \quad \text{Ecuación 18}$$

donde “ Qa_n ” sería la cantidad de fármaco existente a tiempo “ n ”, “ C_n ” la concentración del fármaco a tiempo “ n ”, “ V_r ” el volumen total de fase receptora que se encuentra en el compartimento receptor, “ C_i ” la concentración de fármaco en las muestras anteriores, “ V_m ” el volumen de cada muestra tomada y “ S ” la superficie de difusión.

Posteriormente, para calcular el flujo transdérmico, se ajustaron a los datos la cinética de difusión de Scheuplein, aplicable cuando el transporte de moléculas a través de la piel ocurre de forma pasiva.

Los ajustados de las cinéticas de absorción, se realizaron mediante el programa informático WinNonlin® 5.0.1 (Pharsight corp). Se calcularon como parámetros primarios (KH) y (D/H^2) , a partir de los cuales se obtuvieron “ t_o ” (tiempo de latencia; ecuación 19), “ K_p ” (coeficiente de permeabilidad; ecuación 20) y “ J ” (flujo transdérmico; ecuación 21):

$$t_o(h) = \frac{H^2}{6 \cdot D} \quad \text{Ecuación 19}$$

$$K_p \left(\frac{cm}{h} \right) = \frac{KD}{H} \quad \text{Ecuación 20}$$

$$J (\mu g/cm^2h) = K_p \cdot C \quad \text{Ecuación 21}$$

En las condiciones en las que se empleó la iontoforesis, no se utilizó la segunda ley de Fick mencionada anteriormente debido a que es un proceso activo. El cálculo del flujo transdérmico se realizó a partir de la pendiente obtenida tras la representación de los datos obtenidos mediante la ecuación 18.

Tanto los valores de flujo de fármaco obtenidos en las diferentes condiciones ensayadas como las cantidades de pizotifeno retenidas en piel y los parámetros de absorción transdérmica calculados tras los ensayos de **pizotifeno**, se compararon entre sí estadísticamente. En primer lugar se comprobó que los datos seguían una distribución normal mediante el test de Shapiro-Wilk y seguidamente se realizó el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) para detectar la posible existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos. El nivel de confianza fue del 95%, de manera que existen diferencias significativas cuando el valor de probabilidad

obtenido es menor al 5%. El análisis de varianza se completó mediante la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Scheffe o, la prueba y T3 de Dunnett según fuese la distribución homocedástica o heterocedástica, respectivamente.

A fin de analizar la capacidad de los promotores para incrementar la absorción del pizotifeno, se calculó el Efecto Promotor (EP), que es el cociente entre el flujo transdérmico del fármaco en el ensayo con promotor (J_P) y el control (J_C):

$$EP = \frac{J_P}{J_C} \qquad \text{Ecuación 22}$$

El análisis estadístico de los flujos, las cantidades acumuladas y la cantidad retenida en piel de **paliperidona** se llevó a cabo mediante la prueba ANOVA de una vía, con un nivel de confianza del 95%, y a continuación se completó con la prueba de comparaciones múltiples post-hoc Student Newman Keuls.

Capítulo 5. Resultados y discusión

1. Pizotifeno malato

1.1. Método analítico

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el desarrollo y validación de un método analítico específico, preciso, exacto y robusto, que permite cuantificar pizotifeno malato en muestras procedentes de los ensayos de difusión transdérmica.

Para la detección de fármacos tras experimentos transdérmicos se suelen seleccionar métodos como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), ya que presentan grandes ventajas frente a otros métodos de análisis. Son métodos versátiles y que pueden ser adaptados para una gran variedad de fármacos seleccionando una columna, una fase móvil y un detector adecuados. Los métodos una vez optimizados, pueden ser relativamente rápidos y fáciles de usar. Además de detectar los fármacos también pueden dar información acerca de lo que ocurre durante los experimentos de absorción transdérmica, ya que puede que el fármaco sufra alguna biotransformación. La mayor desventaja de los métodos cromatográficos reside en las bajas concentraciones encontradas en los estudios de absorción transdérmica, ya que se requiere elevada precisión para la cuantificación de muestras de baja concentración y elevada especificidad, para evitar interferencias debidas a restos de sustancias endógenas de membranas biológicas utilizadas en los experimentos. De hecho, existen alternativas para disminuir este problema, como filtrar las muestras previamente a su análisis con filtros convencionales o mediante la utilización de pre-columnas, que situadas en la parte anterior de la columna hacen la vez de filtro.

La validación del método analítico se llevó a cabo mediante la construcción de múltiples rectas de calibrado para el pizotifeno malato. Para la obtención de dichas rectas de calibrado se realizaron una serie diluciones a partir de la solución madre de pizotifeno de 2.4 mg/mL de concentración preparada con la solución salina isotónica de pH 4.6 hasta conseguir soluciones de pizotifeno de distintas concentraciones (0.24, 0.6, 1.2, 2.4, 3, 6, 12 y 24 µg/mL) que abarcaron el intervalo de concentraciones de las muestras obtenidas en los ensayos.

Dado que el espectro del pizotifeno muestra dos máximos de absorbancia a 254 y 230 nm (Figura 21), se seleccionó el de 254 nm debido a que a 230 nm aparecía un mayor número de interferencias posiblemente debidas a los compuestos de la piel. A esta longitud de onda, la sensibilidad y la especificidad ofrecidas por el método fueron suficientes para cuantificar el pizotifeno en el rango de concentraciones de las muestras obtenidas en los ensayos de difusión *in vitro*. Utilizando esta longitud de onda y las condiciones cromatográficas que se describen en el apartado 2.1 de materiales y métodos, se obtuvo una buena separación del pizotifeno malato del resto de componentes de las muestras.

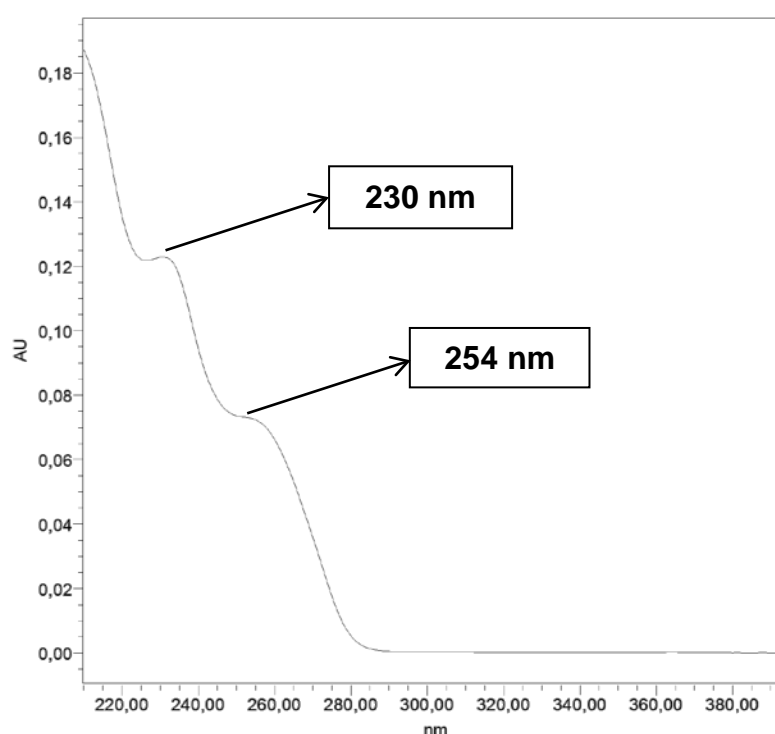


Figura 21. Espectro de absorción UV del pizotifeno malato.

La Figura 22 muestra un cromatograma correspondiente a un patrón de pizotifeno malato usado en la validación del método. Tal y como se puede observar, el tiempo de retención del pizotifeno corresponde a 3.2 minutos aproximadamente, la señal cromatográfica del compuesto queda suficientemente separada del frente para evitar interferencias.

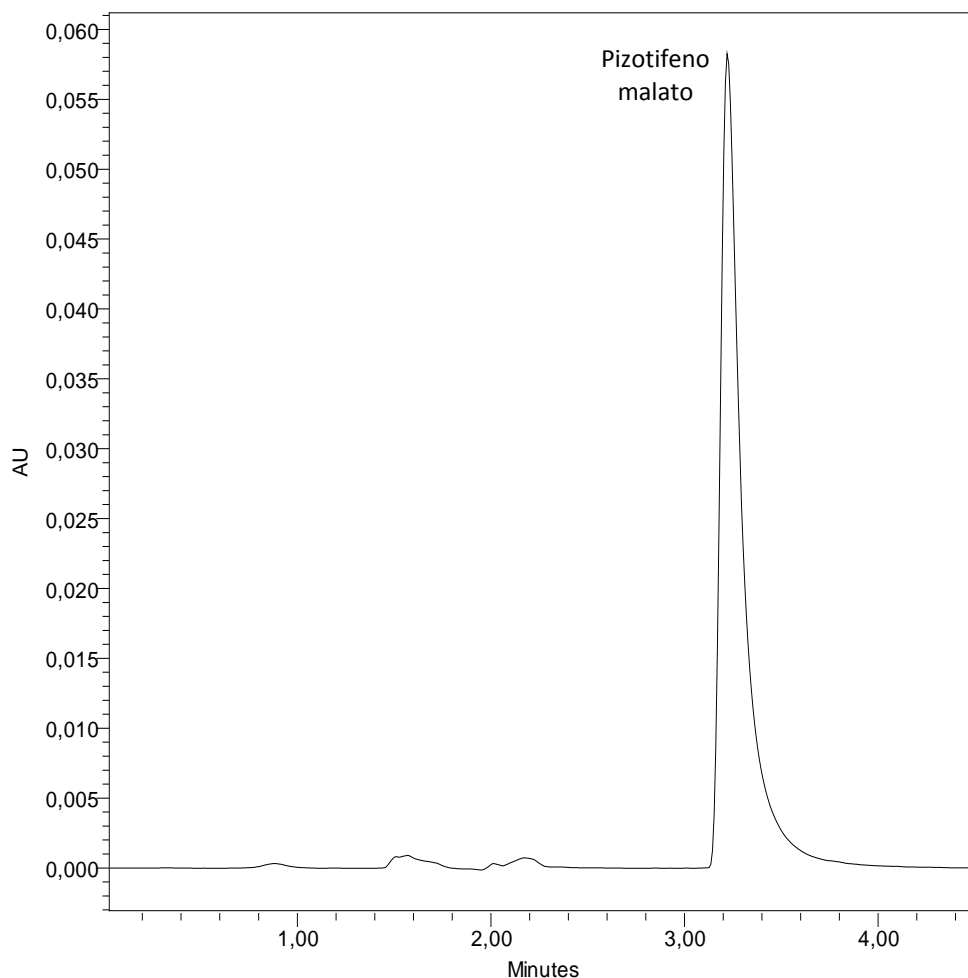


Figura 22. Cromatograma de una solución patrón de pizotifeno malato.

Para la validación del método analítico, se determinó la linealidad, precisión, exactitud, especificidad y límites de detección y cuantificación del método analítico.

Para la determinación de la precisión y la exactitud intradía del método, se realizaron seis análisis en un mismo día de cada una de las concentraciones del intervalo de concentraciones a validar. La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos en estos análisis intradía.

C_{teórica} (µg/mL)	C_{exp} (µg/mL) ± DE
0.24	0.25 ± 0.01
0.60	0.61 ± 0.02
1.20	1.20 ± 0.03
2.40	2.42 ± 0.02
3.00	2.94 ± 0.06
6.00	6.02 ± 0.06
12.0	12.0 ± 0.1
24.0	24.0 ± 0.1

Tabla 5. Concentración teórica y media experimental (n=6) obtenidas tras el análisis de los patrones de pizotifeno obtenidos en los distintos ensayos realizados en el mismo día (intradía).

Por otra parte, para determinar la reproducibilidad interdía, se construyeron diez rectas de calibrado en diez días distintos, una por día (n=10). Con este fin, se determinó por triplicado el pizotifeno contenido en alícuotas de cada una de las distintas diluciones a estudiar. La Tabla 6 muestra las concentraciones medias obtenidas a partir de los análisis de cada concentración realizados en cada uno de los días, respecto a la concentración teórica de pizotifeno presente en la solución analizada.

C_{teórica} (µg/mL)	C_{exp} (µg/mL) ± DE
0.24	0.24 ± 0.01
0.60	0.59 ± 0.02
1.20	1.18 ± 0.03
2.40	2.41 ± 0.04
3.00	2.97 ± 0.04
6.00	6.03 ± 0.05
12.0	12.6 ± 0.1
24.0	24.0 ± 0.1

Tabla 6. Concentración teórica y media experimental (n=10) obtenidas tras el análisis de los patrones de pizotifeno obtenidos en los distintos ensayos realizados en distintos días (interdía).

Para cada punto de la recta de calibrado se calculó el error relativo como medida de la **exactitud** del método analítico. La Tabla 7 muestra el error relativo (E_r) calculado a partir de las concentraciones experimentales obtenidas por el método analítico tanto en los análisis interdía como en los análisis intradía.

Exactitud				
$C_{teorica}$ ($\mu\text{g/mL}$)	Interdía (n=10)		Intradía (n=6)	
	C_{exp} ($\mu\text{g/mL}$)	E_r (%)	C_{exp} ($\mu\text{g/mL}$)	E_r (%)
0.24	0.24 \pm 0.01	-0.20	0.25	-1.91
0.60	0.59 \pm 0.02	2.39	0.61	-1.33
1.20	1.18 \pm 0.03	1.60	1.20	0.11
2.40	2.41 \pm 0.04	-0.36	2.42	-0.68
3.00	2.97 \pm 0.04	1.06	2.94	2.08
6.00	6.03 \pm 0.05	-0.44	6.02	-0.32
12.0	12.6 \pm 0.1	-0.46	12.0	-0.12
24.0	24.0 \pm 0.1	0.13	24.0	0.03

Tabla 7. Concentración teórica, experimental y exactitud expresada como error relativo medio (%) para cada una de las concentraciones del intervalo validado, tanto en los ensayos interdía como en los intradía.

Como se observa en la Tabla 7, tanto en los ensayos interdía como en los intradía, el E_r medio del rango de concentraciones estudiadas no supera el 10%. El E_r máximo tampoco superó el 10%, encontrándose en ambos casos dentro del máximo establecido de acuerdo con la bibliografía (Jenke, 1996a, b).

La Tabla 8 muestra la precisión interdía e intradía calculada a partir del coeficiente de variación de cada concentración analizada. En el intervalo de concentraciones analizado el coeficiente de variación calculado se halló por debajo de los límites establecidos en la literatura consultada (10%) (Jenke, 1996a, b).

Precisión				
$C_{teórica}$ ($\mu\text{g/mL}$)	Interdía (n=10)		Intradía (n=6)	
	C_{exp} ($\mu\text{g/mL}$)	C.V. (%)	C_{exp} ($\mu\text{g/mL}$)	C.V. (%)
0.24	0.24 \pm 0.01	5.01	0.25	3.59
0.60	0.59 \pm 0.02	4.80	0.61	4.17
1.20	1.18 \pm 0.03	2.67	1.20	2.08
2.40	2.41 \pm 0.04	1.20	2.42	0.62
3.00	2.97 \pm 0.04	1.49	2.94	2.26
6.00	6.03 \pm 0.05	1.04	6.02	1.03
12.0	12.6 \pm 0.1	0.33	12.0	0.17
24.0	24.0 \pm 0.1	0.70	24.0	0.84

Tabla 8. Concentración teórica, experimental y precisión expresada como coeficiente de variación (C.V.) para cada una de las concentraciones del intervalo validado, tanto en los ensayos interdía, como en los intradía.

Los resultados interdía e intradía de precisión mostrados en la Tabla 8 no superaron el 10% en ningún caso. El coeficiente de variación más elevado (5.01%) se obtuvo para la concentración más baja estudiada (0.24 $\mu\text{g/mL}$).

La relación entre la concentración de fármaco y la respuesta en la recta fue lineal en todo el rango de concentraciones validado. La bondad de los ajustados lineales de cada recta de calibrado, es decir, la dependencia lineal entre el área del pico en el cromatograma y la concentración de pizotifeno en cada muestra-patrón viene expresada por el coeficiente de correlación, $r^2 \geq 0.9999$. La curva de calibración obtenida se ajustó a la ecuación: $y = 79261 (\pm 540) x - 361 (\pm 1273)$ (media \pm DE).

La especificidad del método analítico se determinó mediante el análisis de 10 blancos que consistían en alícuotas de la solución de [NaCl (150 mM)-HEPES (20 mM)] ajustada a un pH de 4.6. El resultado del análisis de 10 blancos no mostró interferencias al tiempo de retención del pizotifeno malato.

Como se observa en la Figura 23, tras analizar una muestra proveniente de un ensayo de absorción transdérmica la señal proporcionada por el pizotifeno malato se encuentra adecuadamente separada del resto de sustancias presentes en la muestra.

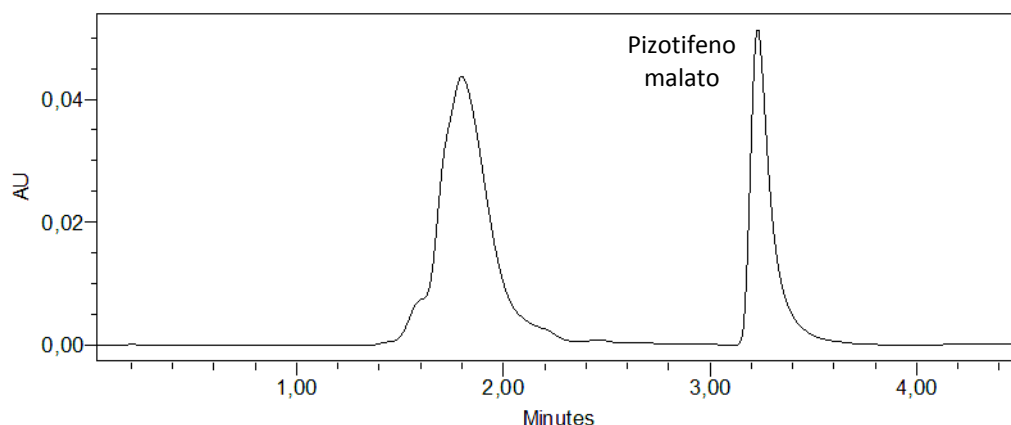


Figura 23. Cromatograma obtenido al analizar una muestra proveniente de un ensayo de absorción transdérmica.

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se determinaron a partir de la desviación estándar residual de los datos de la regresión. De esta forma el LOD se estableció en 0.02 $\mu\text{g/mL}$ y el LOQ en 0.07 $\mu\text{g/mL}$.

1.1.1. Robustez del método analítico

Para estudiar la robustez se realizaron diferentes análisis de la misma muestra de concentración conocida, en los cuales se introdujeron modificaciones sobre el método analítico propuesto para evaluar la repercusión en los resultados del análisis. Los parámetros modificados fueron:

- **Longitud de onda:** 254 ± 2 nm
- **Composición de la fase móvil (v/v):** $50/50 \pm 2$
- **pH de la fase móvil:** 4.6 ± 2
- **Flujo:** 1 ± 0.1 mL/min

Los análisis de cada alícuota de la misma dilución se realizaron por triplicado y se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 9:

Condición	Modificación	Unidades de área (Media ± DE)	C.V. (%)	Tiempo retención (min) (Media ± DE)	
Longitud de onda (nm)	252	8327925 ± 326	0.01	3.22 ± 0.01	
	254	8354807 ± 139	0.01	3.22 ± 0.01	
	256	8165391 ± 3614	0.04	3.22 ± 0.01	
Fase móvil	Composición Fase Móvil (v/v)	48/52	8265351 ± 6326	0.08	3.51 ± 0.01
		1/1	8354807 ± 139	0.01	3.22 ± 0.01
		52/48	8359609 ± 2409	0.03	3.02 ± 0.01
	pH	4,4	8396370 ± 1435	0.02	3.27 ± 0.01
		4,6	8354807 ± 139	0.01	3.22 ± 0.01
		4,8	8307764 ± 33410	0.40	3.27 ± 0.01
	Flujo (mL/min)	0,9	8292605 ± 4302	0.05	3.18 ± 0.01
		1	8354807 ± 139	0.01	3.22 ± 0.01
		1,1	8321911 ± 958	0.01	3.25 ± 0.01

Tabla 9. Resultados obtenidos para el estudio de la robustez del método analítico en los que se modificaron la longitud de onda y la composición, el pH y el flujo de la fase móvil.

Los resultados obtenidos confirmaron que las modificaciones llevadas a cabo no tuvieron un efecto importante en los parámetros estudiados (área o tiempo de retención), confirmando la robustez del método.

1.1.2. Comparación con otros métodos existentes

Con anterioridad al desarrollo del método de análisis cromatográfico UV/Vis validado, ya existían algunos métodos que permitían la cuantificación del pizotifeno (Abounassif *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2010). No obstante, debido a las bajas concentraciones de fármaco obtenidas en los ensayos de absorción transdérmica y a las numerosas interferencias que pueden ocasionar los diferentes compuestos que se desprenden de la piel, se desarrolló un método analítico con los medios disponibles intentando obtener el mejor resultado posible.

Tras la validación del método analítico se compararon los métodos desarrollados por Abounassif *et al.* (Abounassif *et al.*, 2005), en el que estudia la estabilidad de algunos antihistamínicos como la loratadina y el pizotifeno, y el desarrollado por

Rahman et al. (Rahman *et al.*, 2010) para la cuantificación de pizotifeno malato procedente de formas farmacéuticas sólidas.

El método cromatográfico desarrollado por Abounassif et al. consiste en una columna Bondesil CN (250 x 4.6 mm) con un diámetro de poro de 5 μm , una fase móvil compuesta por acetonitrilo (ACN) y solución amortiguadora de pH (acetato sódico (AcNa) 0.01 M) 75:25 (v/v) a pH 3.5, un flujo de 2 mL/min, una longitud de onda de 254 nm, y un volumen de inyección de 20 μL .

El método cromatográfico propuesto por Rahman et al. utiliza una columna ODS Hypersil C18 (100 x 4.6 mm) con un diámetro de poro de 5 μm , fase móvil compuesta de acetonitrilo y solución amortiguadora de pH (acetato amónico (AcNH₄) 0.1 M con 2.5% (v/v) de trietilamina (TEA)) 60:40 (v/v), flujo de 2 mL/min, longitud de onda 231 nm, y un volumen de inyección de 100 μL .

En la Tabla 10 se pueden observar los diferentes parámetros utilizados en los métodos analíticos mencionados anteriormente, así como del método validado.

	(Abounassif <i>et al.</i> , 2005)	(Rahman <i>et al.</i> , 2010)	Método validado
Columna	Bondesil CN (250 x 4.6 mm) 5 μm	ODS Hypersil C18 (100 x 4.6 mm) 5 μm	Kromasil C18 (250 x 4.0 mm) 5 μm
Fase Móvil	ACN y solución tampón (AcNa 0.01 M) pH 3.5 75:25 (v/v)	ACN y solución tampón (AcNH ₄ 0.1 M y 2.5% (v/v) de TEA) 60:40 (v/v)	ACN y solución tampón (0.05 M ADHP) pH 4.6 50:50 (v/v)
Flujo	2 mL/min	2 mL/min	1 mL/min
Longitud de onda	254 nm	231 nm	254 nm
Volumen de inyección	20 μL	100 μL	50 μL
Tiempo de retención	7 minutos	2.8 minutos	3.2 minutos
Rango concentraciones validado	5 - 25 $\mu\text{g/mL}$	10-30 $\mu\text{g/mL}$	0.24 - 24 $\mu\text{g/mL}$

Tabla 10. Resumen de los métodos analíticos HPLC-UV de pizotifeno malato. Donde ACN es acetonitrilo, AcNa es acetato sódico, AcNH₄ es acetato amónico, TEA es trietilamina y ADHP es amonio dihidrógeno fosfato.

Mediante el nuevo método validado, se obtuvo un tiempo de retención de 3.2 minutos frente a los 7 minutos de Abounassif et al. y los 2.8 minutos de Rahman et al. y se redujo el flujo de fase móvil de 2 mL/min a 1 mL/min. Lo cual supone un tiempo de retención cercano al más corto y con la mitad del gasto de fase móvil. Asimismo se obtuvo linealidad en un intervalo de concentración de 0.24 – 24 µg/mL frente al 5 - 25 µg/mL del primero y 10-30 µg/mL del segundo, demostrando una sensibilidad considerablemente mayor para las concentraciones más bajas respecto al resto de métodos. El nuevo método validado, permite analizar las muestras obtenidas en los ensayos que contienen muy bajas concentraciones de fármaco, procesar gran número de las mismas en un corto periodo de tiempo y requiere menor volumen de fase móvil.

1.2. Caracterización físico-química

1.2.1. Determinación del pKa

El pizotifeno presenta un grupo ionizable, como se muestra en la Figura 24:

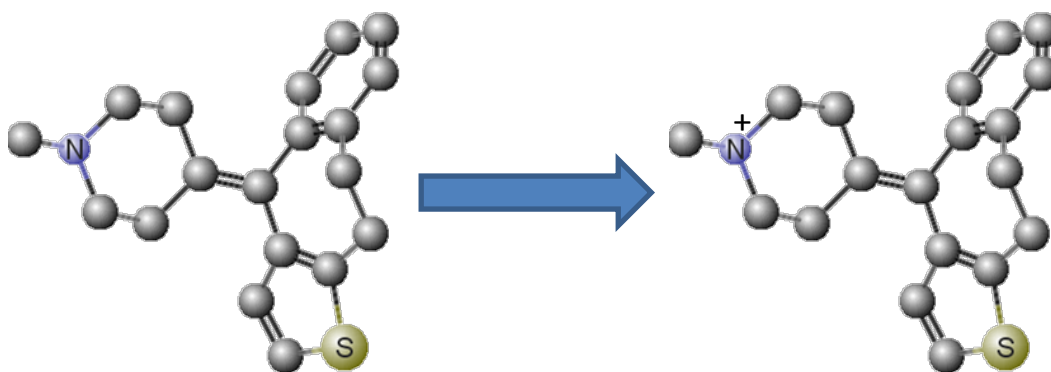


Figura 24. Representación de la estructura química del pizotifeno y su ionización. Obtenida mediante el software "MarvinSketch 5.9.0".

Al realizar el ensayo y representar el pH de la solución de pizotifeno frente a una concentración creciente de NaOH, se obtuvo la curva de titulación que se muestra en la Figura 25.

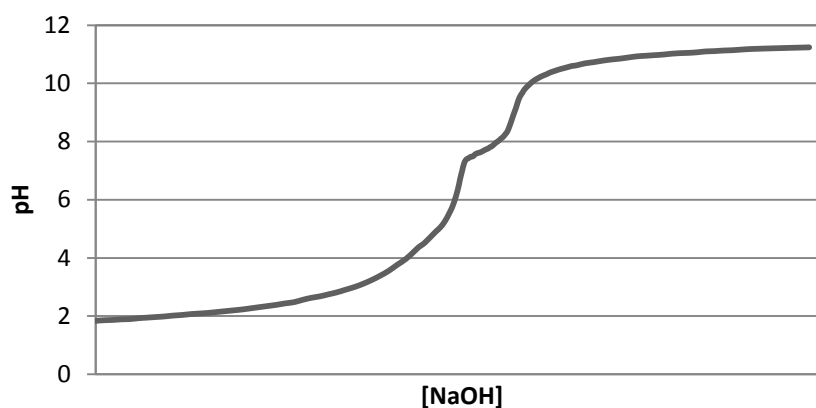


Figura 25. Representación gráfica de la titulación de pizotifeno.

De acuerdo con una de las formas de la ecuación de Henderson-Hasselbalch (Ecuación 23) cuando la concentración de fármaco ionizado (A^-) es igual a la concentración de fármaco no ionizado (HA), el pH se corresponde con el pKa.

$$pH = pKa - \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \text{Ecuación 23}$$

Al realizar la primera derivada de la curva de titulación ésta muestra los puntos isoeléctricos (Figura 26), en los cuales el fármaco presenta una carga neta cero. Tras el cálculo de la segunda derivada se obtiene un pico únicamente, el punto medio de la neutralización, que corresponde al pKa experimental del pizotifeno (Figura 27).

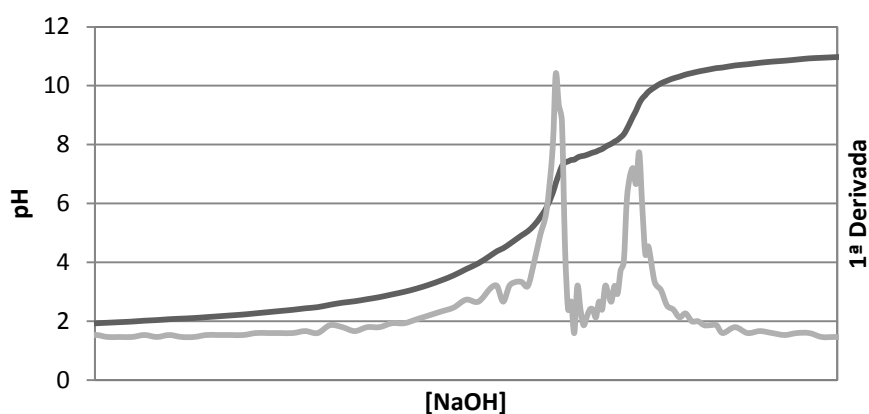


Figura 26. Representación gráfica de la valoración de pizotifeno con la 1ª Derivada.

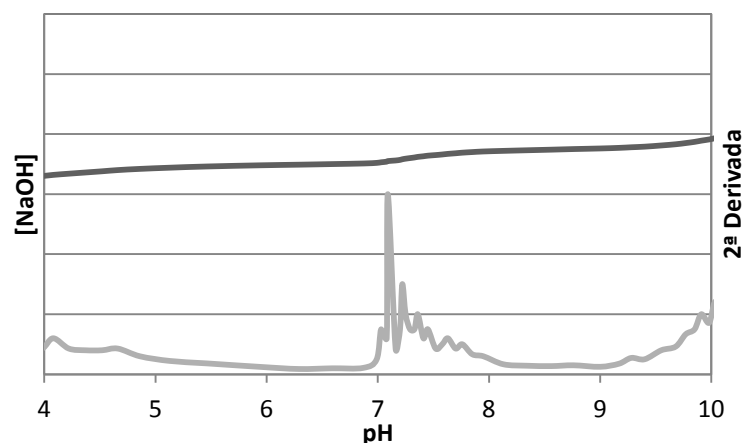


Figura 27. Representación gráfica de la valoración de pizotifeno con la 2ª derivada.

Como se observa en la Figura 27, el pKa del pizotifeno es 7.04 ± 0.40 ($n=3$). Este valor no se aleja mucho del predicho (pKa de 7.98) por el programa de predicción utilizado, “MarvinSketch 5.9.0” de Chemaxon Ltd.

1.2.2. Determinación del log D

Tras la realización de los ensayos para la determinación del log D (octanol/agua) experimental de pizotifeno malato a pH 7.4, el valor medio obtenido fue de 1.10 ± 0.20 ($n=3$). No se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos a las diferentes concentraciones de pizotifeno y proporciones n-octanol/solución amortiguadora de pH ensayadas, hecho que demuestra la consistencia de los resultados.

C_{teórica} (µg/mL)	log D	DE
24.0	0.86	0.21
12.0	0.92	0.13
2.40	0.98	0.03
1.20	1.21	0.26
0.24	1.33	0.06
0.12	1.29	0.08
Media	1.10	0.20

Tabla 11. Valores experimentales de log D \pm DE para las diferentes concentraciones y proporciones octanol/agua a pH 7.4.

1.2.3. Determinación de solubilidad

La solubilidad del pizotifeno a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) en solución amortiguadora isotónica [NaCl (150 mM)-HEPES (20 mM)] a pH 4.6, fue de 2.63 ± 0.23 mg/mL (n=3).

Para evitar que el pizotifeno añadido a las soluciones preparadas en los siguientes experimentos precipitase, se estableció 2.4 mg/mL como valor máximo de concentración de pizotifeno a utilizar en los ensayos.

1.3. Estudio de estabilidad

Los estudios de estabilidad de pizotifeno se realizaron bajo diferentes condiciones de luz y oscuridad, así como a diferentes temperaturas tal como se indica en el apartado 4 de material y métodos.

Inicialmente se realizó el estudio de estabilidad a corto plazo (32 horas) a modo de simulación de las condiciones en los estudios de absorción transdérmica *in vitro*. Los resultados obtenidos en el mismo, se muestran como variación del porcentaje sobre la concentración inicial de la solución madre en la Figura 28.

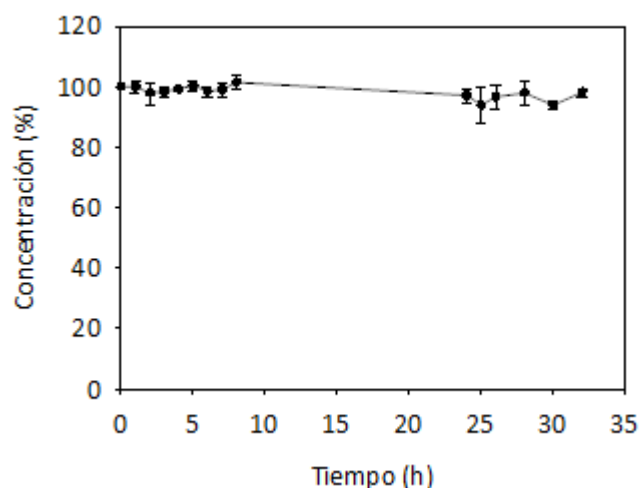


Figura 28. Estabilidad a corto plazo, a 37 °C, de pizotifeno malato (%).

Como se puede observar, la concentración de pizotifeno permanece estable durante todo el ensayo y el valor más bajo obtenido fue del 93.8%. Por lo tanto, esta

solución es estable durante el tiempo de realización de los experimentos de absorción transdérmica.

En la siguiente tabla se observa la variación en porcentaje de la concentración de pizotifeno respecto a la concentración inicial para cada una de las condiciones de almacenamiento estudiadas:

Día	25 °C Luz	25 °C Osc.	-20 °C Osc.	-80 °C Osc.	4 °C Osc.	37 °C Osc.
1	103 ± 1 %	97.9 ± 0.5 %	99.3 ± 1.1 %	98.6 ± 0.5 %	100 ± 1 %	96.3 ± 2.0 %
2	104 ± 1 %	96.2 ± 1.1 %	97.7 ± 1.6 %	98.8 ± 1.3 %	101 ± 2 %	96.4 ± 0.6 %
6	99.8 ± 0.9 %	95.0 ± 0.9 %	97.3 ± 1.1 %	97.6 ± 0.4 %	102 ± 1 %	96.7 ± 3.8 %
13	94.7 ± 0.6 %	97.7 ± 0.4 %	95.6 ± 1.9 %	97.4 ± 0.6 %	101 ± 1 %	96.6 ± 0.6 %
316	93.1 ± 3.0 %	95.5 ± 0.5 %	88.3 ± 3.8 %	91.2 ± 1.9 %	90.5 ± 8.8 %	92.2 ± 2.7 %

Tabla 12. Estabilidad a largo plazo de pizotifeno malato. Realizado a diferentes temperaturas y en presencia de luz u oscuridad (osc.).

Como se puede observar, únicamente en una de las condiciones estudiadas (-20 °C Oscuridad) la concentración bajó del 90% de la inicial, probablemente debido a un proceso de descongelado incompleto o a un mezclado inadecuado de la solución. El aumento de concentración que aparece reflejado en mayor medida en las condiciones de luz a temperatura ambiente y oscuridad a 4 °C, probablemente sea debido a una ligera pérdida por evaporación del disolvente. Por los resultados obtenidos se llega a la conclusión de que el pizotifeno puede almacenarse bajo las condiciones y el tiempo estudiados permaneciendo prácticamente inalterado durante 316 días.

A pesar de que existen estudios de fotoestabilidad en los que se observa cómo se va modificando el espectro de absorción de las soluciones con respecto al tiempo bajo radiación ultravioleta (Abounassif *et al.*, 2005), al comparar las concentraciones finales de las muestras expuestas a la luz con las no expuestas a 25 °C, no se apreciaron diferencias significativas ($p > 0.05$; t-test).

Las condiciones en las que se ha determinado la estabilidad del pizotifeno malato son necesarias para poder desarrollar un secado rápido de los sistemas terapéuticos de

absorción transdérmica, así como para seleccionar el procesado adecuado de las muestras y un almacenamiento apropiado de las formulaciones finales.

1.4. Ensayos *in vitro* de absorción transdérmica

Para la realización de los ensayos de absorción transdérmica de pizotifeno se determinó la estabilidad del pizotifeno en contacto con la piel y seguidamente la difusión pasiva del fármaco. Posteriormente se realizaron experimentos utilizando diferentes técnicas promotoras de la absorción transdérmica: pretratamiento con promotores químicos al 5% e iontoforesis a 0.5 mA/cm². Y finalmente se seleccionaron las mejores estrategias promotoras para su implementación en una formulación transdérmica, concretamente un STAT.

Como se pudo comprobar en el estudio para determinar la degradación del pizotifeno malato en contacto con la piel, no existe una degradación importante del fármaco por la piel bajo las condiciones ensayadas, habiendo recuperado el 97.55 ± 1.96% (n=5), del fármaco aplicado sobre la piel al iniciar el experimento.

La escasa solubilidad de algunos de los promotores químicos estudiados en agua o en mezclas hidroalcohólicas obligó a preparar las soluciones de los promotores ensayados en etanol absoluto en el que se solubilizaban perfectamente, a pesar de que ha sido descrito que altas concentraciones de etanol pueden reducir la absorción transdérmica de distintos compuestos debido a la capacidad que posee el etanol de deshidratar la piel (Thomas y Panchagnula, 2003). Otros posibles solventes que también son muy utilizados en ensayos de difusión transdérmica son el polietilenglicol (PEG) de bajo peso molecular y el propilenglicol. No obstante, se descartaron porque a concentraciones elevadas pueden resultar irritantes para la piel.

A partir de los datos obtenidos en cada célula de difusión para cada una de las condiciones ensayadas se determinaron las cantidades acumuladas en el compartimento receptor frente al tiempo y se calculó la cinética media de penetración transdérmica del pizotifeno.

A continuación se muestran las cinéticas medias de penetración transdérmica del pizotifeno en difusión pasiva (control) y etanol (control vehículo), junto con las

tablas de cantidades acumuladas medias de pizotifeno en el compartimento receptor. En las figuras los puntos corresponden a las cantidades acumuladas observadas en los experimentos y las barras representan la desviación estándar. La línea continua corresponde al ajustado farmacocinético.

Tiempo (h)	Qa ± DE ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
1	1.99 ± 3.06
2	2.17 ± 3.33
3	2.72 ± 3.31
4	3.12 ± 3.62
5	3.76 ± 3.84
6	4.14 ± 3.33
7	5.20 ± 3.86
8	5.72 ± 3.94
24	22.6 ± 6.8
25	25.1 ± 7.8
26	27.3 ± 7.7
28	30.6 ± 9.38
30	34.5 ± 10.0
32	38.8 ± 11.8

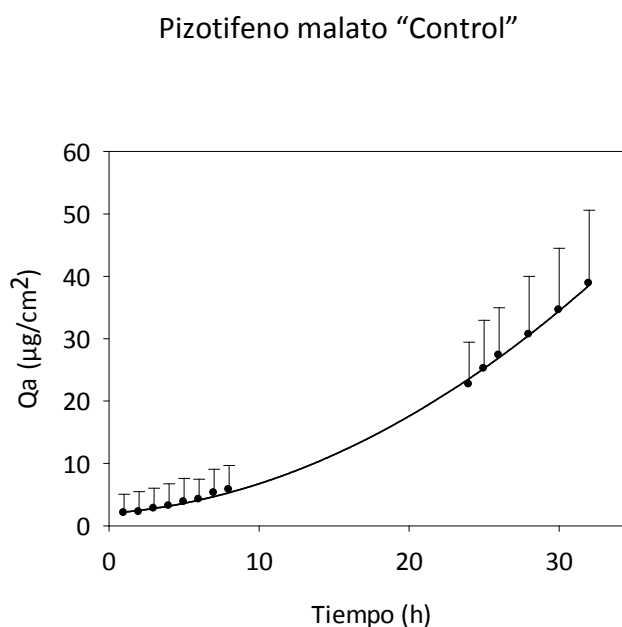


Figura 29. Cantidades medias acumuladas (Qa) de pizotifeno frente al tiempo para el grupo **control** (n=8).

Tiempo (h)	Qa ± DE ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
1	0.72 ± 0.34
2	1.26 ± 0.45
3	2.02 ± 0.73
4	3.21 ± 1.08
5	4.32 ± 1.39
6	5.60 ± 2.00
7	7.48 ± 2.89
8	8.84 ± 3.26
24	48.1 ± 21.0
25	51.4 ± 22.0
26	55.7 ± 23.6
28	62.3 ± 27.8
30	70.0 ± 31.3
32	75.7 ± 32.9

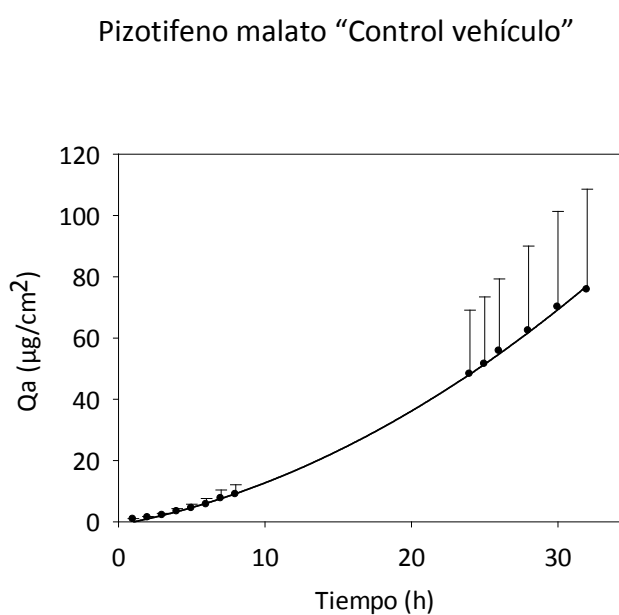


Figura 30. Cantidades medias acumuladas (Qa) de pizotifeno frente al tiempo para el grupo de pretratamiento de la piel con etanol (**control vehículo**) (n=8).

Como se puede observar en las figuras anteriores, las cantidades de fármaco acumuladas en el compartimento receptor para la condición control y control vehículo fueron 38.8 ± 11.8 y $75.7 \pm 32.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Pese a que los valores medios obtenidos en la segunda condición son prácticamente el doble de los obtenidos en el control, no se detectaron diferencias significativas debido a la elevada variabilidad obtenida ($p > 0.05$).

Los ensayos de difusión pasiva se realizaron además utilizando fase dadora a diferentes pH (4.6 y 7.4) para determinar su efecto sobre la absorción transdérmica del pizotifeno. Los resultados obtenidos en este ensayo no mostraron diferencias significativas entre los flujos obtenidos, demostrando así que la posible influencia del pH sobre la absorción transdérmica es despreciable ($p > 0.05$).

Para la realización de los experimentos con promotores químicos se estimó que las soluciones promotoras se preparasen al 5% (v/v) debido a que el efecto promotor no aumenta proporcionalmente con la concentración, sino que tiende a alcanzar un nivel máximo de promoción (Borrás-Blasco *et al.*, 2004) o incluso, en algunos casos, se produce una reducción de la capacidad promotora del compuesto. Además, cuando se utilizan este tipo de compuestos *in vivo*, concentraciones altas de promotor pueden causar problemas como irritación de la piel o toxicidad (Okabe *et al.*, 1990; Kanikkannan y Singh, 2002).

A continuación se muestran los perfiles de absorción obtenidos tras el pretratamiento de 12 horas con los terpenos limoneno y cineol, así como con Azone®:

Tiempo (h)	Qa ± DE ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
1	0.62 ± 0.23
2	1.17 ± 0.11
3	2.46 ± 0.64
4	4.86 ± 1.45
5	6.64 ± 2.52
6	9.62 ± 3.66
7	12.4 ± 3.5
8	14.9 ± 4.7
24	78.6 ± 20.2
25	84.9 ± 20.8
26	91.4 ± 20.5
28	102 ± 24
30	114 ± 26
32	121 ± 26

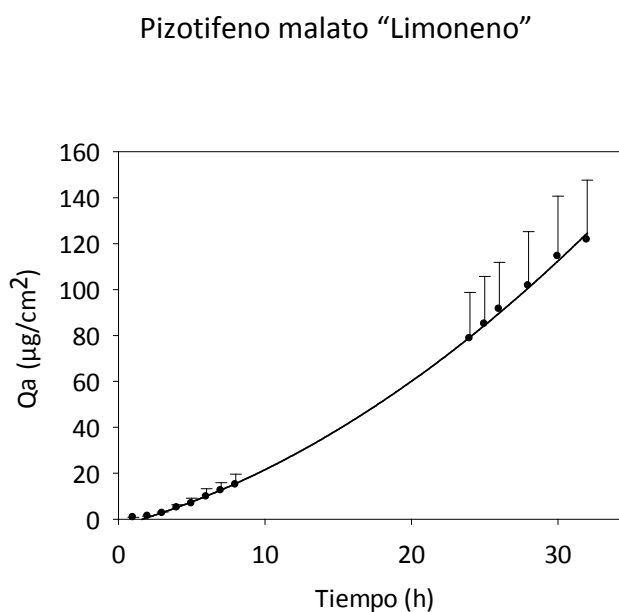


Figura 31. Cantidades medias acumuladas (Qa) de pizotifeno frente al tiempo para el grupo pretratado con **R-(+)-limoneno** (n=3).

Tiempo (h)	Qa ± DE ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
1	1.04 ± 0.01
2	1.73 ± 0.16
3	3.21 ± 0.50
4	5.02 ± 0.49
5	6.74 ± 1.62
6	8.74 ± 1.50
7	10.6 ± 1.1
8	13.4 ± 2.8
24	84.5 ± 13.8
25	90.4 ± 12.6
26	97.0 ± 12.5
28	108 ± 18
30	119 ± 19
32	131 ± 19

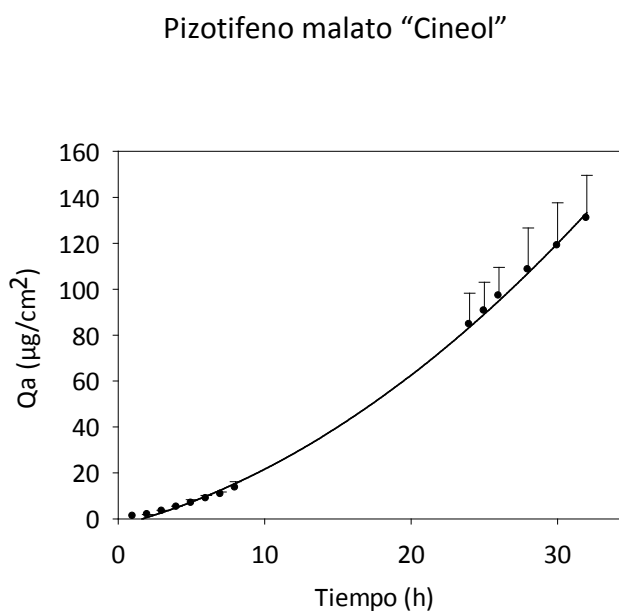


Figura 32. Cantidades medias acumuladas (Qa) de pizotifeno frente al tiempo para el grupo de pretratamiento de la piel con **1,8-Cineol** (n=3).

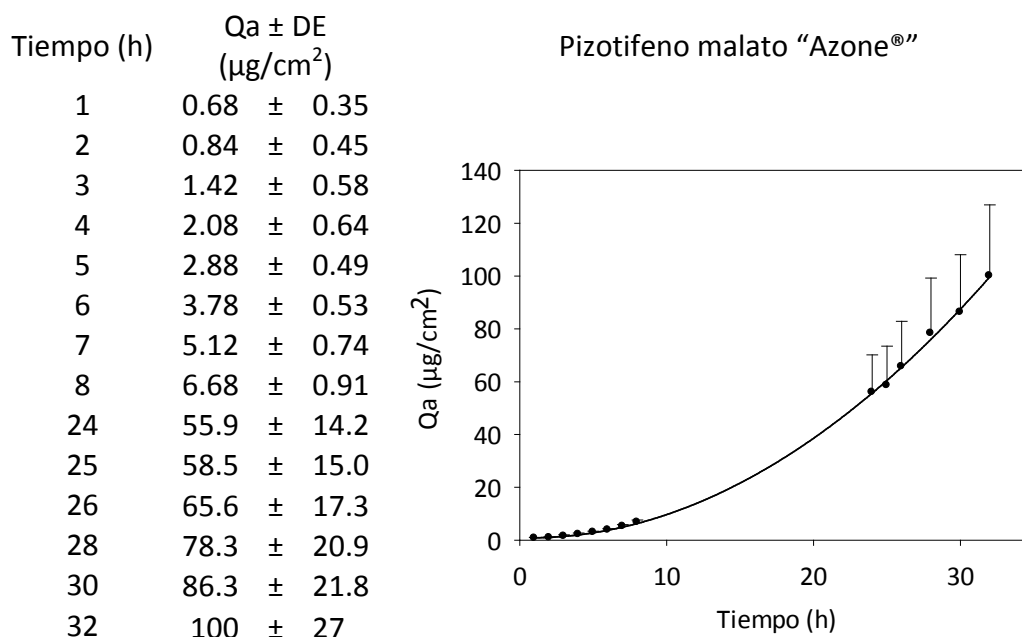


Figura 33. Cantidades medias acumuladas (Qa) de pizotifeno frente al tiempo para el grupo de pretratamiento de la piel con **Azone®** (laurocapram) (n=4).

El conjunto de los perfiles de absorción de las condiciones presentadas hasta este punto, se puede observar en la siguiente figura:

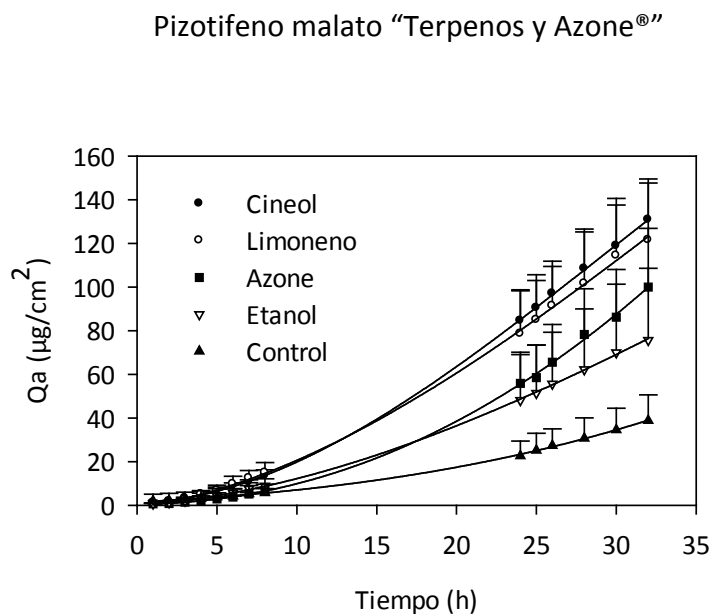


Figura 34. Cantidades acumuladas de pizotifeno malato (\pm DE) en el compartimento receptor frente al tiempo para las condiciones de pretratamiento de la piel con 1,8-cineol, limoneno, Azone® y controles.

Las cantidades acumuladas en el compartimento receptor a las 32 horas fueron de 121 ± 26 , 131 ± 19 y $100 \pm 27 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para limoneno, cineol y Azone®, respectivamente. A pesar del incremento que se aprecia respecto al control, las diferencias son menores de lo que cabría esperar, no llegando a ser significativas ninguna de las 3 condiciones respecto al control vehículo ($p > 0.05$).

Los perfiles de absorción obtenidos en las pieles pretratadas con ácidos grasos se muestran a continuación, en la Figura 35 (ácido decenoico), Figura 36 (ácido oleico), Figura 37 (ácido dodecanoico), Figura 38 (ácido decanoico) y Figura 39 (ácido linoleico).

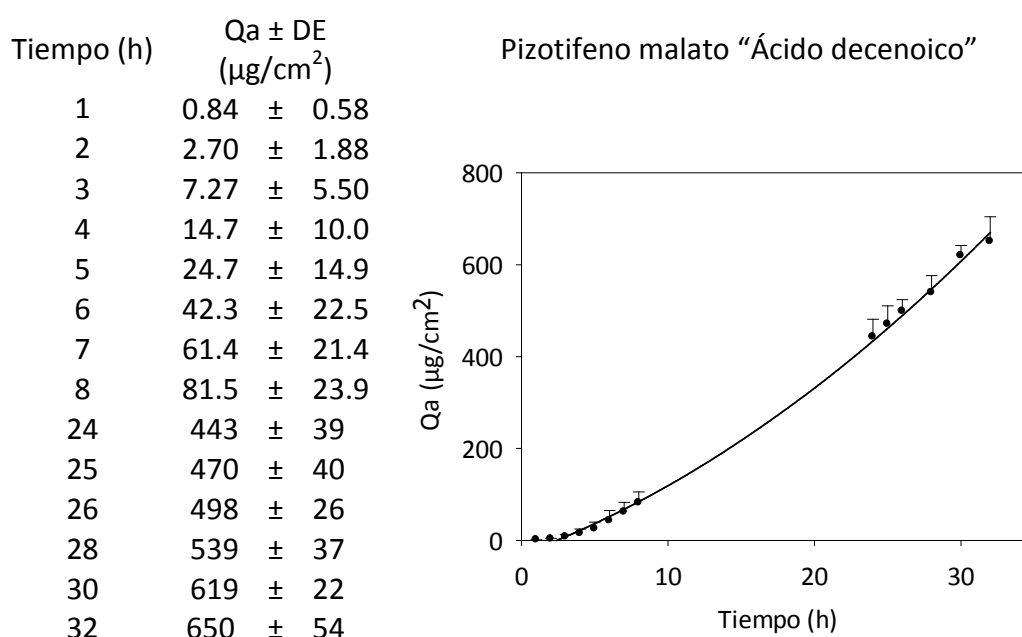


Figura 35. Cantidades medias acumuladas (Q_a) de pizotifeno frente al tiempo para el grupo de pretratamiento de la piel con **ácido decenoico** ($n=3$).

Tiempo (h)	Qa ± DE ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
1	0.73 ± 0.01
2	1.48 ± 0.80
3	3.81 ± 2.59
4	8.58 ± 5.96
5	13.9 ± 10.1
6	21.9 ± 14.6
7	33.8 ± 21.7
8	46.6 ± 26.1
24	294 ± 123
25	321 ± 130
26	336 ± 135
28	387 ± 146
30	428 ± 156
32	469 ± 175

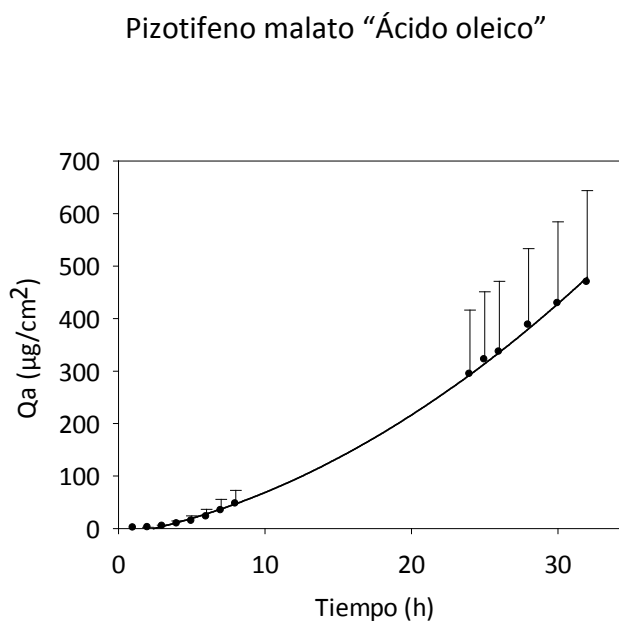


Figura 36. Cantidades medias acumuladas (Qa) de pizotifeno frente al tiempo para el grupo de pretratamiento de la piel con **ácido oleico** (n=6).

Tiempo (h)	Qa ± DE ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
1	1.24 ± 0.44
2	2.36 ± 1.55
3	5.08 ± 2.71
4	9.57 ± 4.56
5	14.9 ± 6.3
6	21.8 ± 8.4
7	30.9 ± 9.9
8	40.2 ± 11.5
24	231 ± 16
25	245 ± 13
26	257 ± 14
28	276 ± 12
30	305 ± 21
32	343 ± 17

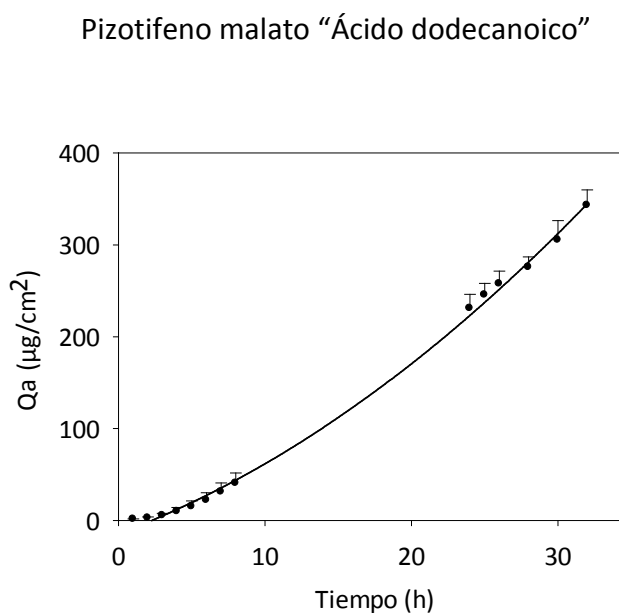


Figura 37. Cantidades medias acumuladas (Qa) de pizotifeno frente al tiempo para el grupo de pretratamiento de la piel con **ácido dodecanoico** (n=4).

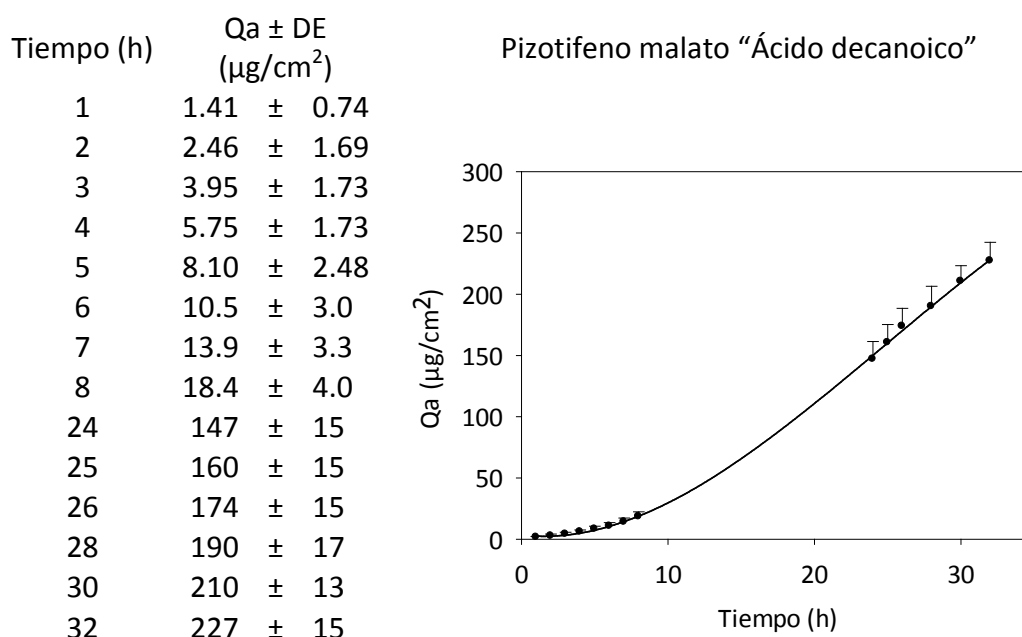


Figura 38. Cantidades medias acumuladas (Qa) de pizotifeno frente al tiempo para el grupo de pretratamiento de la piel con **ácido decanoico** (n=4).

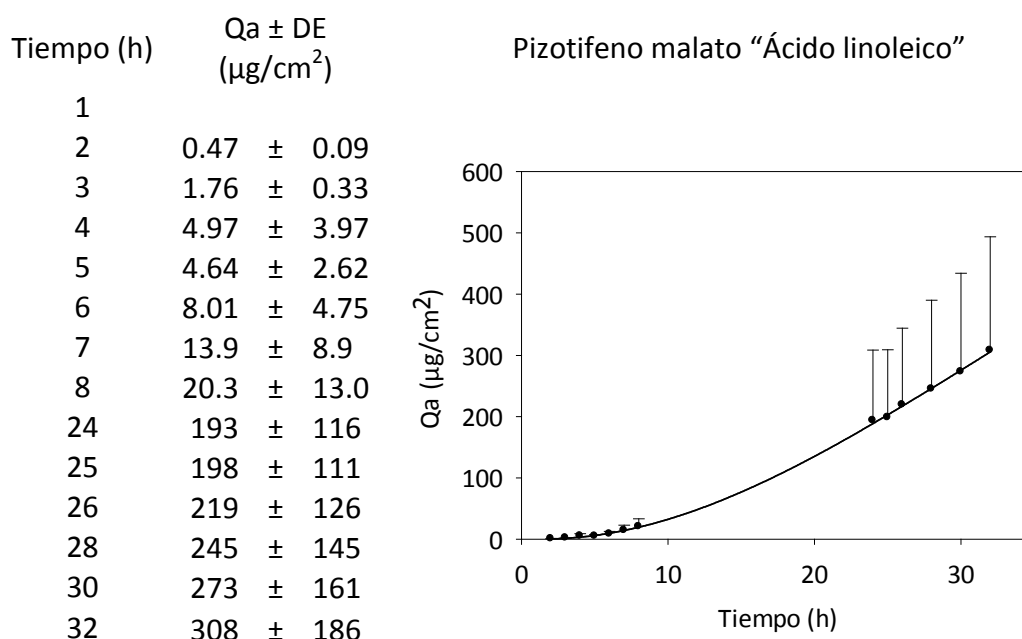


Figura 39. Cantidades medias acumuladas (Qa) de pizotifeno frente al tiempo para el grupo de pretratamiento de la piel con **ácido linoleico** (n=3).

A modo de resumen y para facilitar su comparación, a continuación se detallan los perfiles cinéticos obtenidos tras el pretratamiento de la piel con los ácidos grasos:

Pizotifeno malato “Ácidos grasos”

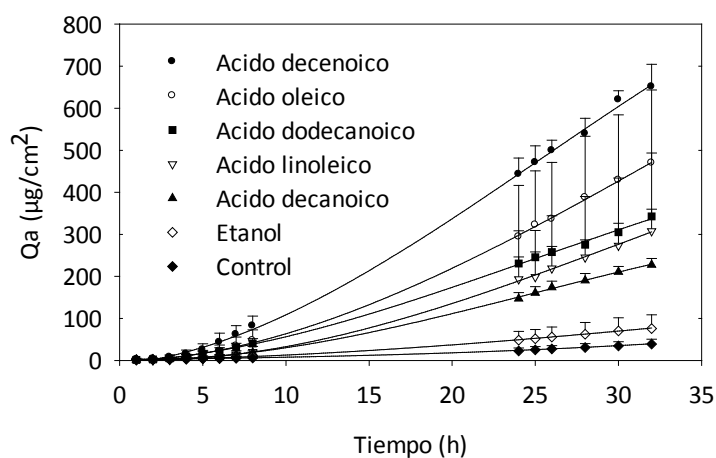


Figura 40. Cantidades acumuladas de pizotifeno malato (\pm DE) en el compartimento receptor frente al tiempo para las condiciones de pretratamiento de la piel con ácidos grasos y controles.

Al comparar las cantidades de pizotifeno acumuladas proporcionadas por los ácidos grasos respecto al control e incluso con el resto de condiciones mencionadas anteriormente, se observó un aumento considerable de las cantidades acumuladas obtenidas tras el pretratamiento con los ácidos grasos. La cantidad acumulada más baja fue la proporcionada por el ácido decanoico ($227 \pm 15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) y la más alta por el ácido decenoico ($650 \pm 54 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), de 5.8 a 16.7 veces la determinada en el control. Todos los pretratamientos de la piel con ácidos grasos proporcionaron un incremento significativo de las cantidades acumuladas de fármaco respecto a control ($p < 0.05$).

En la Figura 41 se recogen los resultados obtenidos en el ensayo en el que se evaluó la utilidad de la iontoforesis para promover la absorción transdérmica del pizotifeno. Se han representado las cantidades acumuladas de ACM y de pizotifeno en el compartimento receptor por unidad de área, cuantificadas a cada tiempo, junto con las cantidades de pizotifeno obtenidas en los ensayos de difusión pasiva.

Pizotifeno	
Tiempo (h)	Qa ± DE ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
2	3.87 ± 1.19
3	7.51 ± 0.76
4	11.5 ± 3.3
5	18.3 ± 4.3
6	27.6 ± 4.8
7	34.3 ± 4.8
8	41.9 ± 4.8

ACM	
Tiempo (h)	Qa ± DE ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
2	3.49 ± 1.03
3	5.70 ± 1.96
4	8.50 ± 2.29
5	11.1 ± 3.2
6	13.7 ± 3.5
7	17.3 ± 4.8
8	20.3 ± 5.1

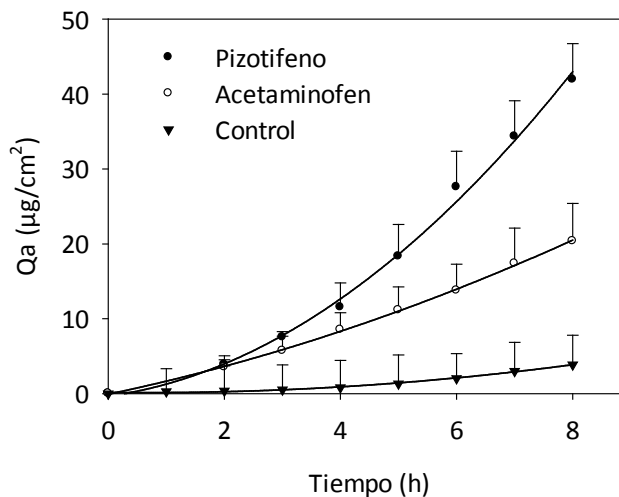


Figura 41. Cantidades medias acumuladas (Qa) frente al tiempo para el experimento de iontoforesis ($0.5 \text{ mA}/\text{cm}^2$) de pizotifeno y ACM y el experimento de difusión pasiva de pizotifeno ($n=5$).

En la gráfica obtenida con los resultados de los ensayos de iontoforesis (Figura 41) se puede advertir el notable incremento de la absorción transdérmica durante las 8 horas que se está aplicando la corriente, siendo la cantidad media de pizotifeno acumulada en el compartimento receptor con iontoforesis a $0.5 \text{ mA}/\text{cm}^2$, de $41.9 \pm 4.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y en la condición control de $5.72 \pm 3.94 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p < 0.05$). Sin embargo, al comparar las cantidades acumuladas obtenidas mediante iontoforesis y promotores químicos, la iontoforesis no resultó estadísticamente superior con respecto a ninguna de las condiciones estudiadas ($p > 0.05$). No obstante, la variabilidad obtenida mediante la iontoforesis fue bastante reducida, lo que demuestra que esta técnica se ve afectada en menor medida por la estructura de la piel es decir, la absorción queda en su mayor parte determinada por la corriente eléctrica empleada.

Para determinar si durante la absorción facilitada por iontoforesis, se produjo alguna alteración en la dirección del flujo de disolvente, provocada por la acumulación

de sustancias químicas cargadas en la piel, se calculó el factor de inhibición. El valor obtenido fue de 1.58, indicando que el pizotifeno produjo un ligero efecto en la permeabilidad selectiva de la piel a 0.5 mA/cm^2 , y por ello se reduce la absorción del ACM en presencia del pizotifeno. Este valor es menor que el obtenido en otros estudios de absorción transdérmica con iontoforesis con proteínas como el factor de crecimiento de fibroblastos o FGF, que mostró un factor de inhibición de 4.22 a 0.5 mA/cm^2 (Dubey *et al.*, 2011); o fármacos como vaporeotida, que obtuvo un factor de inhibición de casi 50 a la misma intensidad de corriente (Schuetz *et al.*, 2005). Si el factor de inhibición es elevado indica que conforme el xenobiótico es transportado a través de la piel por la corriente, la membrana sufre una neutralización de su carga negativa y en consecuencia un incremento de la inhibición de la electroosmosis. Así pues, puede considerarse que cuando se aplica la iontoforesis, la eficacia de esta técnica no se ve prácticamente afectada.

De los dos promotores de la absorción transdérmica de pizotifeno ensayados los más eficaces tras el pretratamiento de la piel han sido los ácidos grasos decenoico y oleico y por ello se decidió estudiar su efecto al incorporarlos por separado en la formulación de los STAT. A continuación, en la Figura 42, Figura 43 y Figura 44, se encuentran representadas las cantidades acumuladas para las condiciones ensayadas con los STATs (control y con promotores químicos).

Tiempo (h)	Qa ± DE (µg/cm ²)
2	1.61 ± 0.01
4	1.69 ± 0.01
6	1.76 ± 0.01
8	2.52 ± 0.80
24	11.5 ± 1.1
26	12.5 ± 0.8
28	13.5 ± 1.0
30	15.6 ± 2.4
32	16.4 ± 2.3
48	26.7 ± 4.2
50	27.6 ± 3.9
52	28.7 ± 4.0
54	29.5 ± 5.4
56	31.3 ± 4.7

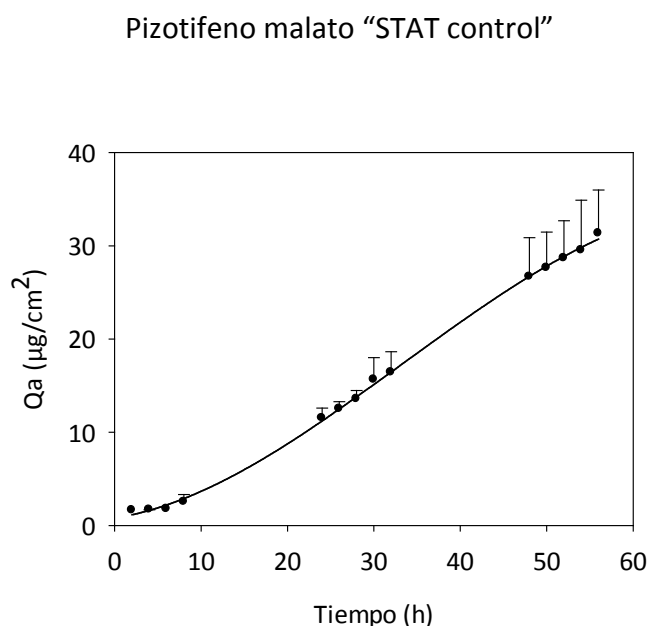


Figura 42. Cantidades medias acumuladas (Qa) de pizotifeno frente al tiempo para el grupo de **STAT control** (n=4).

Tiempo (h)	Qa ± DE (µg/cm ²)
2	2.21 ± 0.22
4	4.31 ± 1.11
6	7.78 ± 2.31
8	12.3 ± 4.4
24	67.9 ± 18.6
26	73.8 ± 18.0
28	80.9 ± 19.7
30	84.9 ± 19.7
32	96.4 ± 21.2
48	133 ± 32
50	140 ± 29
52	142 ± 33
54	148 ± 30
56	155 ± 30

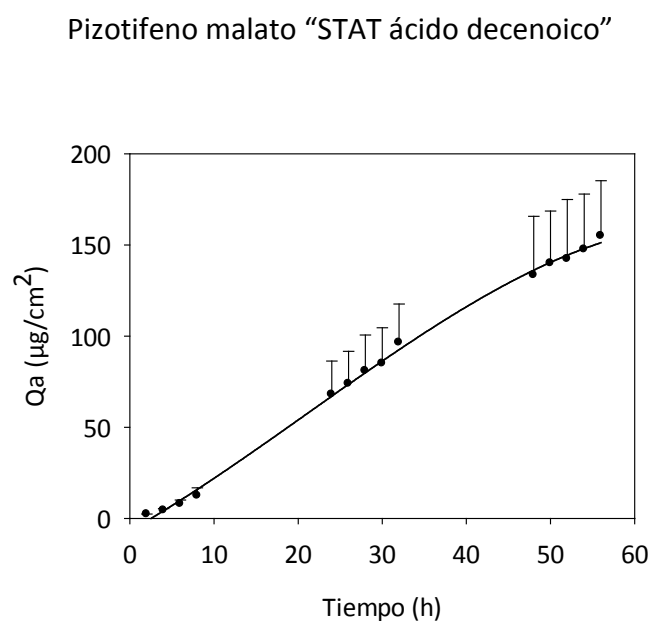


Figura 43. Cantidades medias acumuladas (Qa) de pizotifeno frente al tiempo para el grupo de **STAT ácido decenoico** (n=4).

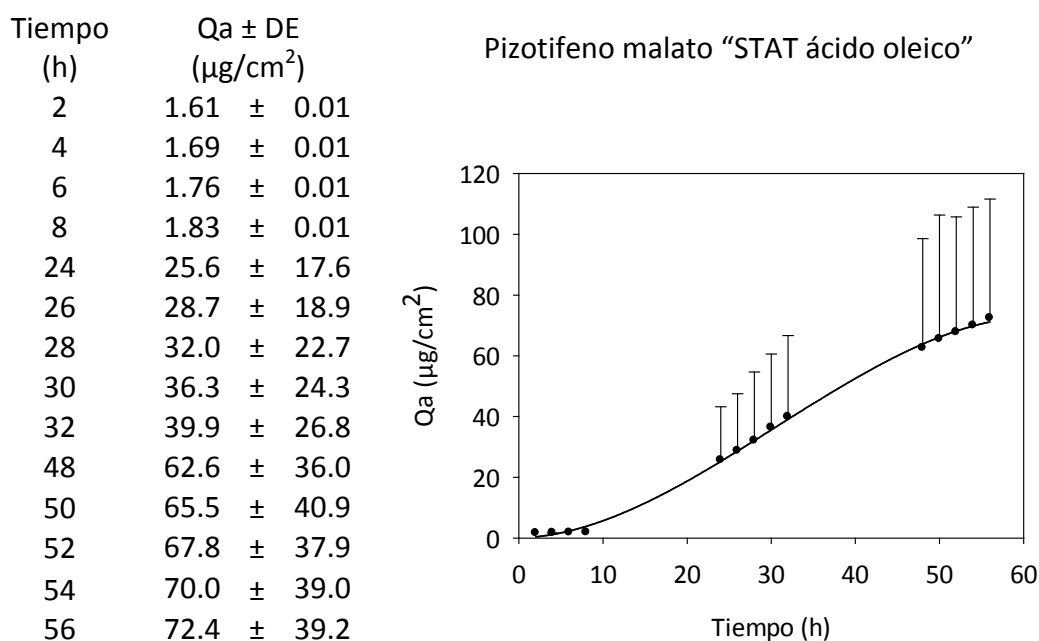


Figura 44. Cantidades medias acumuladas (Qa) de pizotifeno frente al tiempo para el grupo de **STAT ácido oleico** (n=3).

En la Figura 45 se pueden observar los perfiles cinéticos obtenidos en los ensayos con STAT:

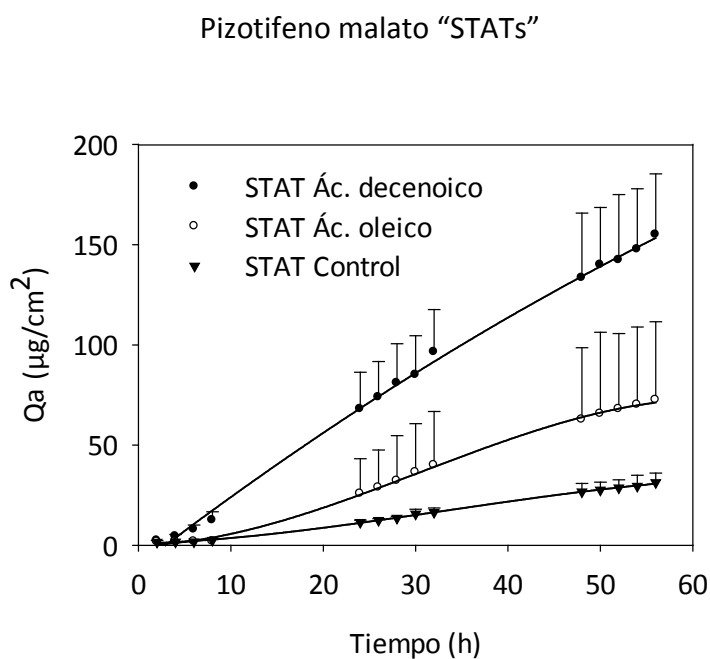


Figura 45. Cantidades acumuladas de pizotifeno malato (\pm DE) en el compartimento receptor frente al tiempo para las condiciones STAT con promotor y control.

Las cantidades de pizotifeno acumuladas en el compartimento receptor al final del experimento fueron de 31.3 ± 4.7 , 155 ± 30 y $72.4 \pm 39.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para el STAT control, decenoico y oleico, respectivamente. Las cantidades acumuladas de pizotifeno en el STAT formulado con ácido decenoico fueron estadísticamente superiores al STAT control ($p < 0.05$).

A continuación, en la Tabla 13 y la Tabla 14, se muestra una recopilación de los flujos transdérmicos de pizotifeno obtenidos en todas las condiciones ensayadas.

Promotor	$J_{ss} \pm DE$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$)
Control (n=8)	1.63 ± 0.76
Etanol (Vehículo) (n=8)	3.39 ± 1.45
1,8-cineol (n=3)	5.71 ± 1.23
Limoneno (n=3)	4.73 ± 1.31
Azone® (n=4)	6.66 ± 2.02
Ac. decenoico (n=3)	24.7 ± 1.8
Ac. decanoico (n=4)	9.51 ± 1.05
Ac. dodecanoico (n=4)	12.6 ± 0.7
Ac. oleico (n=6)	20.6 ± 8.0
Ac. linoleico (n=3)	14.2 ± 9.0
Iontoforesis ($0.5 \text{ mA}/\text{cm}^2$) (n=5)	7.35 ± 0.34
STAT Control (n=4)	0.60 ± 0.18
STAT Ac. decenoico (n=4)	3.41 ± 0.44
STAT Ac. oleico (n=3)	1.81 ± 1.20

Tabla 13. Flujo transdérmico de pizotifeno calculado para cada condición ensayada.

J (p<0.05)	Control	Etanol	Cineol	Limoneno	Azone®	Ác. decenoico	Ác. Decanoico	Ác. dodecanoico	Ác. oleico	Ác. linoleico	Iontoforesis	STAT control	STAT Ác. decenoico	STAT Ác. oleico
Control						D	D	D			D			
Etanol						D	D	D			D	D		
Cineol						D	D	D			D			
Limoneno						D		D						
Azone®						D								
Ác. Decenoico							D	D			D	D	D	D
Ác. Decanoico												D	D	D
Ác. Dodecanoico												D	D	D
Ác. Oleico												D		
Ác. Linoleico														
Iontoforesis												D	D	D
STAT control													D	
STAT Ác. Decenoico														D
STAT Ác. Oleico														

Tabla 14. Análisis estadístico del flujo transdérmico “J”, donde “D” significa que se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

Como se puede observar en la Tabla 13, el flujo en estado estacionario para la condición **control** correspondiente a la difusión pasiva del pizotifeno fue de $1.63 \pm 0.76 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$, mientras que para el etanol fue de $3.39 \pm 1.45 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$, no obteniendo diferencias significativas entre sí (p>0.05). Este valor de flujo tan bajo hizo necesaria la consideración de estrategias promotoras de la absorción transdérmica que ayudasen a alcanzar concentraciones sistémicas eficaces después de su aplicación por esta vía.

A pesar de la capacidad del **etanol** para aumentar la penetración a través del estrato córneo (Berner B, 1995) y alterar la organización de los lípidos intercelulares incrementando de este modo la permeabilidad de la piel (Megrab *et al.*, 1995); en el presente estudio, el etanol por sí sólo, no fue suficiente para descartar el uso de otros promotores de absorción transdérmica. Los resultados obtenidos para la condición “control vehículo” realizados mediante pretratamiento de la piel con etanol, fueron similares estadísticamente al control. De esta forma, quedó demostrado que el etanol, utilizado como disolvente de los promotores químicos, no fue eficaz como promotor de absorción transdérmica de pizotifeno.

Al observar el flujo transdérmico proporcionado por las condiciones pretratadas con los terpenos **limoneno** y **cineol** y con **Azone**[®], los flujos obtenidos fueron de 4.73 ± 1.31 , 5.71 ± 1.23 y 6.66 ± 2.02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$, respectivamente. No apreciándose diferencias significativas entre estas condiciones, ni tampoco con respecto al flujo transdérmico de la condición control ($p > 0.05$).

El limoneno, perteneciente al grupo de los terpenos, está presente en muchos aceites vegetales y es incorporado a un gran abanico de productos de consumo. Es por ello que este grupo ha sido objeto de numerosos estudios acerca de su seguridad. Recientemente ha sido publicado un estudio de toxicidad del limoneno aplicado de forma tópica, en el cual queda demostrado su bajo potencial tóxico y que abre las puertas a su incorporación en productos de aplicación sobre la piel, como fragancias o como promotores de la absorción transdérmica (Api *et al.*, 2013). A pesar de que ha sido demostrado un efecto sinérgico sobre la absorción transdérmica al administrar D-limoneno junto con etanol (Osamu Shirakura *et al.*, 1995), el flujo transdérmico observado en los estudios no supuso un incremento significativo en la absorción transdérmica del pizotifeno ($p > 0.05$).

Los estudios realizados con los **ácidos grasos** provocaron los mayores valores de flujo transdérmico de pizotifeno de entre todos los promotores químicos estudiados (Tabla 13). Los ácidos grasos decenoico, decanoico y dodecanoico presentaron diferencias significativas en el flujo transdérmico respecto al control ($p < 0.05$), proporcionando un efecto promotor de 15.2 ± 7.2 (ácido decenoico), 5.83 ± 2.80 (ácido decanoico) y 7.74 ± 3.66 (ácido dodecanoico). A pesar de que el ácido oleico presentó un flujo transdérmico de 20.6 ± 8.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$, no se hallaron diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$).

Una de las hipótesis más aceptadas en la actualidad acerca del mecanismo por el cual los ácidos grasos producen su efecto promotor, corresponde a la teoría llamada "lipid-protein-partitioning" (LPP) (Barry, 1988; Williams y Barry, 1991a, b; Barry, 2001). Esta teoría divide la acción de estas sustancias en 3 mecanismos principales: alteración de la estructura de la bicapa lipídica intercelular; interacción con las proteínas intracelulares; y mejora del reparto del fármaco o solvente en el estrato córneo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio presentan cierta similitud con los estudios de modulación de la barrera de la piel con ácidos grasos llevado a cabo por Tanojo et al. (Tanojo Hanafi *et al.*, 1997; Tanojo *et al.*, 1999). En su trabajo, dividía los ácidos grasos en tres grupos: saturados, mono-insaturados y poli-insaturados. Dentro del grupo de los ácidos grasos saturados, aquellos con 9 o 10 átomos de carbono resultaron ser mejores promotores debido a que alcanzaron el grado óptimo de reparto entre los ácidos grasos puros y los lípidos de la piel. En el grupo de los mono-insaturados, su efecto se debía a la perturbación de la organización lipídica de la piel formando “hoyos” o “rizos”. En otros estudios similares publicados en la literatura científica (Aungst *et al.*, 1986; Aungst, 1989; Bouwstra *et al.*, 1989), la capacidad promotora de los ácidos grasos es óptima cuando presentan una cadena alquílica de 10 a 12 carbonos de longitud o 18 carbonos y una insaturación.

Los ácidos grasos utilizados como promotores químicos de absorción transdérmica del pizotifeno pueden dividirse en tres grupos (Tabla 3): ácidos grasos no saturados, ácido decanoico y el dodecanoico; mono-insaturados, ácido decenoico y el oleico, los cuales tienen una insaturación en la posición 9 de la cadena carbonada; y poli-insaturados, ácido linoleico, que tiene dos insaturaciones en las posiciones 9 y 12.

Se observó que al utilizar como promotores ácidos grasos con la misma longitud de cadena carbonada y que presentaban diferencias en cuanto a la presencia o ausencia de insaturaciones, los valores de flujo en el estado estacionario se incrementan por la presencia de insaturación en la posición 9 del ácido graso. Esta insaturación podría ser clave en el efecto promotor de absorción transdérmica desarrollado para el pizotifeno malato. Al comparar los flujos obtenidos por el ácido decenoico y decanoico, cuya única diferencia es la presencia de la insaturación *cis* en la posición 9, el primero presentó un flujo en el estado estacionario 2.5 veces mayor respecto al segundo. Por otra parte, los ácidos grasos oleico y linoleico tienen la misma longitud de cadena y una insaturación en el carbono 9, pero además el ácido linoleico presenta una segunda insaturación en el carbono 12. En este caso, el ácido oleico proporcionó un flujo transdérmico 1.45 veces mayor que el linoleico (Figura 46).

Al estudiar el flujo de absorción transdérmica proporcionado tras el pretratamiento con ácidos grasos, no se encontraron diferencias significativas entre los ácidos decanoico (10:0) y dodecanoico (12:0), ni entre los ácidos decenoico (10:1) y oleico (18:1) ($p > 0.05$). No obstante, en la Figura 46 se puede observar la tendencia decreciente del flujo a la vez que se reduce la longitud de la cadena carbonada, a excepción del (10:1), por lo que puede considerarse que la longitud de la cadena hidrocarbonada resulta relevante al estudiar el efecto de este grupo de promotores.

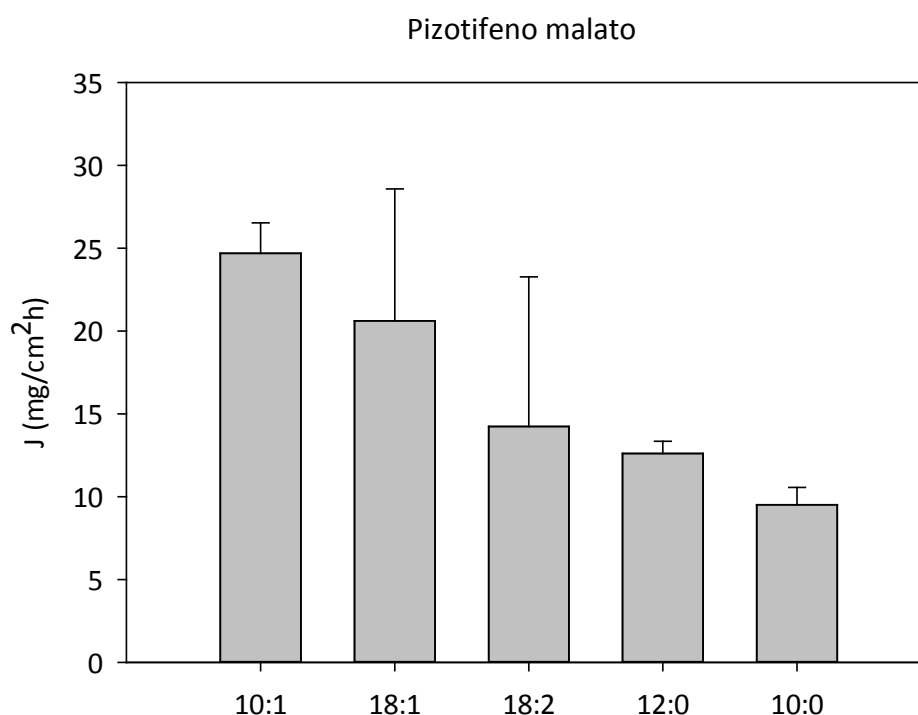


Figura 46. Flujos medios \pm DE proporcionados por los ácidos grasos, en función de la longitud de la cadena alquílica y del número de insaturaciones (ácido decenoico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido dodecanoico y ácido decanoico).

Al estimar el flujo obtenido en el estado estacionario, este valor corresponde a $7.35 \pm 0.34 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$. La iontoforesis produjo un valor de flujo 4.5 veces mayor que el control durante las primeras 8 horas, así pues el efecto promotor desarrollado por esta técnica es inferior al desarrollado por otras estrategias promotoras, como los ácidos grasos, pero superior al resto de promotores químicos ensayados.

El flujo transdérmico de pizotifeno desde las formulaciones se calculó de forma separada en el tramo intermedio (de 24 a 32 horas) y en el final (de 48 a 56 horas), no encontrando diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$), lo que indica que una vez alcanzado el estado estacionario el flujo se mantuvo constante hasta el final del experimento. Todos los STAT no presentaron las mismas características de liberación, se encontraron diferencias entre los flujos transdérmicos del STAT con decenoico ($3.41 \pm 0.44 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$) y STAT control ($0.60 \pm 0.18 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$), y del STAT decenoico y STAT oleico ($1.81 \pm 1.20 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$) ($p < 0.05$).

Los STATs se mantuvieron en contacto con la piel durante 56 horas y en esta ocasión se trató de un cotratamiento con los promotores de absorción en lugar del pretratamiento de la piel realizado previamente con la disolución de pizotifeno. Los diferentes parámetros calculados para caracterizar el proceso de absorción transdérmica se pueden ver en la Tabla 13, la Tabla 15 y la Tabla 16. Como era de esperar, los flujos transdérmicos obtenidos fueron menores que los obtenidos con pretratamiento y soluciones.

La baja solubilidad del pizotifeno en solución acuosa y la voluntad de utilizar una formulación de STAT sencilla supuso un reto en el desarrollo de la misma. Finalmente, la concentración de fármaco en la formulación seleccionada fue de $42.5 \text{ mg}/\text{cm}^3$, que supone 0.64 mg de pizotifeno malato por cada cm^2 de STAT, frente a los 2.40 mg (1 mL de solución de $2.40 \text{ mg}/\text{mL}$) que corresponde a la concentración de la solución utilizada para rellenar el compartimento dador en los ensayos con soluciones. Esta diferencia de cantidad de pizotifeno entre los estudios en solución y los estudios con la formulación, la realización del pretratamiento o el cotratamiento con promotores y el control que ejerce la formulación diseñada en la liberación, hacen difícil comparar las cinéticas de absorción obtenidas en los dos tipos de ensayos. No obstante, como es de esperar, si se comparan los flujos transdérmicos de los ensayos realizados con solución control y con STAT control, el último es 2 veces menor. De la misma forma, al comparar los flujos transdérmicos obtenidos con los STAT utilizando los ácidos decenoico y oleico y el STAT control, estos fueron 5.7 y 3 veces mayores, respectivamente. Si bien el efecto promotor del ácido decenoico también es superior en las formulaciones, se vio reducido casi 3 veces respecto a su utilización en solución.

Asimismo, la cantidad de fármaco retenido en piel en los ensayos con los STAT de oleico, fue significativamente inferior a la obtenida en los ensayos en soluciones ($p < 0.05$).

El tiempo de latencia (t_0), que resulta del ajuste de la cinética de difusión a la ecuación de Scheuplein y que corresponde al tiempo que se tarda en alcanzar el estado estacionario, ayuda a completar la caracterización de la absorción del fármaco a través de la piel. Los resultados obtenidos para cada una de las condiciones estudiadas, incluyendo control y control de vehículo, pretratamiento con promotores químicos y STAT, se muestran en la Tabla 15.

Promotor	$t_0 \pm DE$ (h)
Control (n=8)	7.59 \pm 6.94
Etanol (Vehículo) (n=8)	5.39 \pm 2.53
1,8-cineol (n=3)	6.19 \pm 0.66
Limoneno (n=3)	6.21 \pm 3.42
Azone® (n=4)	18.1 \pm 1.5 ¹
Ac. decenoico (n=3)	5.67 \pm 1.98
Ac. decanoico (n=4)	7.98 \pm 2.49
Ac. dodecanoico (n=4)	5.50 \pm 1.76
Ac. oleico (n=6)	9.21 \pm 4.93
Ac. linoleico (n=3)	10.4 \pm 2.8
STAT control (n=4)	5.87 \pm 3.72
STAT Ac. decenoico (n=4)	6.41 \pm 0.70
STAT Ac. oleico (n=3)	10.2 \pm 1.3

Tabla 15. Tiempo de latencia de pizotifeno calculado para cada condición ensayada. (1) diferencias estadísticamente significativas respecto de etanol (control de vehículo) ($p < 0.05$).

Como se puede observar en la Tabla 15, el periodo de latencia calculado para las diferentes condiciones ensayadas varió de 5.5 a 18.1 horas. El periodo de latencia más alto se obtuvo para la condición de pretratamiento con Azone® (18.1 \pm 1.5 horas). A pesar de que el pretratamiento con promotores químicos produjo diferencias significativas del flujo transdérmico respecto al control (Tabla 14), no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en el periodo de latencia para las condiciones ensayadas, excepto la de Azone® en el que se observó un aumento significativamente superior al obtenido en la condición control vehículo ($p < 0.05$). El

incremento del periodo de latencia tras el pretratamiento con Azone® se ha observado en estudios de absorción transdérmica de sumatriptán realizados en el grupo de investigación (Balaguer Fernandez, 2010). En estos estudios se comprobó que al incorporar Azone® al 5 o al 10% (m/m) a los STAT, se encontraban diferencias estadísticamente significativas en los flujos transdérmicos respecto al control, aunque también un aumento del periodo de latencia, como sucede en los estudios realizados con pizotifeno. Debido a este aumento del período de latencia, a pesar de que Azone® presentó el mayor flujo, las cantidades acumuladas durante el tiempo de ensayo con cineol y limoneno fueron más elevadas.

Finalmente, las cantidades de pizotifeno malato retenidas en la piel, tras finalizar los experimentos se presentan en la Tabla 16. Se encuentran incluidas todas las condiciones estudiadas: control, control vehículo, pretratamiento con promotores químicos, iontoforesis y STAT.

Como se puede comprobar en la Tabla 16, la cantidad de pizotifeno retenido en piel varía de acuerdo con el pretratamiento de la piel con los distintos promotores químicos. El pretratamiento de la piel con 1,8-cineol, limoneno y Azone® no produjo un incremento estadísticamente significativo de las cantidades acumuladas de fármaco retenido en piel respecto al control. Sin embargo, el pretratamiento de la piel con los ácidos decanoico, linoleico y oleico produjo un incremento estadísticamente significativo de la cantidad de pizotifeno retenido en piel respecto al control ($p < 0.05$).

Promotor	$Q_r \pm DE$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
Control (n=8)	40.1 \pm 11.1
Etanol (Vehículo) (n=8)	41.8 \pm 27.0
1,8-cineol (n=3)	51.7 \pm 4.1
Limoneno (n=3)	61.1 \pm 14.2
Azone® (n=4)	61.7 \pm 10.4
Ac. decenoico (n=3)	152 \pm 81
Ac. decanoico (n=4)	157 \pm 28 ^{1,2}
Ac. dodecanoico (n=4)	102 \pm 25
Ac. oleico (n=6)	249 \pm 64 ^{1,2}
Ac. linoleico (n=3)	196 \pm 30 ^{1,2}
Iontoforesis (0.5 mA/cm ²) (n=5)	41.9 \pm 4.8
STAT control (n=4)	27.5 \pm 7.4
STAT Ac. decenoico (n=4)	44.1 \pm 3.8
STAT Ac. oleico (n=3)	37.5 \pm 15.0

Tabla 16. Cantidad de pizotifeno retenida en la piel (Q_r) para cada condición ensayada. (1) diferencias estadísticamente significativas respecto del control ($p < 0.05$); (2) diferencias estadísticamente significativas respecto de etanol (control de vehículo) ($p < 0.05$).

Como cabía esperar, los ácidos grasos que ejercieron un mayor efecto promotor proporcionaron valores más elevados de fármaco acumulado en la piel, que el resto de promotores químicos. Estos resultados parecen evidenciar que este grupo de sustancias promotoras incrementan la difusión del fármaco a través de la piel gracias a que afectan al reparto del pizotifeno en el tejido, de acuerdo con la teoría “lipid-protein-partitioning” (Barry, 1988; Williams y Barry, 1991a, b; Barry, 2001). La cantidad retenida en piel proporcionada por los ácidos grasos fue entre 3 y 6 veces mayores que el control.

1.5. Caracterización de los STAT

Los STAT deben lograr una liberación fácil del “liner” o lámina de protección, rápida afinidad por la superficie de la piel, adherencia, cohesión (persistencia en la

zona de aplicación) y en el momento de su retirada debe ser fácil y limpia, sin dejar restos de la formulación ni provocar irritación. Estas propiedades pueden y suelen variar para la misma formulación con diferentes principios activos, lo cual hace difícil fijar valores de referencia, por este motivo la caracterización suele tener fines comparativos o utilizarse como control de calidad de las formulaciones.

También es importante determinar en la formulación la estabilidad, la homogeneidad y el grado de humedad final, ya que hacen referencia a la velocidad de desecación y el momento más adecuado para el almacenamiento de la formulación, así como sobre la captación de agua posterior, la elasticidad o la resistencia a la rotura. Todos estos parámetros ayudan a conocer el comportamiento de la formulación para adecuarla a su uso en la práctica.

Visualmente las formulaciones desarrolladas fueron transparentes, homogéneas, sin imperfecciones o burbujas. Además fueron flexibles y tuvieron buena adhesión en contacto con la piel. El grosor medio de los STATs formulados fue de 0.15 ± 0.01 mm para el STAT control, 0.14 ± 0.01 mm para el STAT ácido decenoico y de 0.14 ± 0.05 mm para el STAT de ácido oleico. Estas características lo hacen una formulación cómoda, fácil de usar y discreta.

El análisis de la **morfología externa** de los STAT de pizotifeno realizado mediante la visualización de la formulación bajo un microscopio óptico se puede observar en la Figura 47 (STAT control), Figura 48 (STAT ácido decenoico) y Figura 49 (STAT ácido oleico), tomadas tras el secado de los STAT a temperatura ambiente. En las imágenes no se aprecia cristalización del principio activo, ni parece que la incorporación de los promotores a la formulación, en lugar del etanol, modifique la estructura matricial de los STAT estudiados.

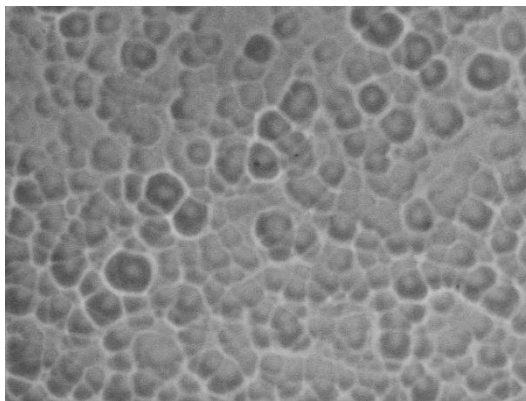


Figura 47. Fotografía realizada con microscopio óptico a 20X del STAT control de pizotifeno.

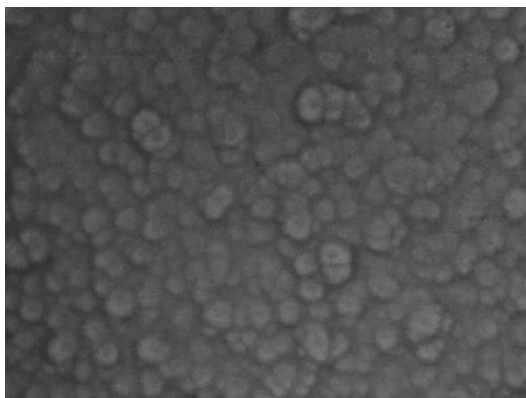


Figura 48. Fotografía realizada con microscopio óptico a 20X del STAT ácido decenoico de pizotifeno.

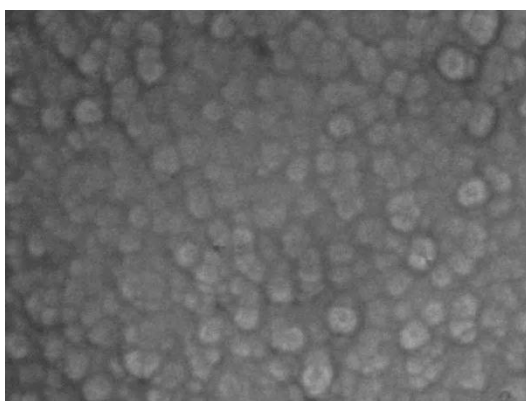


Figura 49. Fotografía realizada con microscopio óptico a 20X del STAT ácido oleico de pizotifeno.

Mediante esta prueba se puede determinar la presencia o ausencia de cristales en la formulación, lo que indicaría una mala disolución o precipitación del principio activo.

El **ensayo de homogeneidad** realizado para cada formulación desarrollada se llevó a cabo tomando muestras aleatoriamente de diferentes partes del STAT para asegurar que el STAT formulado tenía la misma cantidad de fármaco en todos sus puntos. Al no encontrarse diferencias significativas entre las diferentes partes del STAT, se consideró que las formulaciones eran homogéneas ($p < 0.05$);).

El **estudio de estabilidad** de los STATs se efectuó 1 mes a partir del día de fabricación, por medio del análisis de la cantidad de pizotifeno en los STATs tras ese periodo. Ninguna de las concentraciones obtenidas fue inferior al 90%, por lo que se consideró que las formulaciones eran estables durante el periodo de tiempo estudiado ($p < 0.05$).

Para el estudio de la **desección** de los STATs, se recortaron cuadrados de 1 cm^2 que se mantuvieron en una estufa hasta que su peso se mantuvo constante, entonces se dejaron bajo condiciones ambientales durante 2 días para determinar la adaptabilidad de la formulación. En la primera parte del experimento de desecación, la pérdida de peso fue de aproximadamente el 26, 28 y 30% para los STAT control, ácido decenoico y oleico, respectivamente. Asimismo no se apreció una recuperación significativa del peso después de sacarlos de la estufa.

Los estudios de **humectación** duraron 6 días durante los cuales las muestras de STAT se mantuvieron bajo un ambiente de humedad elevado y se fueron pesando hasta que el peso se mantuvo constante. Las formulaciones mostraron un incremento del 7.9, 3.5 y del 6.6% para STAT control, ácido decenoico y oleico, respectivamente. Tras 3 días fuera del ambiente húmedo, los valores de humectación obtenidos fueron de 6.1, -0.2 y 4.0% respecto al inicial. Estos resultados muestran que las formulaciones desarrolladas se adaptan al medio externo adecuadamente, presentan una respuesta débil a los diferentes ambientes estudiados y una recuperación moderada al estado inicial.

Para estudiar las **propiedades mecánicas** de los STAT se estudiaron 2 parámetros: la elongación hasta rotura (Figura 50) y la resistencia máxima o resistencia a la tracción (Figura 51).

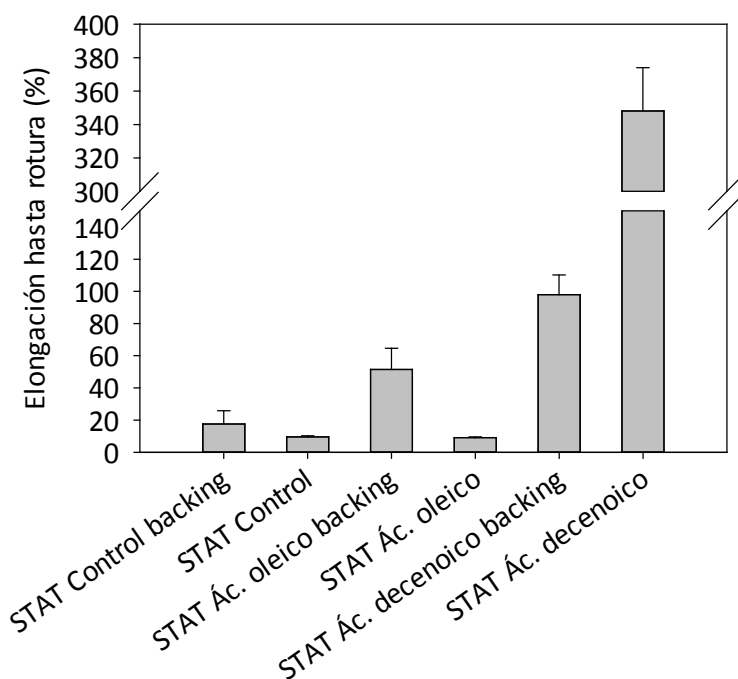


Figura 50. Elongación hasta rotura en porcentaje de los STAT ensayados (media \pm DE).

Como puede observarse en la Figura 50, la presencia del “backing” (lámina de soporte) en general proporcionó al STAT un incremento en la elongación hasta rotura respecto a cada sistema, excepto para el STAT de ácido decenoico.

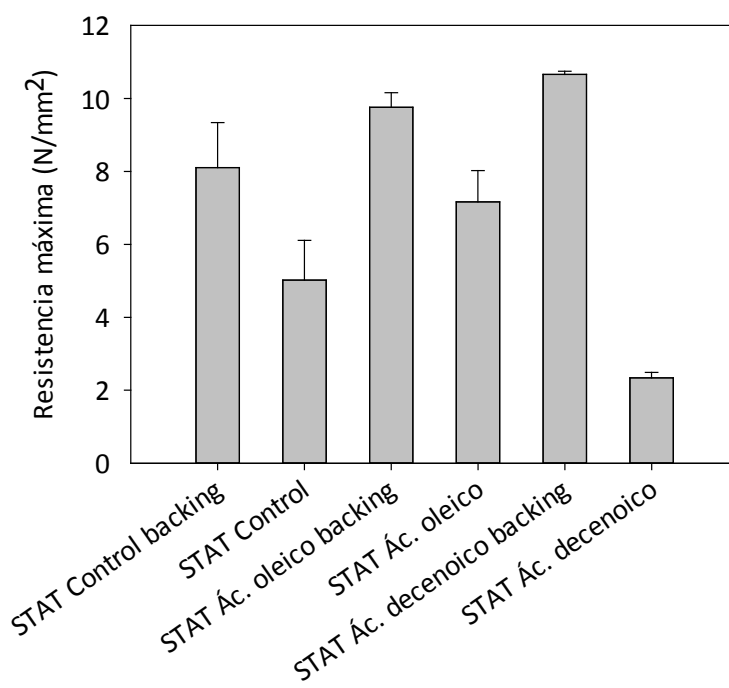


Figura 51. Resistencia a la rotura en de los STAT ensayados (media \pm DE).

Por su parte, la resistencia máxima mostrada en la Figura 51, aumentó en todos los sistemas cuando se incorporó el backing. En general, los valores obtenidos fueron moderadamente altos, esto puede observarse al comparar los resultados obtenidos con otras formulaciones de composición similar (Shidhaye *et al.*, 2008; Balaguer-Fernandez *et al.*, 2010). Probablemente es debido a la elevada concentración de propilenglicol utilizada.

El STAT que incorpora ácido decenoico presentó mucha más elongación hasta rotura y una resistencia inferior a los demás, lo que es representativo del comportamiento plástico de este sistema, superior al de los restantes.

Para estudiar la bioadhesión de las formulaciones se calcularon el trabajo de adhesión (mJ) y la fuerza de desprendimiento máxima (N). Los resultados, se muestran en la siguiente figura:

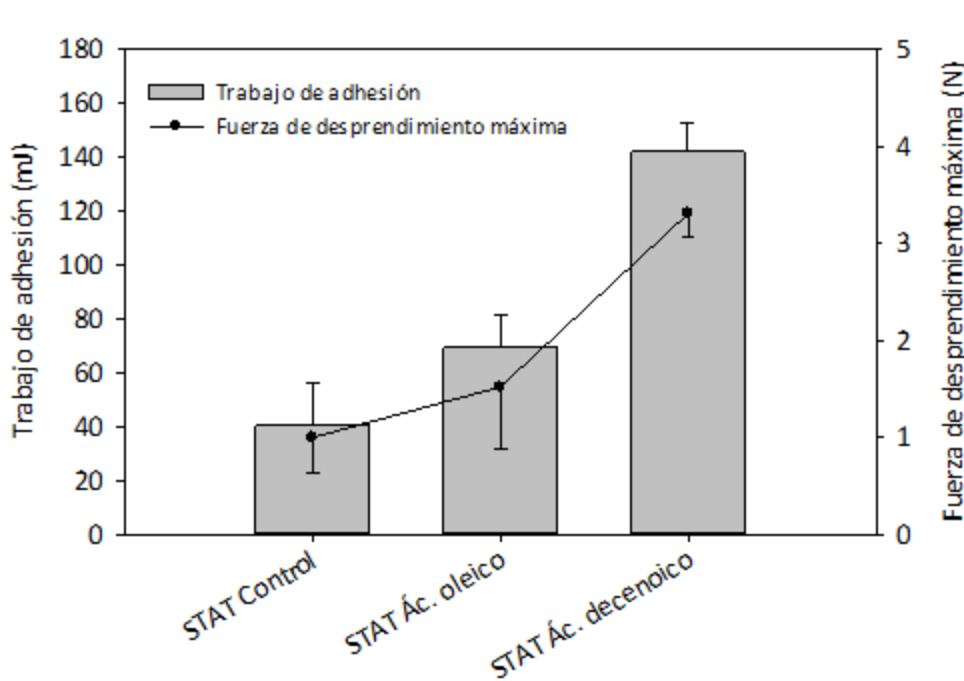


Figura 52. Trabajo de adhesión y fuerza máxima de desprendimiento de los STAT ensayados (media \pm DE).

El STAT control requirió menor fuerza de desprendimiento y trabajo de adhesión que los sistemas que incluyeron promotores químicos. El STAT de ácido decenoico presentó los valores más elevados de adhesión, siendo el trabajo de adhesión 2 veces mayor que el de ácido oleico y 3.5 veces mayor que el control. La bioadhesividad de las formulaciones ensayadas se consideró adecuada.

A partir de los datos de absorción transdérmica obtenidos, se puede estimar que concentraciones plasmáticas se alcanzarían con los sistemas desarrollados. Debido a las dificultades para encontrar el comportamiento farmacocinético del pizotifeno malato en la literatura científica, necesario para realizar una estimación de la cantidad de fármaco que llega a sangre, se supuso que al administrarlo vía oral la absorción intestinal era completa. Puesto que la dosis diaria vía oral es de 1.5 mg, al compararlo con los resultados obtenidos para el STAT de ácido decenoico cuyo flujo es de $3.41 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$, haría falta un STAT de 18.3 cm^2 durante 24 horas para alcanzar la misma cantidad en sangre, el cual sería un cuadrado con 4.3 cm de lado. Puesto que comúnmente se acepta que el máximo tamaño para un STAT es de $40\text{-}50 \text{ cm}^2$, en el caso propuesto, el STAT desarrollado se encontraría dentro de este límite. Los

resultados obtenidos son prometedores y nos animan a realizar futuros ensayos para reducir más todavía el tamaño de los STAT, así como para realizar ensayos *in vivo*.

2. Paliperidona

2.1. Método analítico

2.1.1. Validación del método analítico

La validación de los métodos analíticos de **paliperidona** mediante HPLC y UPLC se llevó a cabo de forma similar al método analítico de pizotifeno malato (Miller JC, 1993; Jenke, 1996a, b; Doliwa *et al.*, 2001a; Lister, 2005). Se validaron para el rango de concentraciones de 1-100 $\mu\text{g/mL}$ ($n=7$), obteniendo la exactitud y precisión, inter e intradía.

En la Figura 53 y la Figura 54 se pueden observar los cromatogramas obtenidos al analizar las muestras de paliperidona mediante HPLC y UPLC:

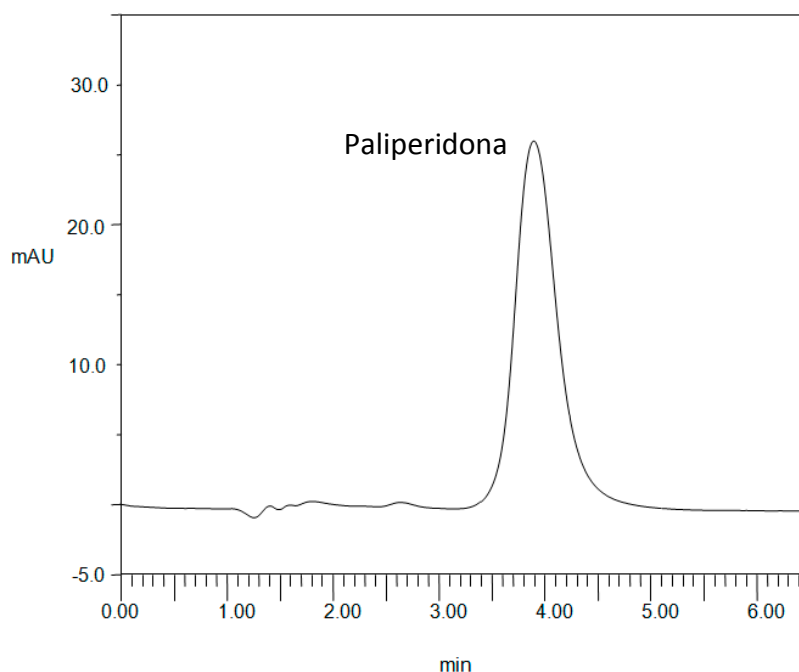


Figura 53. Cromatograma **HPLC** de una muestra de 10 $\mu\text{g/mL}$ de paliperidona.

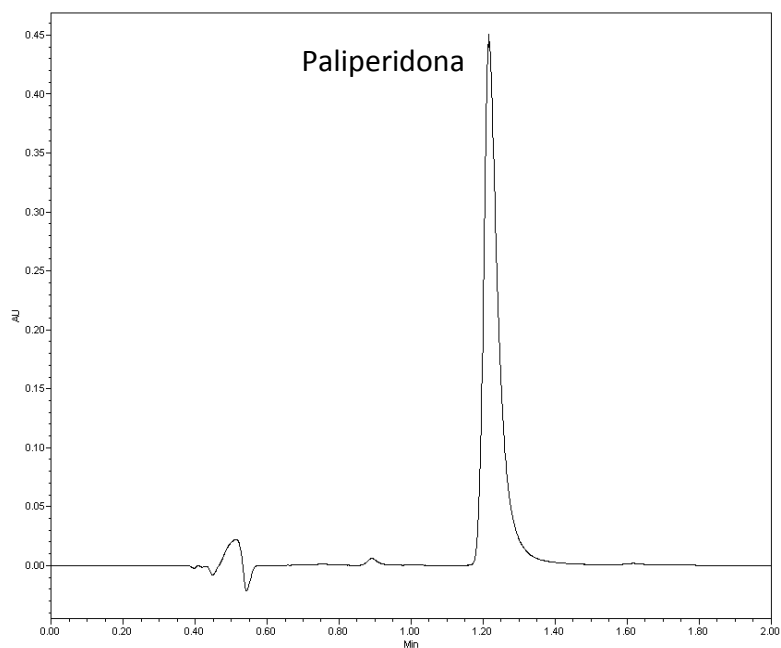


Figura 54. Cromatograma **UPLC** de una muestra de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de paliperidona.

El LOD y el LOQ obtenidos para los HPLC fueron 0.27 y 0.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$; para el UPLC 0.28 y 0.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Se obtuvieron unos tiempos de retención de 4.0 ± 0.1 min para los HPLC; y de 1.3 ± 0.05 min para el UPLC. Las ecuaciones de la recta obtenidas para cada método analítico tras la regresión lineal (área frente a concentración teórica) fueron para los HPLC “ $y = 0.885 (\pm 0.088) x$ ” ($r^2 = 0.9999$; $n = 7$); y para el UPLC “ $y = 24595 (\pm 2091) x$ ” ($r^2 = 0.9997$; $n = 7$).

En las siguientes tablas se muestran los resultados medios inter e intradía de los métodos analíticos estudiados:

C_{teórica} (µg/mL)	Área	C_{exp} ± DE (µg/mL)	Exactitud (E_r%)	Precisión (C.V. %)
1.00	2.66	1.05 ± 0.05	4.70	4.58
5.00	7.09	5.10 ± 0.42	2.03	8.21
10.0	12.4	9.98 ± 0.78	0.21	7.84
50.0	55.8	49.7 ± 2.1	0.52	4.21
100	110	100 ± 1	0.12	0.95

Tabla 17. Resultados de la validación del método analítico de paliperidona mediante HPLC.

C_{teórica} (µg/mL)	Área	C_{exp} ± DE (µg/mL)	Exactitud (E_r%)	Precisión (C.V. %)
1.00	25511	0.96 ± 0.08	4.03	8.22
5.00	123137	4.93 ± 0.10	1.32	2.08
10.0	267169	10.8 ± 0.5	7.38	4.95
50.0	1200100	48.8 ± 0.9	2.53	1.76
100	2472186	100 ± 1	0.54	0.38

Tabla 18. Resultados de la validación del método analítico de paliperidona mediante UPLC.

Como se puede observar, en ningún caso los valores de exactitud y precisión superan el 10%, límite máximo para ser considerado válido (Jenke, 1996a, b; Doliwa *et al.*, 2001a).

2.1.2. Comparación entre los métodos analíticos

Existen muchos métodos analíticos para cuantificar fármacos antipsicóticos como la risperidona y la paliperidona (Avenoso *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Locatelli *et al.*, 2009; Mandrioli *et al.*, 2011) no obstante, la mayor parte de estos métodos se utilizan para el análisis en muestras plasmáticas o de orina y no son específicos para el análisis de las muestras obtenidas en los ensayos de absorción transdérmica, por lo que pueden presentar interferencias con los diferentes compuestos endógenos. Además, estos pueden requerir un procesado diferente de las

muestras y la inclusión de un patrón interno. Por ello se desarrolló un método analítico específico.

A modo de resumen se presentan en la siguiente tabla los principales parámetros de los métodos analíticos desarrollados:

	HPLC	UPLC
Columna	LiChrospher 100 RP18 (125x4 mm) 5 µm	Acquity UPLC® BEH C18 (2.1x50 mm) 1.7 µm
Fase Móvil	ACN y solución amortiguadora de pH (KH ₂ PO ₄ 0.05 M y 0.30% (v/v) de TEA) pH 3.7 76:24 (v/v)	ACN y solución amortiguadora de pH (KH ₂ PO ₄ 0.05 M y 0.30% (v/v) de TEA) pH 3.7 76:24 (v/v)
Flujo	1.0 mL/min	0.3 mL/min
Longitud de onda	278 nm	278 nm
Volumen de inyección	75.0 µL	5.0 µL
Tiempo de retención	4.0 ± 0.1 min	1.3 ± 0.1 min
Rango concentraciones validado	1-100 µg/mL	1-100 µg/mL
LOD	0.27 µg/mL	0.28 µg/mL
LOQ	0.81 µg/mL	0.85 µL/mL

Tabla 19. Resumen de las características de los métodos analíticos validados para la cuantificación de paliperidona, HPLC y UPLC. Donde ACN es acetonitrilo, TEA es trietilamina, LOD es límite de detección y LOQ es límite de cuantificación.

Como se puede observar, no existen grandes diferencias entre los métodos analíticos desarrollados. Con respecto a la parte de detección de la paliperidona, debido a que los detectores son de similares características, ambos son UV, los rangos de concentraciones validados son idénticos y el LOD y el LOQ son muy similares con HPLC y UPLC. No obstante cabe resaltar algunas diferencias de varios de los parámetros obtenidos en los métodos analíticos. El flujo de fase móvil se reduce de 1 mL/min en HPLC a 0.3 mL/min en UPLC, lo que junto a la reducción del tiempo de retención de 4 a 1.3 minutos respectivamente, supone una disminución importante del tiempo de análisis de cada muestra, así como de la fase móvil gastada en el proceso. El volumen de muestra inyectado pasó de 75 µL en el método HPLC a 5 µL en el método

UPLC, lo que supone un volumen 15 veces menor. Aunque en los ensayos transdérmicos realizados el volumen de muestra no es limitante, es posible que este sea un punto crítico en el análisis de otros tipos de muestras. Por ejemplo, las muestras provenientes de estudios *in vivo* con frecuencia disponen de un volumen limitado y suelen requerir de tratamientos previos al análisis que reduzcan el volumen final en gran medida. Por tanto, un volumen de inyección pequeño no requerirá la adición de disolvente a la muestra para llegar al volumen de inyección mínimo, con la consecuente dilución de la misma y por tanto permite detectar el analito a concentraciones más bajas que los métodos que requieren mayor volumen de inyección. Así pues, el método analítico con UPLC, es más versátil e incrementa el ahorro de tiempo y fase móvil.

2.2. Caracterización físico-química

2.2.1. Determinación de solubilidad.

Debido a la escasez de datos acerca de la solubilidad de la paliperidona, fue necesario estudiarla bajo diferentes condiciones, para, de esta forma seleccionar el/los disolventes apropiados y su proporción y conseguir alcanzar la máxima cantidad de fármaco en solución. Debido a que la finalidad es utilizarlo sobre la piel, los solventes utilizados han de ser adecuados para su uso en la misma, evitando compuestos que produzcan modificaciones irreversibles en la piel, compuestos irritantes, corrosivos, etc. Asimismo los valores de pH de las soluciones empleadas no deben diferir en gran medida del pH de la piel (5.2 aproximadamente).

Todas las soluciones ensayadas fueron preparadas por triplicado (n=3) con solución salina amortiguadora de fosfatos a pH 7.4 y pH 5.0, empleando los diferentes solventes a distintas concentraciones y a una temperatura de 25 ± 2 °C.

Soluciones ensayadas	Concentración paliperidona \pm DE (mg/mL)
pH 7.4 y Transcutol 5%	0.14 \pm 0.11
pH 7.4 y Transcutol 1%	0.15 \pm 0.07
pH 7.4 y Labrasol 1%	0.20 \pm 0.18
pH 7.4	0.25 \pm 0.16
pH 7.4 y Cremophor EL 1%	0.30 \pm 0.04
pH 7.4 y Tween 80 1%	0.30 \pm 0.12
pH 7.4 y Tween 20 1%	0.31 \pm 0.01
pH 7.4 y Labrasol 5%	0.45 \pm 0.03
pH 7.4 y Tween 80 5%	0.57 \pm 0.01
pH 7.4 y Cremophor EL 5%	0.63 \pm 0.01
pH 7.4 y Tween 20 5%	0.99 \pm 0.02
pH 5.0	1.61 \pm 0.13
pH 5.0 y Propilenglicol 20%	1.63 \pm 0.08
pH 7.4 y HPβCD 75 mM	1.79 \pm 0.26
pH 7.4 y HPβCD 100 mM	2.22 \pm 0.01
pH 5.0 y HPβCD 50 mM	3.47 \pm 0.01
pH 5.0 y HPβCD 100 mM	5.87 \pm 0.03

Tabla 20. Valores de solubilidad de paliperidona (\pm DE) de todas las condiciones ensayadas.

Aunque la solubilidad más elevada (5.87 ± 0.03 mg/mL) se obtuvo en solución salina amortiguadora de fosfatos a pH 5.0 con HP β CD 100 mM, se seleccionó la solución con 50 mM de HP β C para utilizar como fase dadora en los experimentos de absorción transdérmica. La razón fundamental fue que la elevada concentración de ciclodextrinas en la solución la hacía más viscosa, lo que puede interferir en la cesión de paliperidona y además simplemente con la pérdida de fluido por evaporación a temperatura ambiente aparecían sedimentos de ciclodextrinas en las paredes del recipiente.

Para utilizar como fase receptora se seleccionó la solución salina amortiguadora de fosfatos a pH 7.4 y HP β CD 75 mM, debido a que este valor de pH es más cercano a las condiciones fisiológicas (bajo la piel) y a que no existía una gran diferencia respecto a la solución con HP β CD a 100 mM.

2.3. Ensayos *in vitro* de absorción transdérmica

Los experimentos con paliperidona se dirigen a la determinación de su absorción transdérmica tras utilizar la microporación láser como técnica promotora.

En los experimentos de absorción transdérmica de paliperidona se realizó en primer lugar un estudio de difusión pasiva. A continuación se realizaron los estudios de absorción utilizando el fármaco en solución y diferentes configuraciones del láser tal como se indica a continuación (número de poros: número de pulsos): 450:3, 900:1, 900:3, 900:5, 1800:3. Seguidamente se realizaron los experimentos con el fármaco en la formulación gel sin tratamiento láser (pasiva) y a 900:3.

Además de la absorción transdérmica del fármaco bajo las distintas condiciones, también se determinó la cantidad de fármaco retenida en la piel al final de los experimentos. Previa a la extracción del fármaco retenido en piel, se optimizaron el proceso de extracción y los filtros utilizados. El porcentaje de extracción de paliperidona con el método utilizado fue del 94.4 ± 2.5 % expresado como el cociente de la concentración conocida y la recuperada (Bachhav *et al.*, 2010). El porcentaje de recuperación de los filtros empleados fue del 99.2 ± 1.0 %.

Las imágenes de la piel tratada con láser fueron tomadas inmediatamente después del tratamiento, antes de proceder a la realización de los estudios de difusión en las células de Franz. En ellas se pueden observar los microporos formados con el láser y apreciar la diferencia en la densidad de poros:

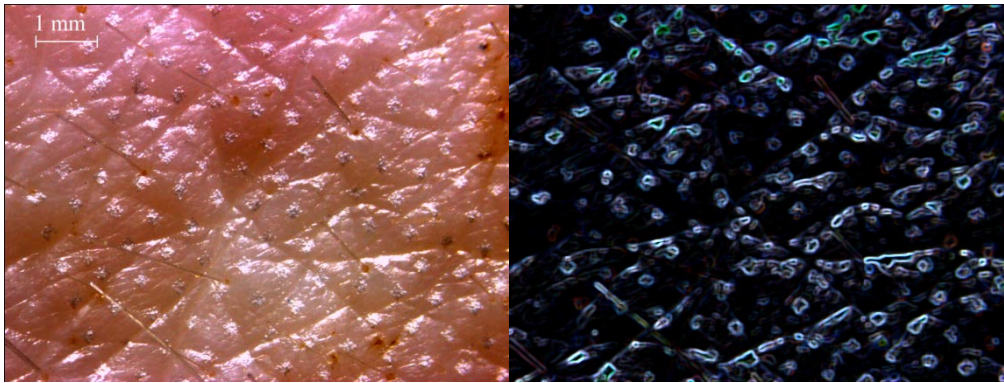


Figura 55. Imagen de la piel tras microporación láser 450:3. A la izquierda imagen natural, a la derecha imagen modificada.

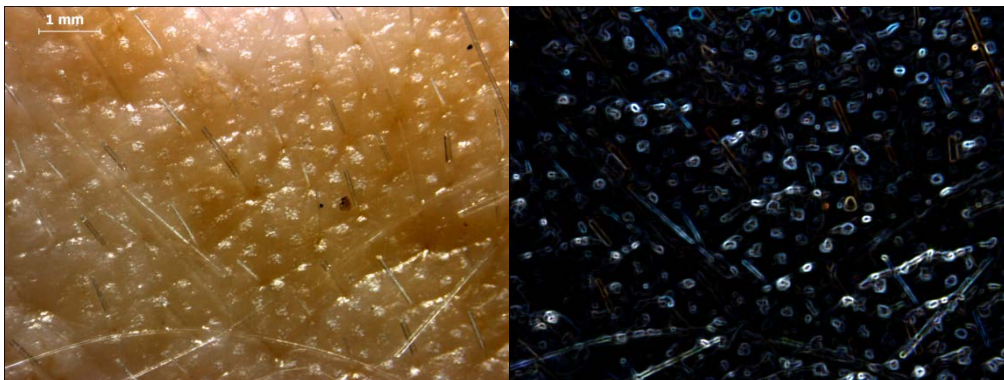


Figura 56. Imagen de la piel tras microporación láser 900:3. A la izquierda imagen natural, a la derecha imagen modificada.

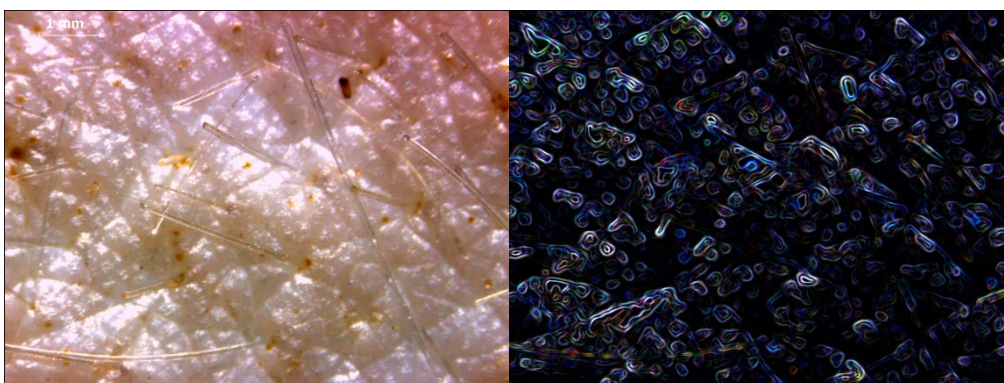


Figura 57. Imagen de la piel tras microporación láser 1800:3. A la izquierda imagen natural, a la derecha imagen modificada.

Según un estudio publicado recientemente (Bachhav *et al.*, 2010) que estudia de forma más exhaustiva la relación entre la fluencia y la profundidad de la piel alcanzada

con el láser, con 1 pulso se vería afectado el estrato córneo, mientras que con 3 y 5 pulsos se alcanzaría la epidermis viva.

En la Figura 58 se representa la condición “control” en la cual la piel no recibió ningún tipo de tratamiento. A la izquierda se encuentra la tabla con los valores de tiempo y cantidades acumuladas en el compartimento receptor (Q_a) con su desviación estándar. A la derecha, aparece la representación gráfica de los datos de la tabla.

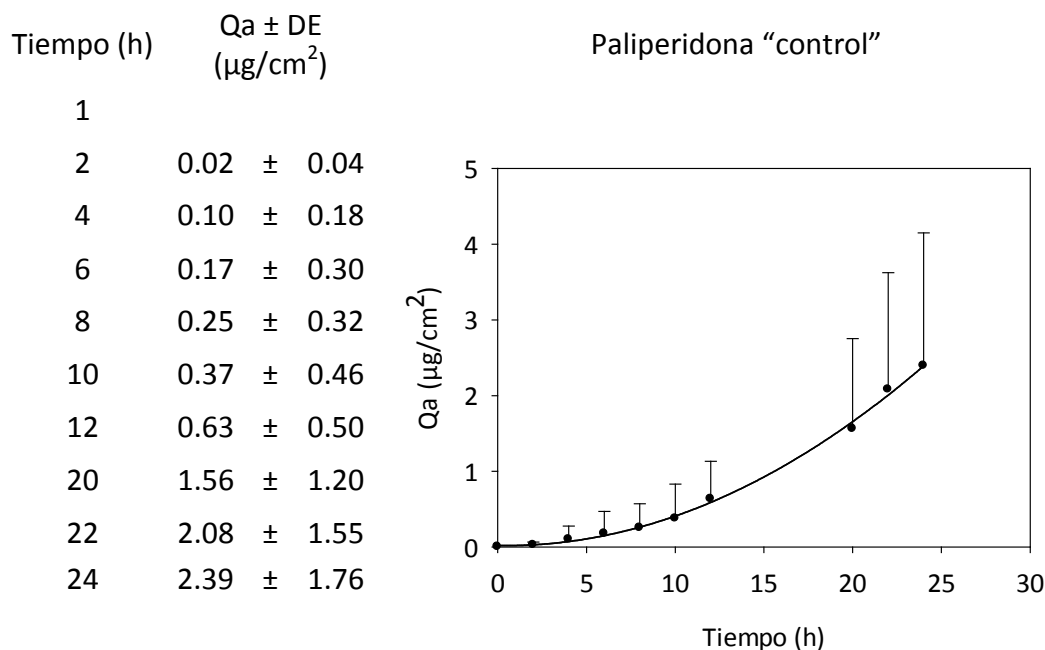


Figura 58. Cantidades medias acumuladas (Q_a) de paliperidona frente al tiempo para el grupo **control** ($n=7$).

Como se puede observar la absorción transdérmica evaluada en los ensayos control es muy baja, alcanzando únicamente $2.39 \pm 1.76 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ tras 24 horas de aplicación. El flujo transdérmico fue de $0.21 \pm 0.14 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$.

La Figura 59, la Figura 60 y la Figura 61 corresponden a las cantidades acumuladas de paliperidona frente al tiempo en las condiciones de tratamiento láser en las que se mantuvo constante el número de poros a 900 y se aumentó el número de pulsos de 1 a 5.

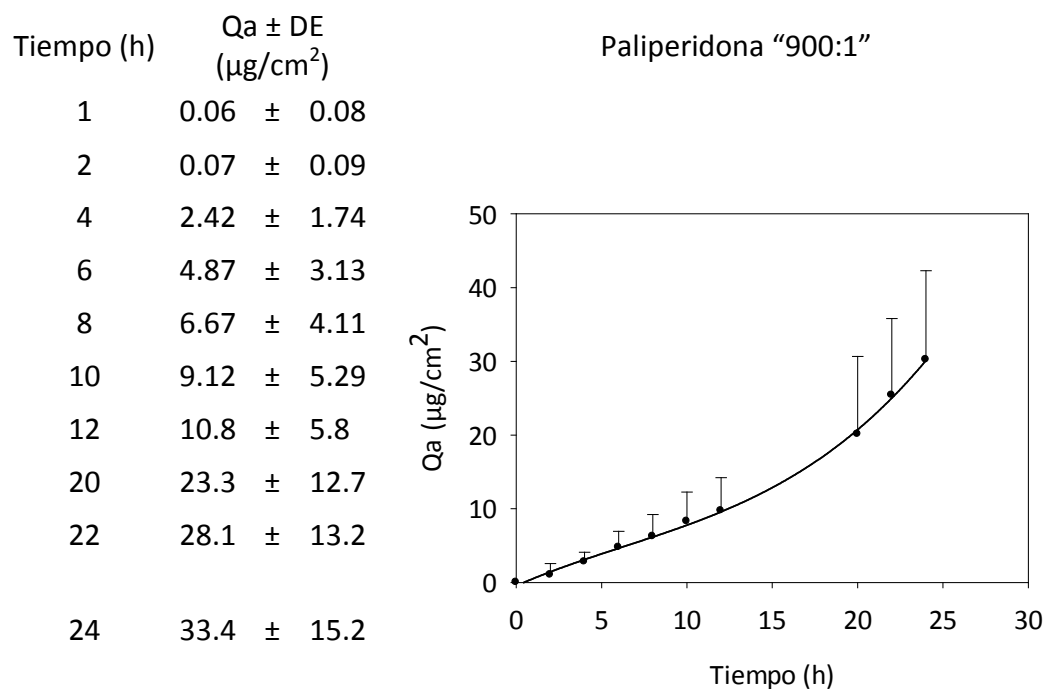


Figura 59. Cantidades medias acumuladas (Qa) de paliperidona frente al tiempo para el grupo **900:1** (n=3).

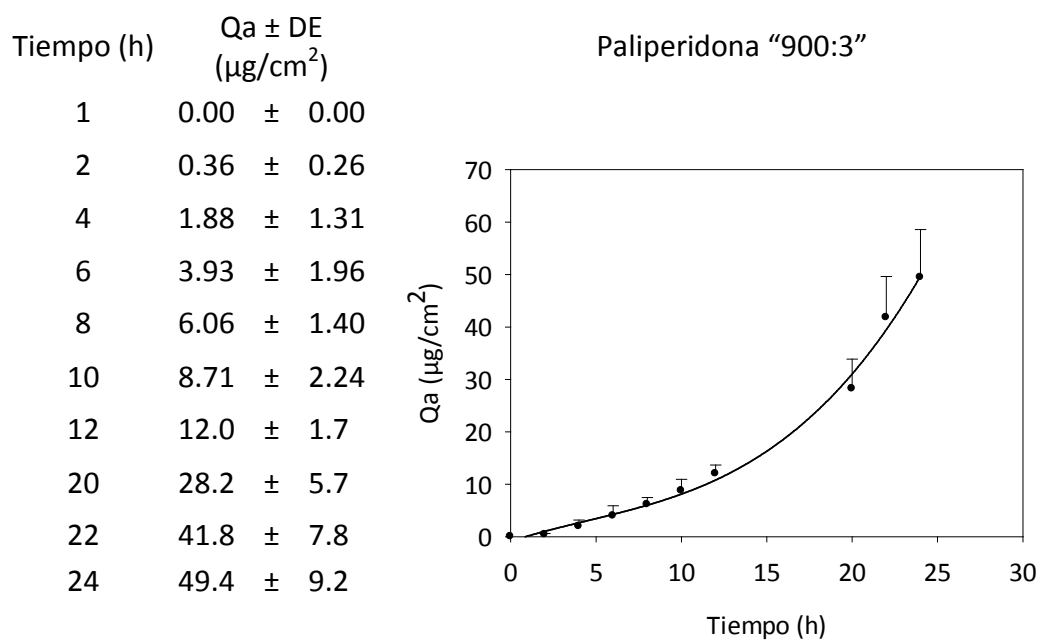


Figura 60. Cantidades medias acumuladas (Qa) de paliperidona frente al tiempo para el grupo **900:3** (n=4).

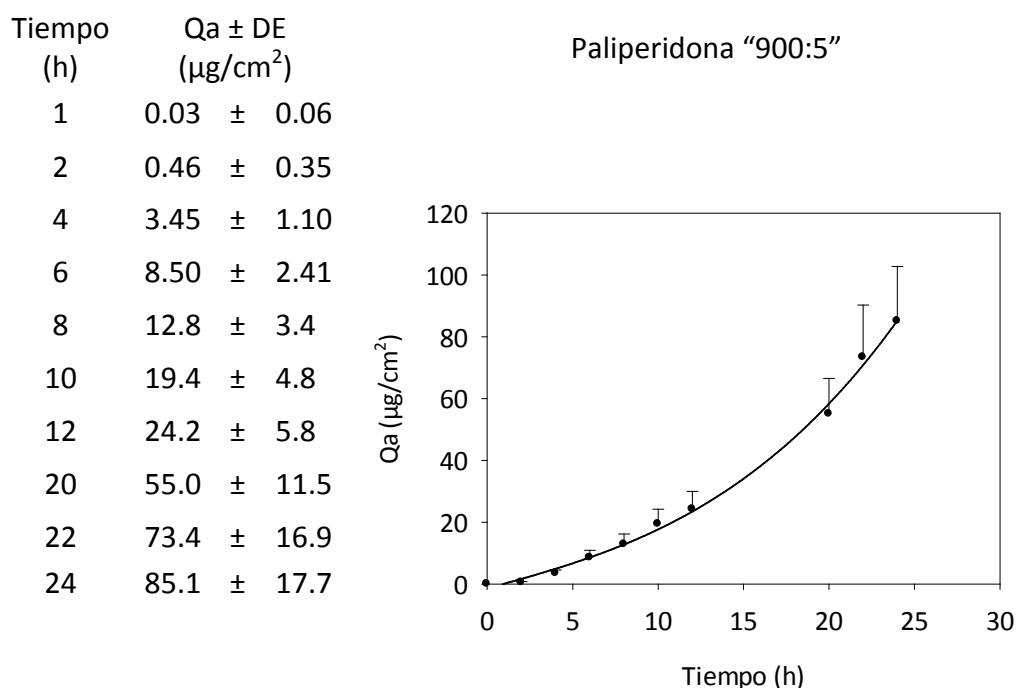


Figura 61. Cantidades medias acumuladas (Qa) de paliperidona frente al tiempo para el grupo **900:5** (n=4).

Como se puede observar al comparar la Figura 59, la Figura 60 y la Figura 61, se aprecia un incremento de las cantidades acumuladas en el compartimento receptor al final del experimento con las tres condiciones, siendo estas de $33.4 \pm 15.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para 900:1, $49.4 \pm 9.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para 900:3 y $85.1 \pm 17.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para 900:5. Las condiciones 900:5 y 900:3 resultaron diferentes estadísticamente de la condición control y además para 900:5 también se encontraron diferencias con respecto a 900:1 y 900:3 ($p < 0.05$).

Los flujos transdérmicos obtenidos para las tres condiciones 900:1, 900:3 y 900:5 fueron de $2.52 \pm 0.45 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$, $5.31 \pm 0.88 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ y $7.52 \pm 2.63 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$, respectivamente. Los valores de flujo transdérmico obtenidos muestran un aumento progresivo de acuerdo al número de pulsos, se evidencian diferencias significativas entre sí para las condiciones tratadas a 900 poros y 1, 3 y 5 pulsos ($p < 0.05$). El efecto promotor (con respecto a la condición control) para cada una de estas condiciones sería de 12, 25.3 y 35.8, respectivamente. De esta forma, se ha determinado que el aumento del flujo transdérmico de la paliperidona está directamente relacionado con el aumento de pulsos.

A continuación se muestran las figuras correspondientes a las condiciones en las cuales se incrementó el número de poros y se mantuvo fijo el número de pulsos.

Tiempo (h)	$Q_a \pm DE$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
1	
2	0.31 \pm 0.18
4	1.34 \pm 0.54
6	2.65 \pm 1.13
8	4.04 \pm 1.74
10	5.69 \pm 2.37
12	7.28 \pm 3.09
20	14.8 \pm 6.0
22	16.4 \pm 7.1
24	18.1 \pm 7.7

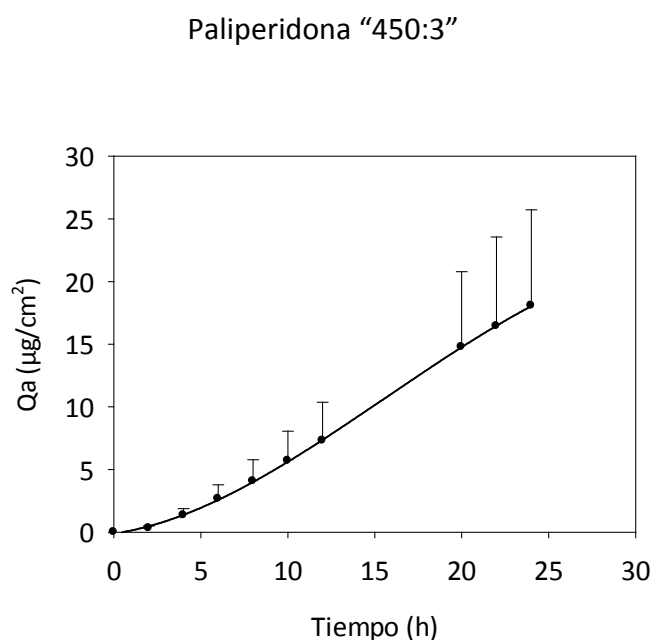


Figura 62. Cantidades medias acumuladas (Q_a) de paliperidona frente al tiempo para el grupo **450:3** ($n=5$).

Tiempo (h)	$Q_a \pm DE$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
1	
2	2.15 \pm 1.72
4	11.2 \pm 4.0
6	20.4 \pm 7.9
8	33.2 \pm 11.9
10	43.6 \pm 17.3
12	55.6 \pm 22.1
20	99.7 \pm 49.7
22	110 \pm 52
24	123 \pm 59

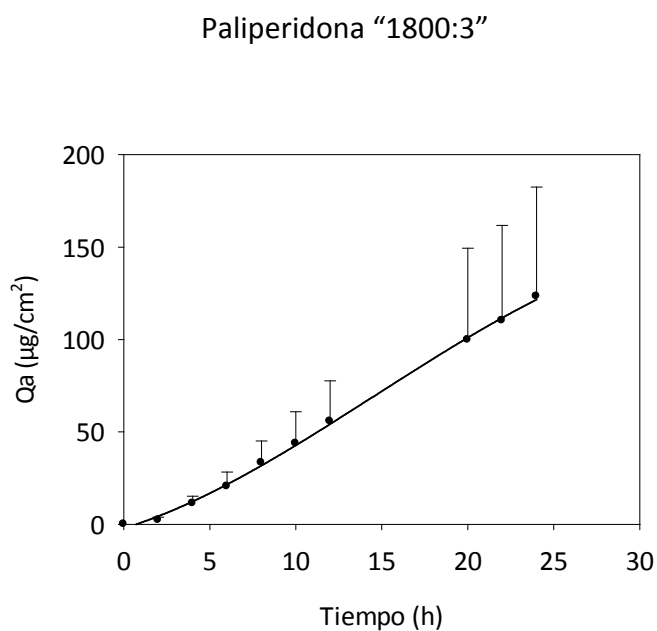


Figura 63. Cantidades medias acumuladas (Q_a) de paliperidona frente al tiempo para el grupo **1800:3** ($n=4$).

Las cantidades de paliperidona acumuladas en el compartimento receptor en las condiciones en las que se utilizaron 3 pulsos son $18.1 \pm 7.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para 450:3, $49.4 \pm 9.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para 900:3 y $123 \pm 59 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para 1800:3. Los flujos transdérmicos en el estado estacionario fueron de $0.82 \pm 0.42 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$, $5.31 \pm 0.88 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ y $5.90 \pm 2.40 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ y el efecto promotor de 3.9, 25.3 y 28.1, respectivamente. Se hallaron diferencias significativas de los flujos transdérmicos entre 450 poros y 900 o 1800 poros ($p < 0.05$), pero no fue así entre 900 y 1800 poros ($p > 0.05$). Este aumento en la absorción, más moderado al producir 900 y 1800 poros, lleva a pensar que existe un máximo número de poros a partir del cual la absorción no aumenta en gran medida, mientras que si implicaría un mayor tiempo de recuperación de las características basales de la piel.

La Figura 64 y la Figura 65 corresponden a las condiciones en las que se utilizó la formulación de paliperidona. Gel control hace referencia a los ensayos de difusión pasiva desde el gel formulado; y Gel 900:3 corresponde al ensayo de absorción transdérmica con pretratamiento de la piel.

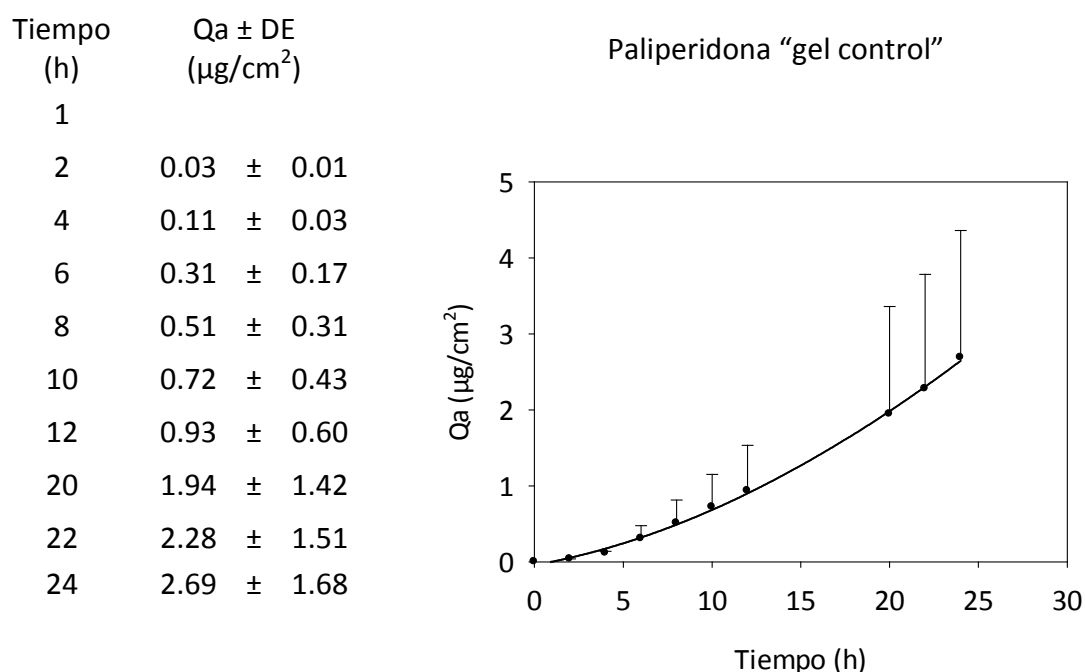


Figura 64. Cantidades medias acumuladas (Qa) de paliperidona frente al tiempo para el grupo **Gel control** ($n=3$).

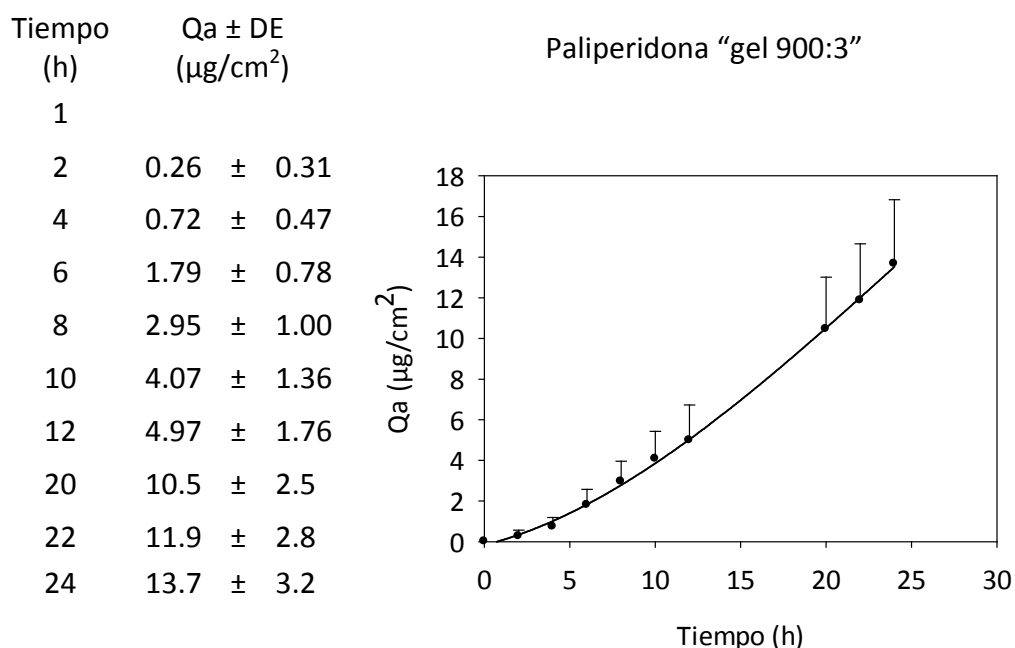


Figura 65. Cantidades medias acumuladas (Qa) de paliperidona frente al tiempo para el grupo **Gel 900:3** (n=3).

Las cantidades acumuladas en el compartimento receptor transcurridas 24 horas fueron de $2.69 \pm 1.68 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para el gel control y $13.7 \pm 3.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para gel 900:3. Asimismo, los correspondientes flujos transdérmicos fueron de $0.19 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $0.80 \pm 0.21 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. Por tanto, el efecto promotor de la microporación a 900:3 respecto al control fue de 4.21. No obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros estudiados ($p > 0.05$).

Como se puede apreciar, las cantidades acumuladas tras el pretratamiento láser y la aplicación de la paliperidona en gel, son menores que las obtenidas en solución. Adicionalmente el efecto promotor se ha visto reducido de 25.3 en solución a 4.21 en gel. Sin duda, la absorción desde el gel está condicionada por la liberación del fármaco desde la formulación.

En la Figura 66 puede observarse un resumen con todas las condiciones estudiadas ordenadas de menor a mayor flujo:

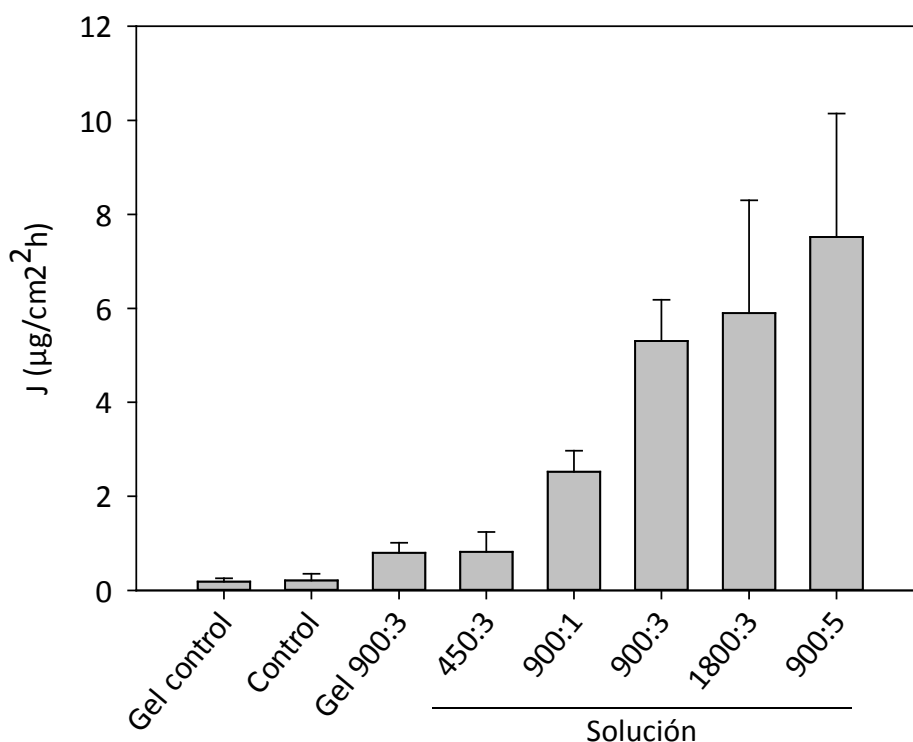


Figura 66. Flujos en el estado estacionario calculados para cada condición estudiada de paliperidona (media \pm DE).

J (p<0.05)	Gel control	Control	Gel 900:3	450:3	900:1	900:3	1800:3	900:5
Gel control	■					D	D	D
Control		■				D	D	D
Gel 900:3			■			D	D	D
450:3				■		D	D	D
900:1					■	D	D	D
900:3						■		
1800:3							■	
900:5								■

Tabla 21. Análisis estadístico del flujo transdérmico “J”, donde “D” significa que se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

De entre todas las condiciones estudiadas, las que proporcionaron el mayor valor de flujo en el estado estacionario fueron 900:5, 1800:3 y 900:3, las cuales presentaron

diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de condiciones estudiadas pero no entre ellos ($p < 0.05$). El efecto promotor, calculado respecto al control, fue de 35.8, 28.1 y 25.3, respectivamente. Puesto que no existieron diferencias significativas en los flujos transdérmicos de las tres condiciones mencionadas, puede considerarse que emplear un tratamiento de más de 900 poros y 3 pulsos (por ejemplo 1800:3 o 900:5) no representa mayor beneficio para incrementar la absorción transdérmica de la paliperidona en solución.

La cantidad acumulada de fármaco en el compartimento receptor para cada condición ensayada y su correspondiente análisis estadístico, se muestran en la Figura 67 y en la Tabla 22, respectivamente.

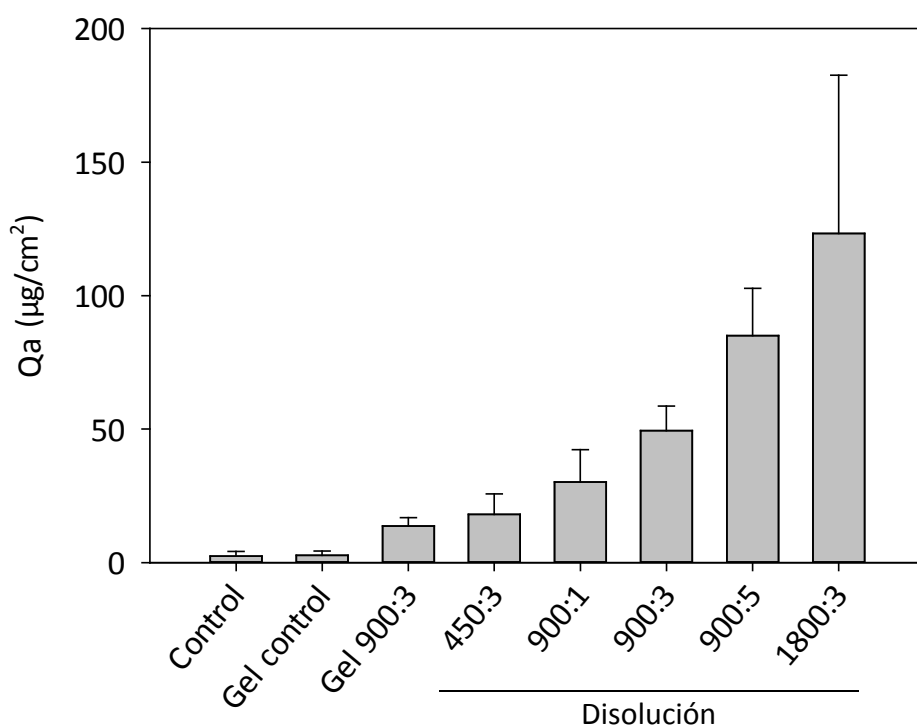


Figura 67. Cantidad acumulada de paliperidona "Qa" en el compartimento receptor al terminar el ensayo.

Qa ($p < 0.05$)	Control	Gel control	Gel 900:3	450:3	900:1	900:3	900:5	1800:3
Control						D	D	D
Gel control							D	D
Gel 900:3							D	D
450:3							D	D
900:1							D	D
900:3							D	D
900:5							D	D
1800:3								D

Tabla 22. Análisis estadístico de la cantidad de fármaco acumulada en el compartimento receptor "Qa", donde "D" significa que se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Mediante la microporación a 1800:3 se consiguieron los valores de fármaco acumulado significativamente superiores, seguido de 900:5 y 900:3, mostrando todos ellos diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0.05$). El resto de las condiciones estudiadas resultaron equivalentes estadísticamente e iguales al control ($p > 0.05$). Las cantidades acumuladas en el compartimento receptor fueron 51.5, 35.6 y 20.6 veces mayores que el control, respectivamente.

En la Figura 67 se puede observar cómo las cantidades acumuladas aumentan conforme al incremento del número de poros, aunque sólo se encontraron diferencias significativas respecto al control con las aplicaciones de 900:3, 900:5 y 1800:3 ($p > 0.05$;). En igualdad del número de pulsos, la cantidad de paliperidona acumulada en el compartimento receptor aumentó 2.7 veces entre 450 y 900 poros, y 2.5 veces entre 900 y 1800 poros. Mientras que en igualdad de número de poros, la cantidad acumulada entre 1 y 3 pulsos aumentó 1.6 veces y entre 3 y 5 pulsos 1.7 veces. De esta forma, el aumento del número de poros demuestra ser más efectivo que el aumento de pulsos a la hora de aumentar la cantidad acumulada en compartimento receptor.

Recientes estudios no publicados, que relacionan la profundidad del poro con el número de pulsos (o la fluencia), han determinado un descenso del 30% de la profundidad del poro a partir del primer pulso, el cual tiene una profundidad de 15 μm . Así pues, 3 pulsos alcanzarían los 32.8 μm , mientras que con 5 pulsos se

lograría una profundidad de 41.6 μm . A partir de la altura y el diámetro del poro, al considerar que cada poro presenta una forma cilíndrica, puede calcularse el incremento del área de difusión en relación con el número de poros.

Como se observa en la Figura 68, al comparar en igualdad de número de pulsos las cantidades de paliperidona acumuladas en el compartimento receptor frente al área de difusión se observó una buena correlación ($r^2=0.9985$; $p<0.05$) entre los dos parámetros.

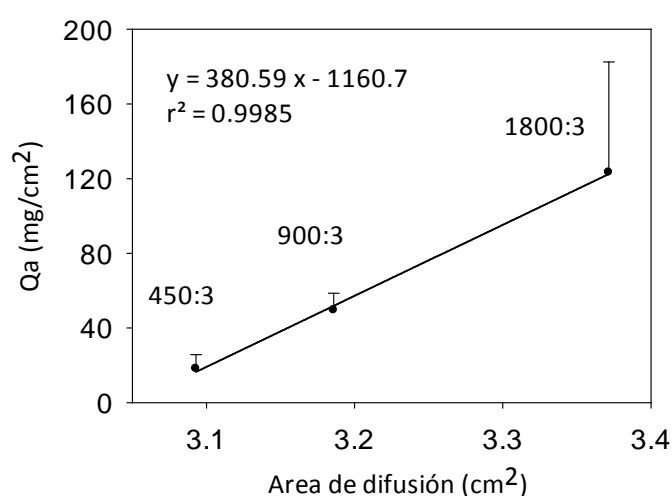


Figura 68. Cantidades de paliperidona acumuladas en el compartimento receptor por unidad de área (Q_a), frente al área de difusión en igualdad de número de pulsos.

Asimismo, en la Figura 69 se comparan las condiciones con igualdad de número de poros. En la cual se aprecia la relación entre el número de pulsos y la cantidad de fármaco acumulada en el compartimento receptor.

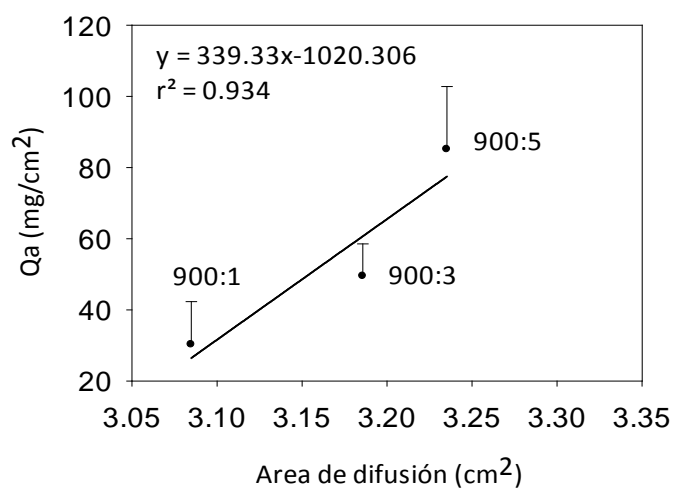


Figura 69. Cantidades de paliperidona acumuladas en el compartimento receptor por unidad de área (Q_a) frente al área de difusión en igualdad de número de poros.

Como se puede observar en la Figura 70, se mantiene una buena correlación al incluir todas las condiciones ensayadas ($p < 0.05$). Este hecho indica que existe una fuerte relación entre el incremento de superficie y la cantidad acumulada.

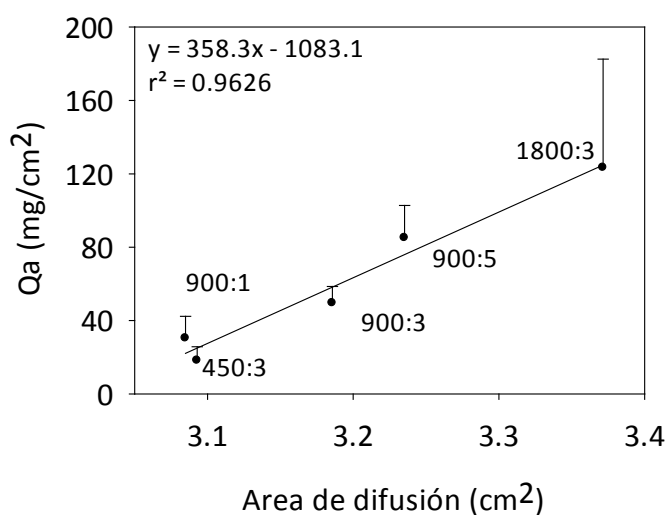


Figura 70. Cantidades de paliperidona acumuladas en el compartimento receptor por unidad de área (Q_a) frente al área de difusión para todas las condiciones pretratadas con láser y en solución.

Al terminar los ensayos de absorción transdérmica se extrajo el fármaco retenido en la piel y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 71.

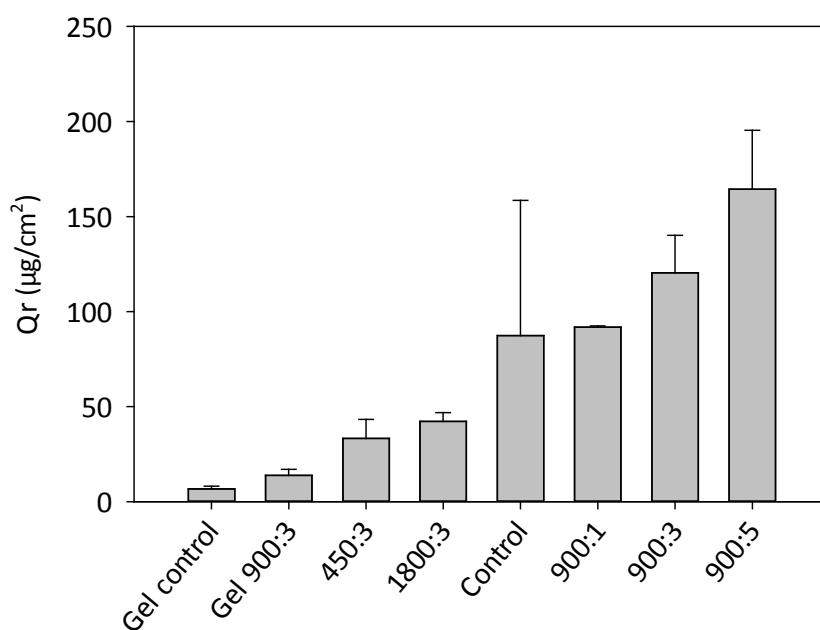


Figura 71. Cantidad de paliperidona retenida en piel "Qr".

Qr (p<0.05)	Gel control	Gel 900:3	450:3	1800:3	Control	900:1	900:3	900:5
Gel control							D	D
Gel 900:3							D	D
450:3							D	D
1800:3							D	D
Control								D
900:1							D	D
900:3								D
900:5								

Tabla 23. Análisis estadístico del fármaco retenido en piel "Qr", donde "D" significa que se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

Como se puede observar en la Tabla 23, los ensayos de soluciones en los que la piel fue tratada con 900 poros obtuvieron los valores de cantidad de fármaco retenido en piel más elevados. Las aplicaciones de 3 y 5 pulsos son iguales entre sí, y estadísticamente superiores al resto de las evaluadas, a excepción de 900:3 con la

condición control ($p < 0.05$). Además la cantidad retenida en piel aumentó de acuerdo al número de pulsos.

A igualdad del número de pulsos, la cantidad de paliperidona retenida en piel a 900:3 fue estadísticamente superior a 450:3 y 1800:3 ($p < 0.05$). En un estudio con prednisona en el que utilizaban microporación láser se observó también que la cantidad de fármaco retenida en la piel es mayor con 900 poros que con 450 o 1800 poros (Yu *et al.*, 2010). En otro estudio más minucioso llevado a cabo con diclofenaco (Bachhav *et al.*, 2011), se observó cómo la cantidad de fármaco retenido en piel se mantiene constante al modificar el número de pulsos conservando el número de poros y cómo aumenta paulatinamente hasta alcanzar los 900 poros mientras se conserva el número de pulsos. Aunque es difícil determinar por qué disminuye la cantidad de fármaco retenida en la piel a partir de los 900 poros, al observar otros estudios se pueden observar resultados similares. Este comportamiento podría ser debido a la densidad de poros y a la afinidad de la paliperidona por las diferentes capas de la piel. El aumento del número de poros podría afectar a la cantidad de fármaco acumulada en piel, haciendo que el paso a través de la misma sea más fácil con 1800 poros. Es decir, en la condición 1800:3 el fármaco supera fácilmente al estrato córneo que está dañado en gran parte y no puede retenerlo.

A partir de la concentración requerida en humanos para alcanzar el estado estacionario y el aclaramiento plasmático total de la paliperidona, puede estimarse el flujo transdérmico mínimo para obtener concentraciones terapéuticas. Debido a que la concentración plasmática de paliperidona no está establecida claramente, para la realización de los cálculos se utilizó la concentración de 20 ng/mL, proporcionado por una dosis de 100-150 mg de palmitato de paliperidona (Pandina *et al.*, 2010). Como aclaramiento plasmático total se utilizó 97.9 mL/min (Vermeir *et al.*, 2008). Los valores de flujo en el estado estacionario más elevados obtenidos para piel tratada con láser fueron: 900:5 7.52 ± 2.63 , 1800:3 5.90 ± 2.40 y 900:3 5.31 ± 0.88 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$. Por lo tanto, sería necesario utilizar un área de 15.62 cm^2 para lograr niveles terapéuticos de fármaco. Aunque no es un área muy grande para hablar de aplicación transdérmica, ya que considera adecuado un tamaño aproximado de $40\text{-}50 \text{ cm}^2$, sería conveniente reducir el área para disminuir en la medida de lo posible el área de aplicación del láser,

para lo cual se estudiará la posibilidad de utilizar otras técnicas promotoras compatibles con el láser como la iontoforesis. Asimismo, en futuros estudios sería conveniente estudiar la formulación estudiada mediante la incorporación de promotores químicos y determinar el efecto de los mismos tras el tratamiento con láser.

Capítulo 6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los estudios realizados *in vitro* en piel de cerdo muestran que los flujos transdérmicos pasivos obtenidos para el pizotifeno y la paliperidona, no son suficientes para proporcionar concentraciones terapéuticas y por tanto, para su utilización vía transdérmica es necesaria la utilización de estrategias que incrementen la absorción de estos fármacos a través de la piel.
2. De las estrategias estudiadas para incrementar la absorción de pizotifeno malato, los ácidos grasos desarrollaron un efecto promotor mayor, siendo el ácido decenoico el más eficaz. La insaturación en los ácidos grasos en la posición 9 y la longitud de la cadena carbonada parecen estar relacionadas con la eficacia de este grupo de promotores. Aunque ambos parámetros proporcionan un aumento en la absorción, la insaturación en el carbono 9 presenta un efecto más marcado.
3. Asimismo, el resto de promotores químicos estudiados (etanol, cineol, limoneno, Azone®, ácido oleico y ácido linoleico), no fueron eficaces a la hora de aumentar la absorción transdérmica de pizotifeno.
4. El sistema terapéutico de absorción transdérmica de pizotifeno formulado con polivinil pirrolidona K90, Plastoid E35H, propilenglicol, etanol y con ácido decenoico como promotor químico, proporcionó un flujo transdérmico superior al proporcionado por la formulación control. Además, los sistemas terapéuticos de absorción transdérmica desarrollados presentaron características físicas adecuadas para su utilización, buena adhesividad y resistencia y estabilidad química.
5. En el tratamiento de microporación láser, el aumento del número de poros y pulsos produjo un incremento significativo de la absorción de paliperidona. No obstante, el aumento de poros presentó un límite a partir del cual el incremento de la absorción se redujo. El pretratamiento con 900:3 produjo un incremento en el flujo transdérmico de fármaco similar a las condiciones de 900:5 y 1800:3. Este tratamiento resulta menos invasivo,

y por ello el más adecuado para promover la penetración de paliperidona a través de la piel.

6. Se observó una correlación lineal entre las cantidades acumuladas de paliperidona y el área de difusión de tratamiento por microporación láser. De modo que a medida que aumenta el área de difusión aumenta el paso de paliperidona a través de la piel.

Capítulo 7. Abstract and conclusions

The present doctoral thesis is part of a major project which aims to develop new therapeutic alternatives for the treatment of long-term diseases by the use of transdermal delivery systems. This work has been possible thanks to the funds obtained from “Fondo de Investigaciones Sanitarias” (Ministerio de Sanidad y Consumo) (Project PI060108), and the University CEU Cardenal Herrera (PRCEU-UCH01/09).

In the last years the use of transdermal route has increased its use because of the advantages that it can offer: constant maintenance of plasma concentrations of the drug, avoidance of first-pass metabolism, reduced side-effects, ability to end the drug administration and improvement of patient compliance.

The main objectives of the present work were to develop transdermal delivery systems of pizotifen malate and to evaluate the transdermal administration of paliperidone. In order to achieve these objectives the analytical method validation for both compounds was carried out. Afterwards, passive diffusion was determined and the effect of different enhancer strategies like chemical enhancers, iontophoresis and laser microporation was determined. Finally, pizotifen matrix patches were developed including the strategies that provided better results and their physicochemical properties were determined. In the case of the paliperidone, a preliminary gel formulation was developed and studied under microporated skin.

From the results obtained the following conclusions can be drawn:

1. The *in vitro* studies performed with pig skin show that the transdermal flow rates of pizotifen malate and paliperidone under passive diffusion, were not enough to provide therapeutic concentrations by means of this administration pathway, therefore it is necessary to use transdermal enhancement techniques which increase their absorption through the skin.
2. Among the strategies studied to increase pizotifen transdermal absorption, fatty acids provided the best enhancement ratio, being decenoic acid the the most effective. The unsaturated bonds on the 9th carbon and the chain

length seem to be related with the enhancement effect of this group of transdermal enhancers. Although both parameters produce an increase in the transdermal absorption, the unsaturated bond on the 9th carbon is more pronounced.

3. Some of the strategies studied, like chemical enhancers (ethanol, cineol, limonene, Azone[®], oleic acid and linoleic acid) and iontophoresis, were not effective by increasing the transdermal absorption of pizotifen.
4. A transdermal delivery system of pizotifen malate prepared with polyvinyl pyrrolidone K90, Plastoid E35H, propylenglycol, ethanol and decenoic acid as chemical enhancer, provided a pizotifen transdermal flow rate superior to the control formulation. Moreover, the manufactured transdermal delivery systems showed physical characteristics suitable for its use, these are good stacking and resistance and chemical stability.
5. Considering the laser microporation treatment, the increase of pores number and their pulses produced a significant increment on the absorption of paliperidone. However, the increase on the number of pores presented a limit where the increment on the transdermal absorption was decreased. Pretreatment with 900:3 produced an increment on the transdermal flow rate similar to the treatments 900:5 and 1800:3, but being the first less invasive it can be considered more appropriate.
6. A lineal correlation between the accumulated amounts of paliperidone and the diffusion area was observed, when applying laser microporation. Accordingly, as the diffusion area increases paliperidone absorption increases.

Capítulo 8. Bibliografía

Aboofazeli R, Zia H y Needham T. Transdermal delivery of nicardipine: an approach to in vitro permeation enhancement. *Drug Delivery* 2002; 9: 239-247.

Abounassif MA, El-Obeid HA y Gadkariem EA. Stability studies on some benzocycloheptane antihistaminic agents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005; 36 (5): 1011-1018.

Ahad A, Aqil M, Kohli K, Chaudhary H, Sultana Y, Mujeeb M y Talegaonkar S. Chemical penetration enhancers: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2009; 19 (7): 969-988.

Akhter S y Barry B. Flurbiprofen penetration and enhancement through cadaver skin: Value of "in vivo mimic" approach with low enhancement concentrations. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1983; 35: 30.

Allan G. In: *Azone® ed., CRC Press Percutaneous Penetration Enhancers* 1995: 130-136.

Andersson K y E VE. β -Adrenoceptor blockers and calcium antagonists in the prophylaxis and treatment of migraine. *Drugs* 1990; 39: 355-373.

Api AM, Ritacco G y Hawkins DR. The fate of dermally applied [14C]d-limonene in rats and humans. *International Journal of Toxicology* 2013; 32 (2): 130-135.

Artigas J, Grau R y Canosa P. Prevalence and characteristic of infantile headache in selected area. *Cephalgia* 1997; 17: 293.

Atrux-Tallau N, Romagny C, Padois K, Denis A, Haftek M, Falson F, Pirot F y Maibach H. Effects of glycerol on human skin damaged by acute sodium lauryl sulphate treatment. *Archives of Dermatological Research* 2009.

Aungst BJ. Structure/Effect Studies of Fatty Acid Isomers as Skin Penetration Enhancers and Skin Irritants. *Pharmaceutical Research* 1989; 6 (3): 244-247.

Aungst BJ, J. Rogers N y Shefter E. Enhancement of naloxone penetration through human skin in vitro using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amides. *International Journal of Pharmaceutics* 1986; 33 (1-3): 225-234.

Avenoso A, Facciola G, Salemi M y Spina E. Determination of risperidone and its major metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B* 2000; 746 (2): 173-181.

Bachhav YG, Heinrich A y Kalia YN. Using laser microporation to improve transdermal delivery of diclofenac: Increasing bioavailability and the range of therapeutic applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2011; 78 (3): 408-414.

Bachhav YG, Summer S, Heinrich A, Bragagna T, Böhler C y Kalia YN. Effect of controlled laser microporation on drug transport kinetics into and across the skin. *Journal of Controlled Release* 2010; 146 (1): 31-36.

Balaguer-Fernandez C, Femenia-Font A, Del Rio-Sancho S, Merino V y Lopez-Castellano A. Sumatriptan succinate transdermal delivery systems for the treatment of migraine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008; 97 (6): 2102-2109.

Balaguer-Fernandez C, Padula C, Femenia-Font A, Merino V, Santi P y Lopez-Castellano A. Development and evaluation of occlusive systems employing polyvinyl alcohol for transdermal delivery of sumatriptan succinate. *Drug Delivery* 2010; 17 (2): 83-91.

Balaguer Fernandez C. Desarrollo de un Sistema Terapéutico de Administración Transdérmica de Sumatriptán. Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología; Universidad CEU Cardenal Herrera, 2010.

Banerjee PK, Choudhury AK y Panja SK. Topical urea in dermatology. *Indian Journal in Dermatology* 1990; 35 (1): 17-24.

Barbero AM y Frasch HF. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 2009; 23 (1): 1-13.

Barel AO, Paye M y Maibach HI. Handbook of cosmetic science and technology. *Informa Healthcare* 2009: XVI, 869 p.

Barnes NP. Migraine headache in children. *Clinical Evidence* 2011; 2011.

Barry B. Methods for studying percutaneous absorption. *Dermatological Formulations* 1983: 234-295.

Barry B. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *Journal of Controlled Release* 1987; 2: 85-97.

Barry B y Bennett S. Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortison and progesterone through human skin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1987; 39: 535-546.

Barry B y Brace A. Permeation of oestrone, oestradiol and dexamethasone across cellulose acetate membrane. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1977; 29: 397-400.

Barry BW. Action of skin penetration enhancers—the Lipid Protein Partitioning theory. *International Journal of Cosmetic Science* 1988; 10 (6): 281-293.

Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001; 14 (2): 101-114.

Barry BW, Southwell D y Woodford R. Optimization of bioavailability of topical steroids: penetration enhancers under occlusion. *The Journal of investigative dermatology* 1984; 82 (1): 49-52.

Bellantuono C y Santone G. Efficacy, tolerability and safety of paliperidone extended-release in the treatment of schizophrenia and schizoaffective disorder. *Rivista di psichiatria* 2012; 47 (1): 5-20.

Belloch A, Sandín B y Ramos Campos F. *Manual de psicopatología*. McGraw-Hill 2008.

Bennett SL, Barry BW y Woodford R. Optimization of bioavailability of topical steroids: non-occluded penetration enhancers under thermodynamic control. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 1985; 37 (5): 298-304.

Berner B LP. In: *Percutaneous Penetration Enhancers* ed., CRC Press 1995: 40-60.

Berwaerts J, Melkote R, Nuamah I y Lim P. A randomized, placebo- and active-controlled study of paliperidone extended-release as maintenance treatment in patients with bipolar I disorder after an acute manic or mixed episode. *Journal of affective disorders* 2012; 138 (3): 247-258.

Bhatia KS y Singh J. Pig Ear Skin as a Model for Predicting Percutaneous Absorption in Man. *Pharmacy and Pharmacology Communications* 1996; 2 (6): 275-276.

Birnbaum M y Sharif Z. Medication adherence in schizophrenia: patient perspectives and the clinical utility of paliperidone ER. *Patient Prefer Adherence* 2008; 2: 233-240.

Bolton E WY, Thiessen PA, Bryant SH. PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. Chapter 12 IN *Annual Reports in Computational Chemistry*, Volume 4, American Chemical Society, Washington, DC. 2008.

Bommannan D, Potts RO y Guy RH. Examination of the effect of ethanol on human stratum corneum in vivo using infrared spectroscopy. *Journal of Controlled Release* 1991; 16 (3): 299-304.

Borrás-Blasco J, Díez-Sales O, López A y Herráez-Domínguez M. A mathematical approach to predicting the percutaneous absorption enhancing effect of sodium lauryl sulphate. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 269: 121-129.

Borrás-Blasco J, López A, Morant M, Díez-Sales O y Herráez-Domínguez M. Influence of sodium lauryl sulphate on the in vitro percutaneous absorption of compounds with different lipophilicity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 1997; 5: 15-22.

Bourgeois FT, Murthy S, Pinto C, Olson KL, Ioannidis JP y Mandl KD. Pediatric versus adult drug trials for conditions with high pediatric disease burden. *Pediatrics* 2012; 130 (2): 285-292.

Bouwstra J, Gooris G, Weerheim A, Kempenaar J y M P. Characterization of stratum corneum structure in reconstructed epidermis by X-ray diffraction. *Journal of Lipid Research* 1995; 82: 270-284.

Bouwstra J, Peschier L, Brussee J y Boddé H. Effect of N-alkyl-azacycloheptan-2-ones including azone on the thermal behaviour of human stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics* 1989; 52: 47-54.

Briars GL, Travis SE, Anand B y Kelly AM. Weight gain with pizotifen therapy. *Archives of Disease in Childhood* 2008; 93 (7): 590-593.

Calpena A, Lauroba J, Sunol M, Obach R y Domenech J. Effect of d-Limonene on the transdermal permeation of Nifedipine and Domperidone. *International Journal of Pharmaceutics* 1994; 103: 179-186.

Cleland P, Barnes D, Elrington G y Loizou L. Studies to assess if pizotifen prophylaxis improves migraine beyond the benefit offered by acute sumatriptan therapy alone. *European Neurology* 1997; 38 (1): 31-38.

Clemmensen A, Andersen F, Petersen TK, Kalden H, Melgaard A y Andersen KE. The irritant potential of n-propanol (nonanoic acid vehicle) in cumulative skin irritation: a validation study of two different human in vivo test models. *Skin Research and Technology* 2008; 14 (3): 277-286.

Coldman M, Poulsen B y Higuchi T. Enhancement of percutaneous absorption by the use of volatile: nonvolatile systems as vehicles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1969; 58: 1098-1102.

Cooper ER, Merritt EW y Smith RL. Effect of fatty acids and alcohols on the penetration of acyclovir across human skin in vitro. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1985; 74 (6): 688-689.

Crank J. The mathematics of diffusion / by J. Crank. Clarendon Press Oxford science publications 1975.

Crutcher W y Maibach H. The effect of perfusion rate on in vitro percutaneous penetration. *Journal of Investigative Dermatology* 1969; 53: 264-269.

Chattaraj S y Walker R. In: Penetration enhancers classification ed., CRC Press Percutaneous Penetration Enhancers 1995: 5-20.

De Flores T y Association AP. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision (Dsm-IV-Tr) (Spanish Edition). American Psychiatric Publishing, Incorporated 2004.

del Rio-Sancho S, Serna-Jimenez CE, Calatayud-Pascual MA, Balaguer-Fernandez C, Femenia-Font A, Merino V y Lopez-Castellano A. Transdermal absorption of memantin--effect of chemical enhancers, iontophoresis, and role of enhancer lipophilicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012; 82 (1): 164-170.

del Rio Sancho S, Serna Jimenez CE, Calatayud Pascual MA, Balaguer Fernandez C, Femenia Font A, Castillo Garcia E, Merino V y Lopez Castellano A. Evaluation of percutaneous absorption of esculetin: effect of chemical enhancers. *Planta Medica* 2013; 79 (2): 131-136.

Dhiman S, Singh TG y Rehni AK. Transdermal patches: A recent approach to new drug delivery system. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2011; Vol 3 (5): 26-34.

Díez-Sales O, Pérez-Sayas E, Martín-Villodre A y Herráez-Domínguez M. The prediction of percutaneous absorption: I. Influence of the dermis on in vitro permeation models. *International Journal of Pharmaceutics* 1993; 100: 1-7.

Díez-Sales O, Watkinson A, Herráez-Domínguez M, Javaloyes C y Hadgraft J. A mechanistic investigation of the in vitro human permeation enhancing effect of Azone®. *International Journal of Pharmaceutics* 1996; 129: 33-40.

Dolder CR, Lacro JP, Leckband S y Jeste DV. Interventions to improve antipsychotic medication adherence: review of recent literature. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 2003; 23 (4): 389-399.

Doliwa A, Santoyo S, Campanero M y Ygartua P. Sensitive LC determination of piroxicam after in vitro transdermal permeation studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001a; 26 (4): 531-537.

Doliwa A, Santoyo S y Ygartua P. Effect of passive and iontophoretic skin pretreatments with terpenes on the in vitro skin transport of piroxicam. *International Journal of Pharmaceutics* 2001b; 229 (1-2): 37-44.

Dubey S y Kalia YN. Electrically-assisted delivery of an anionic protein across intact skin: Cathodal iontophoresis of biologically active ribonuclease T1. *Journal of Controlled Release* 2011; 152 (3): 356-362.

Dubey S y Kalia YN. Non-invasive iontophoretic delivery of enzymatically active ribonuclease A (13.6 kDa) across intact porcine and human skins. *Journal of Controlled Release* 2010; 145 (3): 203-209.

Dubey S, Perozzo R, Scapozza L y Kalia YN. Noninvasive transdermal iontophoretic delivery of biologically active human basic fibroblast growth factor. *Molecular pharmaceutics* 2011; 8 (4): 1322-1331.

Eiland LS, Jenkins LS y Durham SH. Pediatric Migraine: Pharmacologic Agents for Prophylaxis. *The Annals of Pharmacotherapy* 2007; 41 (7): 1181-1190.

Elías P. Epidermal lipids, barrier function and desquamation. *Journal of Investigative Dermatology* 1983; 80: 44-49.

Elías P y Friend D. The permeability barrier of mammalian epidermis. *Journal of Cell Biology* 1975; 65: 180-191.

Ellis G, Delaney J, DeHart D y Owens A. The efficacy of metoclopramida in the treatment of migraine headache. *Annals of Emergency Medicine* 1993; 22 (2): 191-195.

Engelbrecht TN, Schroeter A, Hauß T y Neubert RHH. Lipophilic penetration enhancers and their impact to the bilayer structure of stratum corneum lipid model membranes: Neutron diffraction studies based on the example Oleic Acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2011; 1808 (12): 2798-2806.

Escribano E, San Martín H, Calpena A, Moreno J, Obach R y Domenech J. Influence of the formulation on the transdermal penetration of Piroxicam. *14th Pharmaceutical Technology Conference Spain (Memories)* 1995; 2a: 670-676.

Fang JY, Lee WR, Shen SC, Wang HY, Fang CL y Hu CH. Transdermal delivery of macromolecules by erbium:YAG laser. *Journal of controlled release* 2004; 100 (1): 75-85.

Femenia-Font A, Balaguer-Fernandez C, Merino V y Lopez-Castellano A. Combination strategies for enhancing transdermal absorption of sumatriptan through skin. *International Journal of Pharmaceutics* 2006a; 323 (1-2): 125-130.

Femenía-Font A, Merino V y López-Castellano A. Sistemas terapéuticos de administración transdérmica. *Industria Farmacéutica* 2004; 111: 63-73.

Femenia-Font A, Padula C, Marra F, Balaguer-Fernandez C, Merino V, Lopez-Castellano A, Nicoli S y Santi P. Bioadhesive monolayer film for the in vitro transdermal delivery of sumatriptan. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006b; 95 (7): 1561-1569.

Fernandez-Mayoralas DM, Fernandez-Jaen A, Munoz-Jareno N, Calleja-Perez B, Fernandez-Perrone AL y Arribas SL. Treatment with paliperidone in children with behavior disorders previously treated with risperidone: an open-label trial. *Clinical Neuropharmacology* 2012; 35 (5): 227-230.

Flórez J. *Farmacología humana* (5ª Ed.). Masson 2008.

Flynn GL, Yalkowsky SH y Roseman TJ. Mass transport phenomena and models: Theoretical concepts. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1974; 63 (4): 479-510.

Foreman M, Kelly I y Lukowiecki G. A method for the measurement of diffusion constant suitable for studies of non-occluded skin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1977; 29: 108-109.

Franz T. The finite dosis technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption. *Curr Prob Dermatol* 1978; 7: 58-68.

Franz T. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *Journal of Investigative Dermatology* 1975; 64: 190-195.

Garson J, Doucet J, Léveque J y Tsoucaris G. Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction. *Journal of Investigative Dermatology* 1991; 96: 43-49.

Gomez C, Costela A, Garcia-Moreno I, Llanes F, Teijon JM y Blanco D. Laser treatments on skin enhancing and controlling transdermal delivery of 5-fluorouracil. *Lasers in Surgery and Medicine* 2008; 40 (1): 6-12.

González Hernández I, López Guerra RL, Hernández Parets M, Alfonso Hidalgo A, Arias Gallardo AI y Jiménez Hernández L. Neurolépticos en el tratamiento de la esquizofrenia paranoide del paciente hospitalizado. *Revista Cubana de Farmacia* 2008; 42: 0-0.

Gratieri T, Kalaria D y Kalia YN. Non-invasive iontophoretic delivery of peptides and proteins across the skin. *Expert opinion on drug delivery* 2011; 8 (5): 645-663.

Hadgraft J. In: *Prodrugs and skin absorption* ed., Elsevier Design of prodrugs 1985: 271-289.

Hadgraft J, Walters K y Wotton P. Facilitated transport of sodium salicylate across an artificial lipid membrane by azone. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1993; 45: 414-418.

Hales RE y Yudofsky SC. *Tratado de psiquiatría clínica*. Masson 2005.

Hamalainen M, Hoppu K, Valkeila E y Santavuori P. Ibuprofen or acetaminophen for the acute treatment of migraine in children: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. *Neurology* 1997; 48: 103-107.

Hansen P, De Vries P y Saxena P. Triptans in migraine. A comparative review of pharmacology, pharmacokinetics and efficacy. *Drugs* 2000; 60: 1259-1287.

Hatanaka T, Inuma M, Sugibayashi K y Morimoto Y. Prediction of skin permeability of drugs. I. Comparison with artificial membrane. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1990; 38: 3452-3459.

HCS. *The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition*. *Cephalalgia* 2004; 24: 9-160.

Heard CM, Kung D y Thomas CP. Skin penetration enhancement of mefenamic acid by ethanol and 1,8-cineole can be explained by the 'pull' effect. *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 321 (1-2): 167-170.

Hori M, Satoh S y Maibach H. Classification of penetration enhancers: a conceptual diagram. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1990; 42: 71-72.

Hsiao CY, Huang CH, Hu S, Ko YS, Sung HC y Huang SY. Skin pretreatment with lasers promotes the transdermal delivery of vitamin C derivatives. *Lasers in Medical Science* 2011; 26 (3): 369-376.

Iglesias F y Pascual J. Analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos en el tratamiento de la migraña. *Revista Española de Neurología* 1995; 23 (2): 157-161.

INFAC. *Tratamiento de la migraña*. INFAC 2003; 11 (4): 17-20.

Israil A, Ahmed S, Rahman KM, Uddin MJ, Dey SK, Battacharjee M, Mondal G, Ali MA, Alam MN, Miah AH y Uddin MS. Efficacy of amitriptyline, pizotifen and propranolol in the prevention of migraine. *Mymensingh medical journal : MMJ* 2013; 22 (1): 93-100.

Jablensky A, Sartorius N, Ernberg G, Anker M, Korten A, Cooper JE, Day R y Bertelsen A. Schizophrenia: manifestations, incidence and course in different cultures. *A World Health*

Organization ten-country study. *Psychological medicine. Monograph supplement* 1992; 20: 1-97.

Jacques SL, McAuliffe DJ, Blank IH y Parrish JA. Controlled removal of human stratum corneum by pulsed laser. *The Journal of investigative dermatology* 1987; 88 (1): 88-93.

Jenke D. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. I. Guidelines for Primary Validation Parameters. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 1996a; 19: 719-736.

Jenke D. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. II. Guidelines for Primary Validation Parameters. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 1996b; 19: 737-757.

Jhee SS, Salazar DE, Ford NF, Fulmor IE, Sramek JJ y Cutler NR. A double-blind, randomized, crossover assessment of blood pressure following administration of avitriptan, sumatriptan, or placebo to patients with mild to moderate hypertension. *Cephalalgia : an international journal of headache* 1999; 19 (2): 95-99.

Jiang SJ y Zhou XJ. Examination of the Mechanism of Oleic Acid-Induced Percutaneous Penetration Enhancement: an Ultrastructural Study. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2003; 26 (1): 66-68.

Joshi G, Petty C, Wozniak J, Faraone SV, Spencer AE, Woodworth KY, Shelley-Abrahamson R, McKillop H, Furtak SL y Biederman J. A prospective open-label trial of paliperidone monotherapy for the treatment of bipolar spectrum disorders in children and adolescents. *Psychopharmacology* 2013; 227 (3): 449-458.

Kaiho F, Nomura H, Makabe E y Kato Y. Percutaneous absorption of indomethacin from mixtures of fatty alcohol and propylene glycol (FAPG bases) through rat skin: effects of fatty acid added to FAPG base. *Maruzen* 1987; 35.

Kalbitz J, Neubert R y Wohlrab W. [Modulation of drug penetration in the skin]. *Die Pharmazie* 1996; 51 (9): 619-637.

Kalia YN, Naik A, Garrison J y Guy RH. Iontophoretic drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004; 56 (5): 619-658.

Kanikkannan N y Singh M. Skin permeation enhancement effect and skin irritation of saturated fatty alcohols. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 248 (1-2): 219-228.

Kim N, El-Khalili M, Henary MM, Strekowski L y Michniak BB. Percutaneous penetration enhancement activity of aromatic S, S-dimethyliminosulfuranes. *International Journal of Pharmaceutics* 1999; 187 (2): 219-229.

Kligman AM. Topical pharmacology and toxicology of dimethyl sulfoxide—part 1. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 1965; 193 (10): 796-804.

Knepp V, Hadgraft J y Guy R. Transdermal drug delivery: problems and possibilities. *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1987; 4: 13-37.

Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, Pon A, Banco K, Mak C, Neveu V, Djoumbou Y, Eisner R, Guo AC y Wishart DS. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. *Nucleic Acids Research* 2011; 39 (Database issue): DB01267.

Kozielska M, Johnson M, Pilla Reddy V, Vermeulen A, Li C, Grimwood S, de Greef R, Groothuis GM, Danhof M y Proost JH. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of the D(2) and 5-HT (2A) Receptor Occupancy of Risperidone and Paliperidone in Rats. *Pharmaceutical Research* 2012.

Kubota K y Yamada T. Finite dose percutaneous drug absorption: theory and its application to in vitro timolol permeation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1990; 79: 1015-1019.

Larrucea E, Arellano A, Santoyo S y Ygartua P. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2001; 52 (2): 113-119.

Lee S, Kollias N, McAuliffe DJ, Flotte TJ y Doukas AG. Topical drug delivery in humans with a single photomechanical wave. *Pharmaceutical Research* 1999; 16 (11): 1717-1721.

Leira R y Noya M. Eficacia clínica del Zolmitriptán en la migraña. *Revista de Neurología* 1998; 13 (2): 16-24.

Leira R y Pascual J. Nuevos fármacos en Neurología: Rizatriptán. *Revista de Neurología* 2000; 15: 22-30.

Lewis D y Hadgraft J. Mixed monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine with Azone® or oleic acid at the air-water interface. *International Journal of Pharmaceutics* 1990; 65: 211-218.

Lipton RB, Bigal ME, Diamond M, Freitag F, Reed ML, Stewart WF y on behalf of the AMPP Advisory Group. Migraine prevalence, disease burden, and the need for preventive therapy. *Neurology* 2007; 68 (5): 343-349.

Lister AS. In: Validation of HPLC methods in pharmaceutical analysis ed., Elsevier Inc. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC 2005; 6: 191-217.

Liu H, Li S, Wang Y, Yao H y Zhang Y. Effect of vehicles and enhancers on the topical delivery of cyclosporin A. International Journal of Pharmaceutics 2006; 311 (1-2): 182-186.

Liu P, Kurihara-Bergstrom T y Good WR. Cotransport of Estradiol and Ethanol Through Human Skin in Vitro: Understanding the Permeant/Enhancer Flux Relationship. Pharmaceutical Research 1991; 8 (7): 938-944.

Locatelli I, Mrhar A y Grabnar I. Simultaneous determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone enantiomers in human blood plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2009; 50 (5): 905-910.

López A, Llinares F, Cortell C y Herráez M. Comparative enhancer effect of Span® 20 with Tween® 20 and Azone® on the in vitro percutaneous penetration of compounds with different lipophilities. International Journal of Pharmaceutics 2000; 202: 133-140.

Lopez Ibor Aliño JJ y Valdés Miyar M. Dsm-iv-tr : manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (texto revisado). Masson 2010.

Lluch Fernández MD. In: Cefaleas de origen intracraneal ed., Anales Españoles de Pediatría, Libro de Actas II. 1997: 184-186.

MacGregor A y Wikinson M. La migraña y otras cefaleas. Síntomas, causas, diagnóstico, estilo de vida, fármacos, terapias. Ediciones B 1999.

Mandrioli R, Mercolini L, Lateana D, Boncompagni G y Raggi MA. Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV. Journal of Chromatography B 2011; 879 (2): 167-173.

Marro D, Guy R y Delgado-Charro M. Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin. J Control Release 2001; 70 (1-2): 213-217.

Martínez Eizaguirre J. Migraña: epidemiología, fisiopatología y diagnóstico. FMC 1999; 6 (10): 21-29.

McCloughen A. The association between schizophrenia and cigarette smoking: A review of the literature and implications for mental health nursing practice. International Journal of Mental Health Nursing 2003; 12 (2): 119-129.

Medić-Šarić MM, Ana; Badovinac-Črnjević, Tanja; Jasprica, Ivona. Experimental and Calculation Procedures for Molecular Lipophilicity: Comparative Study for 3, 3'-(2-methoxybenzylidene)bis[4-hydroxycoumarin]. *Croatica chemica acta* (0011-1643) 2004; 77 (1-2): 367-370.

Megrab N, Willianls A y Barry B. Oestradiol permeation across human skin. silastic and snake skin membranes: the effects of ethanol/water co-solvent systems. *International Journal of Pharmaceutics* 1995; 116: 101-112.

Miller JC MJN. *Statistics for Analytical Chemistry*. Ellis Horwood Ltd 1993.

Moghimi H, Williams A y Barry B. Enhancement by terpenes of 5-fluorouracil permeation through the stratum corneum: Model solvent approach. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1998; 50: 955-964.

Newman-Tancredi A, Conte C, Chaput C, Verrière L, Audinot-Bouchez V, Lochon S, Lavielle G y Millan M. Agonist activity of antimigraine drugs at recombinant human 5-HT_{1A} receptors: potential implications for prophylactic and acute therapy. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1997; 355 (6): 682-688.

Nussbaum Abraham M y Stroup TS. Oral paliperidone for schizophrenia. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008; (2): 137-144.

Obata Y, Takayama K, Machida Y y Nagai T. Combined effect of cyclic monoterpenes and ethanol on percutaneous absorption of Diclofenac Sodium. *Drug Desing and Discovery* 1991; 8: 137-144.

OECD. Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method. OECD Publishing 1995.

Ohara N, Takayama K y Nagal T. Combined effect of d-limonene pretreatment and temperature on the rat skin permeation of lipophilic and hydrophilic drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 1995; 18: 439-442.

Okabe H, Obata Y, Takayama K y Nagai T. Percutaneous absorption enhancing effect and skin irritation of monocyclic monoterpenes. *Drug Design and Delivery* 1990; 6: 229-238.

Okamoto H, Hasbida M y Sezaki H. Structure-activity relationship of 1-alkyl- or 1-alkenylazacycloalkanone derivates as percutaneous penetrations enhancers. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1991: 39-45.

Olesen J. A review of current drugs for migraine. *Journal of Neurology* 1991; 238: S23-S27.

Ongpipattanakul B, Burnette R, Potts R y Francoeur M. Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids. *Pharmaceutical Research* 1991; 7: 350-354.

Osamu Shirakura, Akira Ohshima, Shinobu Tsunemi, Sueaki Ishimaru, Takashi Sakaguchi, Kozo Takayama y Tsuneji Nagai. Synergistic Effect of d-Limonene and Ethanol on the Transdermal Permeation of NB-818. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1995; 21 (4): 411-425.

Ota Y, Hamada A, Nakano M y Saito H. Evaluation of percutaneous absorption of midazolam by terpenes. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2003; 18 (4): 261-266.

Palencia R. Migrañas en la infancia. *Anales Españoles de Pediatría* 1985; 22 (4): 317-322.

Pandina GJ, Lindenmayer JP, Lull J, Lim P, Gopal S, Herben V, Kusumakar V, Yuen E y Palumbo J. A randomized, placebo-controlled study to assess the efficacy and safety of 3 doses of paliperidone palmitate in adults with acutely exacerbated schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 2010; 30 (3): 235-244.

Park ES, Chang SJ, Rhee YS y Chi SC. Effects of adhesives and permeation enhancers on the skin permeation of captopril. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2001; 27 (9): 975-980.

Pascual Gómez J. Migraña. Masson 2001.

Pascual J y Castro M. Fisiopatología de la migraña. *Neurología* 1998; 13 (1): 29-32.

Peh K, Khan T y Ch'ng H. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 2000; 3 (3): 303-311.

Phipps JB, Padmanabhan RV y Lattin GA. Iontophoretic delivery of model inorganic and drug ions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1989; 78 (5): 365-369.

Priborsky J y Muhlbachova E. Evaluation of in-vitro percutaneous absorption across human skin and in animal models. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 1990; 42 (7): 468-472.

Radat F. [Stress and migraine]. *Revue Neurologique* 2013; 169 (5): 406-412.

Rahman SM, Lutfulkibir A, Jahan MD, Momen AZ y Rouf AS. Validation and application of reversed phase high-performance liquid chromatographic method for quantification of pizotifen malate in pharmaceutical solid dosage formulations. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; 23 (4): 435-441.

Reddy LH y Ghosh B. Enhancer aided in vitro permeation of atenolol and prazosin hydrochloride through mice skin. *Indian Journal of Experimental Biology* 2001; 39 (1): 47-51.

Rizwan M, Aqil M, Ahad A, Sultana Y y Ali MM. Transdermal delivery of valsartan: I. Effect of various terpenes. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2008; 34 (6): 618-626.

Rojas L y Espínola M. Profilaxis de la migraña infantil con Ciproheptadina en una serie de 59 casos. *Rev. Paraguay Pediatría* 2000; 27 (1): 1.

Rudy B y Senkowski B. *Analytical Profiles of Drug Substances*. Academic Press 1973; 2: 221-224.

Sage BH, Jr. Model systems in iontophoresis--transport efficacy. *Acta pharmaceutica Nordica* 1992; 4 (2): 123.

Saladin PM, Zhang BD y Reichert JM. Current trends in the clinical development of peptide therapeutics. *IDrugs : the investigational drugs journal* 2009; 12 (12): 779-784.

Sarpotdar PP, Gaskill JL y Giannini RP. Effect of polyethylene glycol 400 on the penetration of drugs through human cadaver skin in vitro. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1986; 75 (1): 26-28.

Schatzberg AF y Nemeroff CS. *Tratado de psicofarmacología*. Elsevier : Masson 2006.

Scheuplein R. Mechanism of percutaneous absorption. I. Routes of penetration and the influence of solubility. *J Invest Dermatol* 1965; 45: 334-346.

Scheuplein R y Blank I. Mechanism of percutaneous absorption. IV. Penetration of nonelectrolytes (alcohols) from aqueous solutions and from pure liquids. *Journal of Investigative Dermatology* 1973; 60: 286-296.

Scheuplein R y Ross L. Effects of Surfactants and Solvents on the Permeability of Epidermis *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 1970; 21 (13): 853-873.

Schuetz YB, Naik A, Guy RH, Vuaridel E y Kalia YN. Transdermal iontophoretic delivery of vapreotide acetate across porcine skin in vitro. *Pharmaceutical Research* 2005; 22 (8): 1305-1312.

Schultz SH, North SW y Shields CG. Schizophrenia: a review. *American family physician* 2007; 75 (12): 1821-1829.

Shen SC, Lee WR, Fang YP, Hu CH y Fang JY. In vitro percutaneous absorption and in vivo protoporphyrin IX accumulation in skin and tumors after topical 5-aminolevulinic acid application with enhancement using an erbium:YAG laser. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 95 (4): 929-938.

Shidhaye S, Saindane N, Sutar S y Kadam V. Mucoadhesive Bilayered Patches for Administration of Sumatriptan Succinate. *AAPS PharmSciTech* 2008; 9 (3): 909-916.

Sillanpaa M y Pirjo Anttila M. Increasing prevalence of headache in 7-year-old schoolchildren. *Headache* 1996; 36: 466-470.

Singh BN, Singh RB y Singh J. Effects of ionization and penetration enhancers on the transdermal delivery of 5-fluorouracil through excised human stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics* 2005; 298 (1): 98-107.

Snorraddottir BS, Gudnason PI, Scheving R, Thorsteinsson F y Masson M. Release of anti-inflammatory drugs from a silicone elastomer matrix system. *Die Pharmazie* 2009; 64 (1): 19-25.

Snow V, Weiss K, Wall EM y Mottur-Pilson C. Pharmacologic Management of Acute Attacks of Migraine and Prevention of Migraine Headache. *Annals of Internal Medicine* 2002; 137 (10): 840-849.

Somasundaran P. *Encyclopedia of surface and colloid science*. Taylor & Francis 2006.

Southwell D y Barry BW. Penetration enhancers for human skin: mode of action of 2-pyrrolidone and dimethylformamide on partition and diffusion of model compounds water, n-alcohols, and caffeine. *The Journal of investigative dermatology* 1983; 80 (6): 507-514.

Speight T y Avery G. Pizotifen (BC-105): A Review of its Pharmacological Properties and its Therapeutic Efficacy in Vascular Headaches. *Drugs* 1972; 3 (3-4): 159-203.

Sugibayashi K, Nemoto M y Morimoto Y. Effect of several penetration enhancers on the percutaneous absorption of indomethacin in hairless rat. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1988; 36: 1519-1528.

Tanojo H, BosvanGeest A, Bouwstra J, Junginger H y Bodde H. In vitro human skin barrier perturbation by oleic acid: thermal analysis and freeze fracture electron microscopy studies. *Thermochemica Acta* 1997; 293 (1): 77-85.

Tanojo H, Bouwstra J, Junginger H y Boddé H. Thermal Analysis Studies on Human Skin and Skin Barrier Modulation by Fatty Acids and Propylene Glycol. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 1999; 57 (1): 313-322.

Tanojo H, Bouwstra JA, Junginger HE y Boddé HE. In Vitro Human Skin Barrier Modulation by Fatty Acids: Skin Permeation and Thermal Analysis Studies. *Pharmaceutical Research* 1997; 14 (1): 42-49.

Tashtoush BM, Al-Safi SA y Al-Fanek KJ. Azathioprine transport through rat skin and its immunosuppressive effect. *Pharmazie*. 2004; 59 (2): 143-146.

Teikemeier G y Goldberg DJ. Skin resurfacing with the erbium:YAG laser. *Dermatologic Surgery* 1997; 23 (8): 685-687.

Tepper SJ y Spears RC. Acute treatment of migraine. *Neurologic Clinics* 2009; 27 (2): 417-427.

Tetko IV, Gasteiger J, Todeschini R, Mauri A, Livingstone D, Ertl P, Palyulin VA, Radchenko EV, Zefirov NS, Makarenko AS, Tanchuk VY y Prokopenko VV. Virtual computational chemistry laboratory--design and description. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 2005; 19 (6): 453-463.

Tharyan P y Adams Clive E. Electroconvulsive therapy for schizophrenia. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2005; (2).

Thomas N y Panchagnula R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of vehicles on permeation across rat skin and their mechanism of action. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003; 18: 71-79.

Toldo I, De Carlo D, Bolzonella B, Sartori S y Battistella PA. The pharmacological treatment of migraine in children and adolescents: an overview. *Expert Review of Neurotherapeutics* 2012; 12 (9): 1133-1142.

Trommer H y Neubert RH. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacology and Physiology* 2006; 19 (2): 106-121.

Vallejo Ruiloba J y Pascual Ballú C. *Introducción a la psicopatología y a la psiquiatría*. Masson 2006.

van de Sandt JJ y Rutten AA. Differential effects of chemical irritants in rabbit and human skin organ cultures. *Toxicology in Vitro* 1995; 9 (2): 157-168.

van Os J y Kapur S. Schizophrenia. *The Lancet* 374 (9690): 635-645.

Vander Heyden Y, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste B y Massart D. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001; 24 (5-6): 723-753.

Vermeir M, Naessens I, Remmerie B, Mannens G, Hendrickx J, Sterkens P, Talluri K, Boom S, Eerdeken M, van Osselaer N y Cleton A. Absorption, metabolism, and excretion of paliperidone, a new monoaminergic antagonist, in humans. *Drug Metabolism and Disposition* 2008; 36 (4): 769-779.

Wang KH, Fang JY, Hu CH y Lee WR. Erbium:YAG laser pretreatment accelerates the response of Bowen's disease treated by topical 5-fluorouracil. *Dermatologic Surgery* 2004; 30 (3): 441-445.

Ward A y Tallon R. Penetration enhancer incorporation in bilayers. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1988; 14: 1155-1166.

Wertz P y Downing D. In: *Stratum corneum: biological and biochemical considerations* ed., Marcel Dekker, Inc Transdermal Drug Delivery 1989: 1-22.

Wester R y Maibach H. In: *Penetration enhancement by skin hydration* ed., CRC Press Percutaneous Penetration Enhancers 1995: 21-28.

Williams A. Skin absorption enhancers. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1992; 2: 305-353.

Williams A y Barry B. The enhancement index applied to terpene penetration enhancers for human skin and modellipophilic (oestradiol) and hydrophilic (5-fluorouracil) drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 1991a; 74: 157-168.

Williams A y Barry B. Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Pharmaceutical Research* 1991b; 8: 17-24.

Williams AC. *Transdermal and Topical Drug Delivery: From theory to clinical practice*. Pharmaceutical Press 2003.

Williams AC y Barry BW. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004; 56: 603-618.

Yoon M, Savidou I, Diener H y Limmroth V. Evidence-based medicine in migraine prevention. *Expert Rev Neurother* 2005; 5 (3): 333-341.

Yu J, Bachhav YG, Summer S, Heinrich A, Bragagna T, Böhler C y Kalia YN. Using controlled laser-microporation to increase transdermal delivery of prednisone. *Journal of Controlled Release* 2010; 148 (1): e71-e73.

Yu J, Kalaria DR y Kalia YN. Erbium:YAG fractional laser ablation for the percutaneous delivery of intact functional therapeutic antibodies. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2011; 156 (1): 53-59.

Zhang G, Jr AV y Bartlett MG. Bioanalytical methods for the determination of antipsychotic drugs. *Biomedical Chromatography* 2008; 22 (7): 671-687.

Zhang G, Terry AV, Jr. y Bartlett MG. Simultaneous determination of five antipsychotic drugs in rat plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical Life Sciences* 2007; 856 (1-2): 20-28.

