

Estudio de la absorción transdérmica de
fármacos para la migraña

Study of the transdermal absorption of
drugs for migraine

Memoria que, para optar al grado de Doctor
con Mención Internacional, presenta:
Dña. María Aracely Calatayud Pascual



CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

*Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias de la Salud*

La Memoria del trabajo de investigación para la obtención del grado de Doctor Internacional realizada por Dña. María Aracely Calatayud Pascual titulada "Estudio de la absorción transdérmica de fármacos para la migraña" ha sido realizada bajo la dirección de Dña. Alicia Cristina López Castellano, Profesora Agregada del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad CEU Cardenal Herrera y de 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 5 de junio de 2013

Dña. Alicia C. López Castellano

Dña. Virginia Merino Sanjuán

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a una beca para la Formación de Personal Universitario (FPU) concedida por el Ministerio de Educación (AP2007-03456) y una beca para la Formación de Personal Docente e Investigador (FPDI) de la Universidad CEU Cardenal Herrera, así como gracias a las ayudas a la realización de Proyectos de Investigación financiados por el Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad y Consumo (PI060108) y la Universidad CEU Cardenal Herrera (PRCEU-UCH34/10).

Índice

Capítulo I. Introducción y objetivos	1
Capítulo II. Antecedentes	7
1. La migraña	7
2. Administración transdérmica de fármacos	21
2.1. Ventajas e inconvenientes	21
2.2. La piel y sus anexos. Fisiología y funciones	23
2.3. Vías de penetración cutánea	30
2.4. Factores implicados en la absorción transdérmica	32
3. Métodos experimentales <i>in vitro</i> para el estudio de la absorción transdérmica	38
3.1. Modelos animales como alternativa a la piel humana	39
3.2. Células de difusión con membrana limitante	40
3.3. Técnicas experimentales	42

3.4. Dermatofarmacocinética	44
4. Métodos para incrementar la absorción transdérmica de fármacos	47
4.1. Promotores químicos	49
4.2. Iontoforesis	55
 Capítulo III. Validación de dos métodos analíticos para la determinación del nadolol e hidrocloreuro de propranolol	 65
1. Introducción	65
2. Materiales y métodos	67
3. Resultados y discusión	73
 Capítulo IV. Estudio de la absorción transdérmica <i>in vitro</i> del nadolol e hidrocloreuro de propranolol	 87
1. Introducción	87
2. Materiales y métodos	90
3. Resultados y discusión	107
 Capítulo V. Dermatofarmacocinética del nadolol e hidrocloreuro de propranolol	 145
1. Introducción	145
2. Materiales y métodos	146
3. Resultados y discusión	159
 Capítulo VI. Aplicación de iontoforesis en la absorción transdérmica <i>in vitro</i> de malato de almotriptán	 185
1. Introducción	185
2. Materiales y métodos	186
3. Resultados y discusión	193

Capítulo VII. Resumen y conclusiones. Abstract and conclusions	205
1. Resumen y conclusiones	205
2. Abstract and conclusions	210
Capítulo VIII. Bibliografía	215

Capítulo I **Introducción y objetivos**

En los últimos años, los conocimientos acerca de la estructura y funciones de la piel han progresado significativamente. La piel es un órgano complejo que protege al huésped de su ambiente y, al mismo tiempo, permite la interacción del organismo con el ambiente circundante. Es mucho más que un escudo estático e impenetrable contra las agresiones externas. La piel es una estructura dinámica y compleja integrada por células, tejidos y elementos de la matriz extracelular que median una variedad de funciones como ser barrera física de permeabilidad, proteger contra los agentes infecciosos y la luz ultravioleta, reparar heridas, la termorregulación, órgano sensorial y delimitar la apariencia física externa. Estas diferentes funciones de la piel están influidas por una o varias de sus principales regiones. Mientras que la epidermis y su capa más exterior, el estrato córneo, constituyen una gran parte de la barrera física que proporciona la piel, la integridad estructural de la misma está constituida principalmente por la dermis y la hipodermis.

La barrera cutánea es el primer obstáculo que tiene que superar una sustancia aplicada en la piel para poder acceder a los tejidos vitales. Por lo general no permite que ninguna sustancia difunda con facilidad; sin embargo, casi todas las moléculas se absorben en cierta medida. Con la aplicación de una sustancia en la piel se pretende obtener un efecto puramente estético o específicamente terapéutico. Si se considera la segunda

alternativa, la respuesta a la aplicación tópica de un fármaco surge de acontecimientos que dependen de las propiedades del fármaco y del organismo.

En la actualidad, la piel ya no se considera una barrera inaccesible al paso de fármacos, sino una membrana con permeabilidad selectiva. Este concepto ha influido directamente en la preparación de formulaciones dermatológicas y ha establecido las bases para el empleo de la piel como una vía de administración de preparaciones con efectos sistémicos, dando lugar al desarrollo de nuevas formas farmacéuticas que presentan importantes ventajas. Entre éstas podemos destacar a los sistemas terapéuticos de administración transdérmica (STAT) cuyo fundamento común es la liberación controlada de fármacos, que hace que el paciente reciba de forma continua una determinada cantidad de principio activo, manteniendo niveles sanguíneos constantes, lo que supone grandes ventajas para el paciente. De hecho, se encuentran comercializados STATs de fármacos con fentanilo, nicotina, escopolamina, testosterona, estradiol (con o sin levonogestrel), nitroglicerina, clonidina, rivastigmina, oxibutinina, lidocaína o diclofenaco (Banga, 2011; Roberts y Walters, 2008; Walters, 2002). Algunos de ellos se pueden incluso emplear en la población infantil y adolescente, como la nicotina para el tratamiento del síndrome neurológico de Tourette (Shytle y col., 2002) o el fentanilo para la prevención del síndrome iatrogénico de abstinencia a opiáceos y control a largo plazo del dolor crónico grave en niños que estén recibiendo tratamiento con opioides (Johnson y col., 2010) o para aliviar el dolor en cuidados paliativos (Hunt y col., 2001; Paut y col., 2000). Asimismo, se han desarrollado sistemas específicos para la población infantil como el de metilfenidato para el tratamiento del trastorno de hiperactividad y falta de atención en la infancia (Ashkenasi, 2011).

El trabajo que se describe en la presente memoria forma parte de un amplio proyecto de investigación financiado por el Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad y Consumo (PI060108) y la Universidad CEU Cardenal Herrera (PRCEU-UCH34/10), cuyo objetivo es desarrollar sistemas terapéuticos de administración transdérmica que puedan ser empleados en el tratamiento de la migraña. Para ello, parte de dicho estudio se ha realizado en colaboración con la University of Bath (Reino Unido) en el Department of Pharmacy & Pharmacology de la Faculty of Science de dicha Universidad, gracias a la ayuda concedida por la Universidad CEU Cardenal Herrera para la realización de Estancias Predoctorales en centros de investigación nacionales o extranjeros.

La migraña, trastorno crónico que cursa con dolor de cabeza, figura entre las enfermedades neurológicas más frecuentes en los últimos años (Pistoia y col., 2013; Pozo-Rosich, 2012), afectando a un importante porcentaje de la población. Según la frecuencia e intensidad de las crisis migrañosas, se recomienda el empleo de fármacos para la prevención, tales como los beta-bloqueantes, o una terapia específica para el tratamiento sintomático como son los agonistas de receptores 5-HT₁ de la serotonina (Evers y col., 2011; GECSSEN, 2006).

El nadolol y propranolol, los dos fármacos beta-bloqueantes elegidos en este estudio, se mantienen en la terapia preventiva como primera elección, debido a su elevada eficacia y baja incidencia de efectos secundarios (Pascual, 2001; Pringsheim y col., 2012). Asimismo, se ha elegido un tercer fármaco, el almotriptán, un agonista selectivo de los receptores de serotonina, cada vez más utilizado en el tratamiento sintomático por su tolerancia y eficacia. Su perfil de seguridad perfectamente establecido le ha permitido obtener la aprobación por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de migraña en adolescentes y niños (Díaz-Insa y col., 2011; Rob Harris, 2009). Estos tres fármacos se comercializan en el mercado farmacéutico como preparados orales con bajas biodisponibilidades debido a diversas causas: efecto de primer paso hepático y absorción incompleta en el tubo digestivo (Flórez, 2008).

Por ello, como hipótesis de partida se planteó la posibilidad de utilizar la vía transdérmica para el tratamiento preventivo y agudo de la migraña. En este sentido, vías de administración de medicamentos como la transdérmica son relativamente novedosas y susceptibles de ser empleadas en la administración de una gran variedad de principios activos como pueden ser los beta-bloqueantes y los triptanes. Además, en las últimas décadas, la vía transdérmica de administración de fármacos ha demostrado ser una alternativa válida frente a otras vías de administración, como la oral o la parenteral.

Fundamentándonos en estas consideraciones, el objetivo general de este trabajo es el desarrollo de dos formas farmacéuticas alternativas a las ya existentes que permitan utilizar la vía de administración transdérmica para el tratamiento preventivo y agudo de la migraña, patología que se destaca por ejercer un impacto negativo sobre la calidad de vida de la persona que la padece. La aparición de una forma de administración transdérmica de nadolol y/o propranolol (prevención de las crisis) y almotriptán (supresor de los ataques) supondría una administración no traumática del fármaco y podría mejorar el tratamiento de

la migraña de un modo notable. Por una parte supondría un aumento de la biodisponibilidad respecto a las formas farmacéuticas orales, por otra incrementaría la aceptación del tratamiento por parte del paciente crónico facilitando la tolerancia y adherencia del paciente al mismo.

En la actualidad, 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 (Rizwan y col., 2009; Subedi y col., 2010). Ello se debe a que la mayoría de los fármacos destinados a ser administrados vía transdérmica deben cumplir una serie de características bastante restrictivas. 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 eficaces. Sin embargo, debido a que estos requerimientos no los presentan todos los fármacos, es importante intentar incrementar la penetración de los fármacos a través de la piel reduciendo la función barrera del estrato córneo. Entre las estrategias promotoras destacan el empleo de sustancias químicas de diversa naturaleza, conocidas por su excelente capacidad de alterar las propiedades de barrera de la piel, y por tanto actuar como promotores de la absorción transdérmica (Barry 1987; Hadgraft y Walters, 1992); así como la iontoforesis, método físico no invasivo, que produce un aumento en la absorción transdérmica de fármacos al aplicar una pequeña corriente eléctrica durante un periodo de tiempo relativamente corto (Guy y col., 2000; Nanda y col., 2006).

Dado que la mayoría de técnicas de promoción de la absorción transdérmica de fármacos comprometen, en mayor o menor medida, la función barrera de la piel, se requiere una evaluación de la reversibilidad de sus efectos sobre la misma. En este sentido, la dermatofarmacocinética permite cuantificar el fármaco en el estrato córneo, determinar los parámetros farmacocinéticos del fármaco que difunde a su través e investigar la integridad del estrato córneo mediante la cuantificación del mismo (Escobar-Chávez y col., 2008; Russell y col., 2008).

Por lo tanto, puesto que se trata de estudiar la absorción transdérmica de tres fármacos, dos fármacos análogos beta-bloqueantes y el almotriptán por otra parte, el trabajo se ha planteado con los siguientes objetivos concretos:

1. Conocer la absorción intrínseca *in vitro* del nadolol e hidrocloreuro de propranolol a través de la piel utilizando como modelo de membrana piel de cerdo, con el fin de evaluar la posibilidad de su administración transdérmica y diseñar una posible formulación. Con este fin, se pretende:
 - a. Desarrollar y validar dos métodos analíticos, rápidos y sencillos, capaces de cuantificar ambos beta-bloqueantes presentes en las muestras procedentes de los ensayos de difusión transdérmica.
 - b. Estudiar las estrategias para incrementar la absorción transdérmica de los fármacos (promotores químicos e iontoforesis).
 - c. Determinar los parámetros dermatofarmacocinéticos en diferentes condiciones experimentales, con la finalidad de caracterizar su paso a través del estrato córneo y determinar la función barrera de la piel cuando se produce la difusión transdérmica del nadolol y propranolol, y completar así la evaluación de la absorción transdérmica de ambos fármacos.

2. Estudiar *in vitro* la viabilidad de una administración iontoforética del antimigrañoso malato de almotriptán, así como identificar aquellas variables que controlan su electrotransporte.

Capítulo II **Antecedentes**

1. La migraña

La cefalea o dolor de cabeza es una de las patologías más frecuentes en la práctica clínica y motivo principal de las consultas neurológicas (Friedman y Lipton, 2011; Steiner, 2013). En muchos casos obliga al paciente a abandonar su trabajo y limita sus actividades familiares y sociales, provocando además absentismo laboral. Según un estudio epidemiológico reciente, más del 80% de la población mundial refiere haber tenido cefalea en algún momento de su vida y el 64% sufre cefalea crónica de algún tipo (Manzoni y col., 2010). En este contexto, la migraña, un tipo de cefalea, destaca por su frecuencia y por el impacto negativo que ejerce sobre la calidad de vida de la persona que la padece (Lantéri-Minet y col., 2011; Pistoia y col., 2013). Asimismo, su prevalencia aumenta con la edad, afectando a un importante porcentaje de la población, de hecho, una de cada cinco personas la padece (Benemei y col., 2009; Pozo-Rosich, 2012). En nuestro país, se estima que afecta aproximadamente a un 12.6% de la población, siendo de 2 a 4 veces más frecuente en la mujer que en el hombre (Matías-Guiu y col., 2011).

Clasificación de las cefaleas

El Comité de Clasificación de la Sociedad Internacional de Cefaleas establece una clasificación aceptada y de obligada referencia en la actualidad, ICHD-II (Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society, 2004).

Según el perfil temporal y el origen, la ICHD-II divide el dolor de cabeza en cefaleas primarias, secundarias y en neuralgias craneales, contemplando 14 grupos de dolor de cabeza (tabla 1) que, a su vez, se dividen en diferentes subgrupos (clasificación jerárquica).

Clasificación Internacional de las Cefaleas
<p>Cefaleas primarias</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Migraña 2. Cefalea tensional 3. Cefalea en racimos y otras cefaleas trigémino-autonómicas 4. Otras cefaleas primarias
<p>Cefaleas secundarias, atribuidas a</p> <ol style="list-style-type: none"> 5. Traumatismo craneal, cervical o ambos 6. Trastorno vascular craneal o cervical 7. Trastorno intracraneal no vascular 8. Administración de una sustancia o supresión de la misma 9. Infección. 10. Trastorno de la homeostasis. 11. Trastorno del cráneo, cuello o estructuras faciales-craneales 12. Trastorno psiquiátrico
<p>Neuralgias, dolor central y facial primario y otras cefaleas</p> <ol style="list-style-type: none"> 13. Neuralgias craneales y causas centrales de dolor facial 14. Otros tipos de cefalea, neuralgia craneal y dolor facial central o primario

Tabla 1. Clasificación Internacional de las Cefaleas (ICHD), 2ª edición.

Las cefaleas primarias (tabla 2), 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%). Las cefaleas secundarias sin embargo representan sólo el 5% restante.

Cefaleas primarias				
	Migraña	Por tensión	En racimos	
Edad de inicio	Desde la pubertad	Cualquier edad	20-40 años	
Duración	4 horas-3 días	de horas a varios días	15-100 minutos	
Frecuencia	1 vez/año 2 veces/semana	1 vez/mes 15 días/mes	1 vez/día	
Prevalencia	Mujer>Hombre	Mujer>Hombre	Hombre>Mujer	
Intensidad	Moderado-Intenso	Moderado	Muy intenso	
Localización				
Síntomas asociados	Náuseas, vómitos, fotofobia, sensibilidad al ruido	Posibles náuseas	Rojez ocular, lagrimeo, rinorrea, párpados caídos	
Características asociadas	Se agrava con actividad física	Dolor en músculos faciales	Nocturno principalmente	

Tabla 2. Características de las cefaleas primarias.
Imágenes reproducidas de www.adamimages.com.

La migraña es un síndrome de prevalencia familiar y es la cefalea 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. Por ello, a fin de realizar un correcto tratamiento y obtener un buen control de las crisis migrañosas es importante conocer las formas clínicas en las que puede aparecer.

A continuación, la tabla 3 expone la clasificación internacional de las migrañas (ICHD-II), según su presentación clínica y los conocimientos actuales de los procesos fisiopatológicos subyacentes. En general, las migrañas se clasifican en dos grupos según la presencia o ausencia de aura; la migraña sin aura conocida como migraña común es la más frecuente (75% de los pacientes) y la migraña con aura (migraña clásica) constituye un 20% de los casos.

Clasificación de las Migrañas

Migraña sin aura**Migraña con aura**

- Aura típica con cefalea migrañosa
- Aura típica con cefaleas primarias
- Aura típica sin cefalea
- Migraña hemipléjica familiar
- Migraña hemipléjica esporádica
- Migraña basilar

Síndromes periódicos de la infancia que son precursores de la migraña

- Vómitos cíclicos
- Migraña abdominal
- Vértigo paroxístico benigno de la infancia

Migraña retiniana**Complicaciones de la migraña**

- Migraña crónica
- Estatus migrañoso
- Aura persistente sin infarto
- Infarto migrañoso
- Crisis epiléptica
- Vértigo paroxístico benigno de la infancia

Migraña probable

Tabla 3. Clasificación según la International Headache Society (2004).

Fisiopatología de la migraña

El ataque de migraña es un trastorno desencadenado por múltiples factores: psicológicos (estrés), ambientales (calor, luz, ruido y estímulos sensoriales fuertes), hormonales (menstruación), dietéticos (alcohol y tabaco), falta de sueño, actividad física, fármacos (caféina, anticonceptivos, nitroglicerina, etc.) y cambios neuroquímicos o neuroendocrinos (Pascual, 2001). Sin embargo, la patología de la migraña parece estar mediada por una vía común, la activación del sistema trigémino-vascular en el sistema nervioso central (Goadsby, 2009).

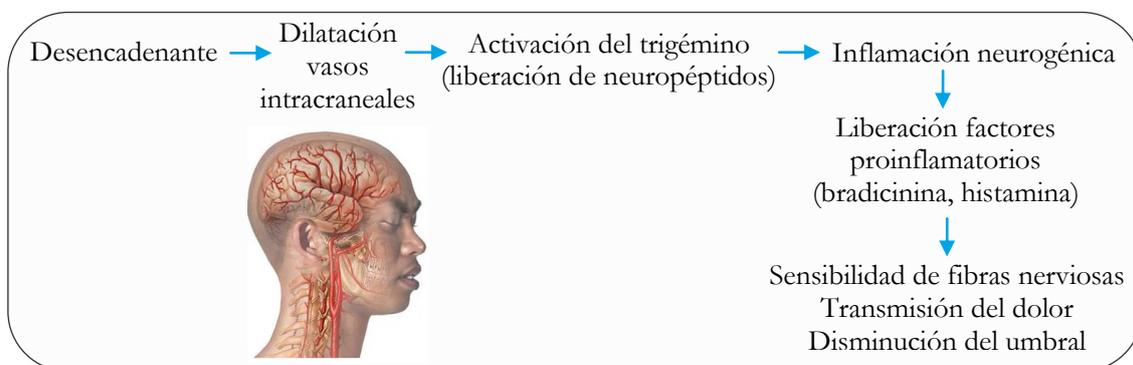


Figura 1. Fisiopatología del proceso migrañoso.
Imagen obtenida de www.adamimages.com.

Los fenómenos de inflamación y vasodilatación, están regulados por el neurotransmisor serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT). Dicho transmisor presenta dos subtipos de receptores que permiten un control del dolor, el subtipo 5-HT_{1B} localizado en los vasos sanguíneos de las meninges y cuya activación revertirá la vasodilatación y el 5-HT_{1D} situado a nivel del nervio trigémino responsable del control de la inflamación.

Una crisis de migraña se suele presentar en cuatro fases (Cady, 2008; Pascual y Castro, 1998).

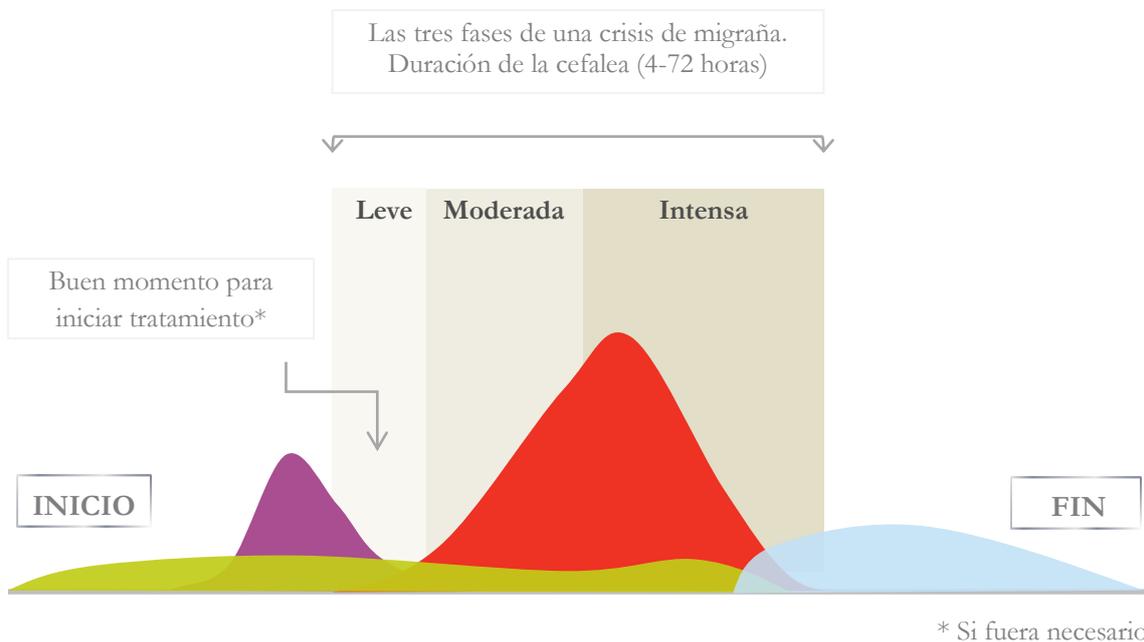


Figura 2. Fases de la migraña. Imagen adaptada (Cady, 2008).

↳ **Fase prodrómica.** Consiste en un periodo aproximado de 24 horas, previo al dolor de cabeza, en el que aparecen una serie de síntomas precoces que deben considerarse como una señal del inminente inicio de la crisis. Entre los síntomas emocionales destacan los cambios en el estado de ánimo, cansancio, euforia, reducción del nivel de alerta, sensación de inquietud e irritación y dificultad para la concentración. También se presentan algunos síntomas físicos en esta fase de precefalea: dolor y tensión muscular, retención de líquidos, bostezos repetitivos, ansia de comer, sensibilidad a la luz, ruidos u olores y congestión nasal.

↳ **Aura.** Una de cada cinco personas puede tener síntomas de "aura" durante la migraña. Puede alterar el equilibrio, la coordinación muscular, las sensaciones, el lenguaje o

la visión y durar desde minutos a una hora. Aparecen síntomas de diversa índole como neurológicos focales: 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.** Parte central de la migraña, en la que el síntoma importante es la cefalea. Es consecuencia de la activación del sistema trigémino-vascular que provoca una reacción inflamatoria que dilata las arterias de las meninges provocando la sensación de pulsatilidad típica del dolor migrañoso (figura 1). Además de la cefalea, el paciente suele experimentar náuseas, vómitos y aversión a luces brillantes, ruidos y olores intensos.

↳ **Fase de resolución.** Se inician unos síntomas emocionales como cambios en el estado de ánimo, depresión, un comportamiento eufórico debido al cese de los síntomas, reducción del nivel de alerta, cansancio, dificultades cognitivas y miedo a la reaparición de la cefalea. A su vez, el paciente presenta unos síntomas físicos tales como mareo, debilidad, rigidez en el cuello, lentitud de movimientos corporales, dolor ocular, sensibilidad a la luz, trastornos visuales, temblores y dolor torácico.

Tratamiento farmacológico

Las recomendaciones establecidas en la Guía oficial del Grupo de Estudio de Cefalea de la Sociedad Española de Neurología (GECSEN, 2006), indican que según la frecuencia de aparición de las crisis y su intensidad, se recomendará un tratamiento preventivo o profiláctico cuyo objetivo es reducir la frecuencia, gravedad y duración de los ataques o una terapéutica sintomática o supresora de la crisis. La tabla 4 muestra un resumen de fármacos empleados en la migraña (Evers y col., 2011).

Fármacos utilizados en el tratamiento de la migraña	
Preventivo	Sintomático
Beta-bloqueantes	Analgésicos y AINES
Propranolol	Paracetamol
Nadolol	Ácido acetilsalicílico
Atenolol	Naproxeno
Metoprolol	Ibuprofeno
	Ketoprofeno
Calcio-antagonistas	Ácido mefenámico
Flunarizina	
Nicardipino	Antieméticos
Nimodipino	Metoclopramida
Verapamilo	Domperidona
Antiserotoninérgicos	Ergotamínicos
Pizotifeno	Tartrato de ergotamina
Metisergida	Dihidroergotamina
Cicloheptadina	
Antidepresivos tricíclicos	Triptanes
Amitriptilina	Sumatriptán
Imipramina	Almotriptán
Fluoxetina	Zolmitriptán
	Naratriptán
Neuromoduladores	Frovatriptán
Valproato sódico	Rizatriptán
Topiramato	Eletriptán
Lamotriginina	

Tabla 4. Fármacos empleados en la migraña.

1. Tratamiento preventivo

Este tratamiento profiláctico aunque no es curativo mejora la calidad de vida de los pacientes. Se recomienda en monoterapia y durante un periodo de tiempo prolongado, entre 3 a 8 meses (MacGregor y Wikinson, 1999; Pascual, 2001; Pringsheim y col., 2012).

La indicación de un tratamiento pautado de forma mantenida para evitar la presentación de crisis de migraña es cada vez más usada en la actualidad y ésta puede evitar el desarrollo de muchas de las complicaciones evolutivas de la migraña (Abrams, 2013). La tabla 5 recoge las indicaciones y situaciones en las que, según el Grupo de Estudio de Cefaleas de la Sociedad Española de Neurología, es recomendable iniciar tratamiento preventivo en pacientes que sufren migraña.

La elección de un fármaco para la medicación profiláctica se basa en el conocimiento preciso del paciente y las crisis que padece, por un lado, y de los efectos colaterales y riesgos del medicamento a emplear.

Tratamiento preventivo Indicaciones y situaciones recomendadas
<ul style="list-style-type: none"> - Crisis con recurrencia del dolor o intensas y prolongadas - Frecuencias de crisis superior a 3-4/mes - Pacientes con contraindicaciones para el tratamiento sintomático - Por efectos adversos de los sintomáticos - Por razones de coste (tratamientos sintomáticos caros) - Cuando existe riesgo de abuso de fármacos o ya presente - Cuando el control de la crisis no es bueno a pesar de tratamiento adecuado

Tabla 5. Indicaciones y situaciones para la prevención según la Sociedad Española de Neurología.

Con dicho fin se emplean fármacos beta-bloqueantes, calcio-antagonistas, antidepresivos, antiepilépticos y antiserotoninérgicos entre otros (Evers y col., 2011; Flórez, 2008; Liaño, 1995; Pascual, 2012; Zarranz, 2003) (véase tabla 4).

Fármacos beta-bloqueantes. Son fármacos con acción bloqueante de los receptores beta-adrenérgicos que han tenido gran impacto y se mantienen en la terapia preventiva como primera elección, debido a su alto nivel de eficacia y baja incidencia de efectos secundarios (Pringsheim y col., 2012). Son especialmente adecuados cuando se asocian síntomas de ansiedad o estrés, en pacientes hipertensos y en los pacientes que además presenten temblor o hipertiroidismo. Además, un reciente trabajo implanta a estos fármacos como primera elección en la prevención de ascitis durante la descompensación provocada por cirrosis (Northup y Henry, 2012). Por el contrario, no deberán emplearse en enfermos con antecedentes de asma bronquial, enfermedad de Raynaud, insuficiencia y/o bloqueos cardíacos o diabetes. Su acción antimigrañosa fue descubierta al observarse la reducción en la frecuencia de las crisis migrañosas en pacientes tratados por insuficiencia coronaria con propranolol. Esta actividad también se ha confirmado para el nadolol, y con menor eficacia para el atenolol y metoprolol. En la tabla 6 se muestran las características farmacocinéticas de estos fármacos.

Propiedades farmacocinéticas de beta-bloqueantes					
	Dosis óptima (mg/día)	Biodisponibilidad (%)	T máx (h)	Vida media (h)	Metabolitos activos
Propranolol	40-160	~30	1-3	5	+
Nadolol	40-120	33	1-4	14	-
Atenolol	50-100	60	2-4	9	-
Metoprolol	100-200	50	0.5-2	4	+

Tabla 6. Características farmacocinéticas y perfil de eficacia de los beta-bloqueantes, por vía oral, empleados en la profilaxis de la migraña.

Nadolol y propranolol son antagonistas no selectivos de los receptores beta-adrenérgicos. El mecanismo de acción se centra en la competición con la noradrenalina por los receptores β . Ambos fármacos interactúan de forma competitiva y con igual afinidad con los receptores β_1 , receptores postsinápticos que se localizan sobre todo en corazón cuya activación provoca incremento de la fuerza y velocidad de contracción del corazón, relajación del aparato gastrointestinal, agregación plaquetaria y secreción de amilasa por parte de las glándulas salivales; y β_2 , mayoritariamente postsinápticos localizados en vasos, bronquios y músculo esquelético e hígado principalmente cuya activación provoca vasodilatación, broncodilatación, relajación de músculos e inhibición de la liberación de histamina por los mastocitos. El nadolol y propranolol bloquean el aumento de flujo sanguíneo disminuyendo la inflamación, entre las que se encuentra la inflamación neurogénica producida en el proceso de migraña (Andersson y Vinge, 1990; Sudilovsky y col., 1987). Estos dos fármacos beta-bloqueantes no presentan cardioselektividad ni actividad simpaticomimética intrínseca (Ramírez-González, 2008). Sin embargo, el nadolol es tres veces más potente que el propranolol (Abad-Santos y col., 2008).

El nadolol se comercializa mediante comprimidos orales con dosis de 20, 40 y 80 mg. En España, la especialidad farmacéutica se encuentra bajo el nombre de Solgol del laboratorio Sanofi Aventis (40 y 80 mg). Por otra parte, el hidrocloreuro de propranolol se encuentra disponible en diferentes formas farmacéuticas de administración oral: cápsulas (60, 80, 120 y 160 mg) y comprimidos (10, 20, 40, 60 y 80 mg), así como en administración intravenosa mediante inyección (1 mg/mL). En España, éste se comercializa bajo el nombre de Sumial de AstraZeneca España, en comprimidos recubiertos con película (10 y 40 mg), cápsulas duras de liberación prolongada (160 mg) y en solución inyectable (1 mg/mL) (Martindale, 2011).

El **nadolol** es un fármaco que, al igual que los bloqueantes de los receptores adrenérgicos, es bien tolerado y sus efectos adversos son leves. Se utiliza en el tratamiento de la hipertensión, arritmias y anginas de pecho, aunque también se emplea en el control del hipertiroidismo así como en el sangrado de varices esofágicas y en el tratamiento profiláctico de la migraña. Un reciente estudio comparativo entre diversos fármacos preventivos, establece que el nadolol es un fármaco muy bien tolerado por los pacientes migrañosos, además de ser muy eficaz clínicamente (Gracia-Naya y col., 2012).

La administración del nadolol se realiza vía oral. Se absorbe de forma incompleta en el tubo digestivo, con una biodisponibilidad oral entre el 25-35%. Cuando se administra con alimentos se reduce la variabilidad interindividual y en estos casos la biodisponibilidad puede disminuir un 20%. Tras una administración oral de 80 mg de nadolol, la concentración plasmática máxima es de 69 ng/mL y se alcanza en 2-4 h (Krukemyer y col., 1990). Su volumen de distribución es de 1.5-1.9 L/Kg. La unión del nadolol a las proteínas del plasma es baja (20-30%). No sufre metabolismo de primer paso, éste no se metaboliza, con lo que su eliminación depende de la función renal del paciente, siendo aproximadamente entre el 60-75%. Su semivida de eliminación plasmática es de 12 a 24 h y su aclaramiento de 2-5 mL/min/Kg. Es un fármaco hidrosoluble y por ello pasa muy poco al sistema nervioso central, por lo que puede producir menos efectos adversos en el sistema nervioso (Abad-Santos y col., 2008; Flórez, 2008; Schäfer-Korting y col., 1984).

El **propranolol** es un beta-bloqueante ampliamente utilizado. Este fármaco se utiliza en forma de hidrocloreuro en el tratamiento de la hipertensión, patologías coronarias (angina de pecho, arritmias), trastornos de ansiedad, temblores, prevención de la migraña y del sangrado de varices esofágicas.

El propranolol es un fármaco muy lipófilo. Puede ser administrado vía oral o intravenosa. Sin embargo, para la prevención de la migraña, éste solo se utiliza vía oral. Se absorbe completamente en el tubo digestivo pero su biodisponibilidad es entre 30-35% y como existe una gran variabilidad interindividual en el aclaramiento presistémico, las concentraciones que se alcanzan después de una dosis oral pueden variar hasta 20 veces de un individuo a otro, lo que obliga a realizar múltiples incrementos de dosis en algunos pacientes. La biodisponibilidad aumenta si se toman alimentos o con la administración de altas dosis en tratamientos prolongados porque disminuye el grado de extracción hepática (Jackman y col., 1981). Tras una administración oral (160 mg), la concentración plasmática máxima obtenida es de 28 ng/mL (Drummer y col., 1981). Una vez en la circulación

sistémica, éste se distribuye ampliamente por el organismo, siendo su volumen de distribución aproximadamente 3.6-4.5 L/Kg. La unión del propranolol a las proteínas del plasma es elevada (90-95%). El propranolol se metaboliza en el hígado, presenta una semivida de eliminación entre 2 y 6 h y su aclaramiento es aproximadamente de 12 mL/min/Kg (Abad-Santos y col., 2008; Flórez, 2008).

Antagonistas del calcio. Son compuestos químicos de estructura muy heterogénea lo que se traduce en su distinto grado de utilidad en la profilaxis de la migraña. Entre ellos se encuentra la flunaricina que es el fármaco más investigado de este grupo, aunque también se encuentra el nicardipino y nimodipino. Cuando se emplean debe vigilarse el aumento de peso, la somnolencia y el desarrollo de síndromes extrapiramidales.

Neuromoduladores (antiepilépticos). Diversos estudios confirman la eficacia de estos fármacos como tratamiento preventivo de la migraña destacando el topiramato y valproato sódico. Sin embargo, no son de primera indicación ya que sus efectos secundarios son notorios y se plantea mucha dificultad en su uso en mujeres que potencialmente pueden estar embarazadas. El valproato, en España, no tiene aprobada esta indicación en su ficha técnica.

Antidepresivos. La observación de la eficacia de los antidepresivos tricíclicos en el tratamiento del dolor crónico llevó al empleo de la amitriptilina en el tratamiento de la migraña. Su acción se desarrolla a nivel central, sobre la transmisión serotoninérgica. Constituyen una segunda línea de tratamiento preventivo de la migraña. Habitualmente se usan de forma asociada a otros preventivos, como los beta-bloqueantes. En ocasiones también son útiles los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina por su mejor tolerabilidad.

Antiserotoninérgicos. La metisergida es un derivado del ácido lisérgico relacionado estrechamente con los alcaloides ergóticos naturales. En la actualidad, su uso se ha reducido de forma considerable y no debe ser considerado fármaco de primera elección; sin embargo, sí se mantiene como producto útil para la prevención de la migraña.

2. Tratamiento sintomático

El inicio temprano de la farmacoterapia sintomática es fundamental. Aunque en algún caso de migraña ligera, es suficiente el uso de un analgésico tipo paracetamol junto con medidas de reposo, normalmente es necesario recurrir a otro tipo de fármacos.

a) Tratamiento inespecífico

Consiste en la utilización de **analgésicos** tales como el ácido acetilsalicílico, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, ácido mefenico, indometacina o asociaciones paracetamol-codeína asociados a **antieméticos** y **procinéticos** (metoclopramida o domperidona) (Flórez, 2008; Zarranz, 2003).

b) Tratamiento específico

Los ergóticos y los triptanes, disponibles desde hace tiempo, son los que constituyen la terapia específica para el tratamiento de la crisis de migraña.

Fármacos ergotamínicos. Son agonistas serotoninérgicos no selectivos y potentes vasoconstrictores. Están indicados en enfermos cuyas crisis de migraña son muy prolongadas y recurrentes. Sólo son eficaces al comienzo de la crisis. Se recomienda evitar su utilización durante la fase de aura migrañosa y en la migraña con aura prolongada (GECSSEN, 2006). Dentro de este grupo se emplea el tartrato de ergotamina y la dihidroergotamina. Están contraindicados en el embarazo, enfermedad oclusiva arterial, hipertensión arterial y hepatopatía o nefropatía graves. Su uso prolongado puede producir vasoconstricción grave con isquemia visceral y de las extremidades (Zarranz, 2003). Presentan un elevado riesgo de desarrollar tolerancia, dependencia, cefalea crónica diaria y cefalea de rebote, además de incrementar las náuseas y vómitos (Flórez, 2008).

Agonistas de la serotonina (triptanes). Son agonistas selectivos de los receptores 5-HT_{1B/D}. Tienen un efecto vasoconstrictor e inhiben la inflamación. Alivian la cefalea y, también, los síntomas asociados como las náuseas y los vómitos. Se consideran el tratamiento de primera elección cuando las migrañas se asocian con una incapacidad moderada o grave (Lainez-Andres y col., 2013; Tepper y Spears, 2009). No obstante, debido a sus efectos adversos, sobretudo cardiovasculares, los triptanes se deben usar sólo en pacientes que no mejoran con la combinación de un antiemético y un AINE. En las crisis de migraña con aura no se aconseja su administración hasta el inicio de la fase de

dolor (GECSSEN, 2006). Se deben usar con precauciones en los hombres de mediana edad, fumadores, cuyo estado coronario sea incierto (Tfelt-Hansen y col., 2000). Actualmente, son varios los triptanes que pueden usarse en el tratamiento de la migraña. Presentan dosificaciones diversas y sus características farmacocinéticas también lo son (Jhee y col., 2001) (véase tabla 7). Dado que no existen diferencias notables de eficacia, la terapia puede iniciarse con la administración de cualquiera de los fármacos que han demostrado una buena relación entre eficacia y seguridad, como es el caso de sumatriptán o zolmitriptán. Si la tolerancia es mala, la mejor opción es el almotriptán. En crisis incapacitantes, en las que la rapidez del tratamiento es fundamental, rizatriptán es una buena alternativa (Flórez, 2008).

Propiedades farmacocinéticas de los triptanes					
	Dosis óptima (mg/día)	Biodisponibilidad (%)	T máx (h)	Vida media (h)	Metabolitos activos
Almotriptán oral	12.5-25	69-80	2.5	3	-
Sumatriptán oral	50-100	14	2.5	2	-
Sumatriptán nasal	10	15.8	1-1.5	2	-
Sumatriptán subcutáneo	6	96	0.17	2	-
Rizatriptán oral	10	40	1	2	+
Naratriptán oral	2.5	74	3	5.5	+
Zolmitriptán oral	5	39-46	1.5	2.5	+
Zolmitriptán nasal	2.5-5	40-47	1.5-2	3	+
Eletriptán oral	20-40	50	1.6	6.3	+
Frovatriptán oral	2.5	22-30	3	26	-

Tabla 7. Características farmacocinéticas y perfil de eficacia de los triptanes.

El **almotriptán** es el primer triptán que ha recibido la aprobación por la FDA para el tratamiento de migraña en adolescentes y niños (Rob Harris, 2009), hecho relevante ya que este grupo poblacional no contaba antes del año 2009 con ningún tratamiento específico para la migraña. Numerosos estudios establecen su perfil de seguridad así como su eficacia, demostrando que presenta ventajas frente a otros triptanes (Allais y col., 2010; Antonaci y col., 2010; Bussone y col., 2011; Chen y Ashcroft, 2007; Díaz-Insa y col., 2011;

Sandrini y col., 2007). Asimismo, es la primera elección cuando el paciente no acepta otros triptanes (Diener y col., 2005; Lipton y col., 2005; Tfelt-Hansen, 2004).

El almotriptán se comercializa como comprimidos orales con dosis de 6.25 y 12.5 mg. En España, la especialidad farmacéutica se distribuye en comprimidos recubiertos (Almogran 12.5 mg) de Almirall (Martindale, 2011).

Se trata de un agonista selectivo del receptor vascular de la 5-hidroxitriptamina o serotonina (5-HT). Presenta alta afinidad por los receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} y 5-HT_{1F} y baja afinidad por 5-HT_{1A} y 5-HT₇, pero carece de efecto en otros subtipos de receptor de la serotonina (5-HT₂ a 5-HT₆) (Bou y col., 2000).

Los receptores de la serotonina que se conocen son numerosos, de ellos se han identificado los subtipos 5-HT_{1B/1D} que abundan en las arterias craneales de los perros y los primates, en las arterias cerebrales humanas así como en la vasculatura de la duramadre.

El efecto del almotriptán se basa en una vasoconstricción de los vasos craneales de la circulación carotídea dilatados e inflamados (Bou y col., 2000). La unión del triptán al receptor 5-HT₁ reduce la liberación de serotonina y también la de otros neuropéptidos vasoactivos en los axones perivasculares de la duramadre (Tfelt-Hansen y col., 2000).

Su biodisponibilidad, tras administración oral, es aproximadamente de 69%, con niveles plasmáticos máximos entre 1.5-4 h y concentraciones plasmáticas de 52-56 ng/mL. Una vez en la circulación sistémica, el almotriptán se distribuye ampliamente por el organismo, siendo su volumen de distribución 3.5 L/Kg. La unión a proteínas del plasma es de aproximadamente 35%.

El almotriptán se metaboliza mayoritariamente en el hígado, el 27% de la dosis es degradado por la monoamino oxidasa A (MAO-A), y el 12% de la dosis por citocromo P450 generando dos metabolitos inactivos (McEnroe y Fleishaker, 2005). El fármaco inalterado se elimina principalmente por vía renal (75% de la dosis), mientras que el 25% restante se elimina en las heces. El aclaramiento renal se lleva a cabo por secreción tubular y filtración glomerular. La semivida de eliminación es de 2.5-5 h y su aclaramiento plasmático es de 37 L/h (McEnroe y Fleishaker, 2005; Tfelt-Hansen y col., 2000).

2. 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. Se trata de conseguir que tras la aplicación sobre la piel el fármaco permee a través de las estructuras cutáneas, alcance la zona vascularizada y acceda de esta manera a la circulación sistémica.

Así pues, en la actualidad los objetivos principales en la administración percutánea de fármacos son:

- Conseguir una acción local del fármaco en algún estrato de la piel.
- Alcanzar niveles plasmáticos eficaces.

2.1. Ventajas e inconvenientes

La administración transdérmica presenta ciertas ventajas con respecto a las vías de administración convencionales (Kanikkannan y col., 2000; Kneep y col., 1987; Wiechers, 1992):

- Evita el efecto de primer paso hepático e intestinal y/o una posible degradación a nivel gastrointestinal.
- Resulta de utilidad en aquellas situaciones en las que la absorción gastrointestinal puede ser errática o incompleta. Es el caso de pacientes pediátricos, geriátricos o comatosos en los que la administración oral es complicada y dificultada a causa de náuseas, vómitos o mala deglución.
- No se ve afectada por limitaciones fisiológicas propias de la vía oral como son el vaciado gástrico, la motilidad intestinal o la posible interacción fármaco-alimento.
- Permite la obtención de niveles terapéuticos constantes de fármaco en sangre durante tiempos prolongados. De esta manera, se eliminan las fluctuaciones en la concentración plasmática y con ello los efectos adversos asociados a las mismas. Permite la

utilización de fármacos con estrecho margen terapéutico y se disminuye la frecuencia de dosificación que es necesaria con otras formas galénicas (figuras 3 y 4).

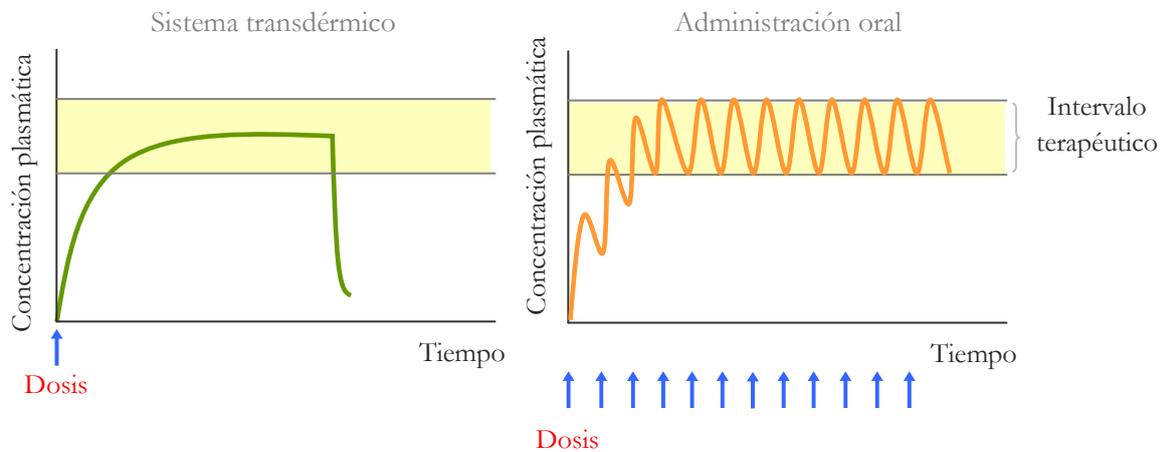


Figura 3. Niveles plasmáticos obtenidos tras la administración de un fármaco desde un sistema transdérmico y una forma farmacéutica de administración oral.

- Escapa de los riesgos e inconvenientes que presenta la administración parenteral.

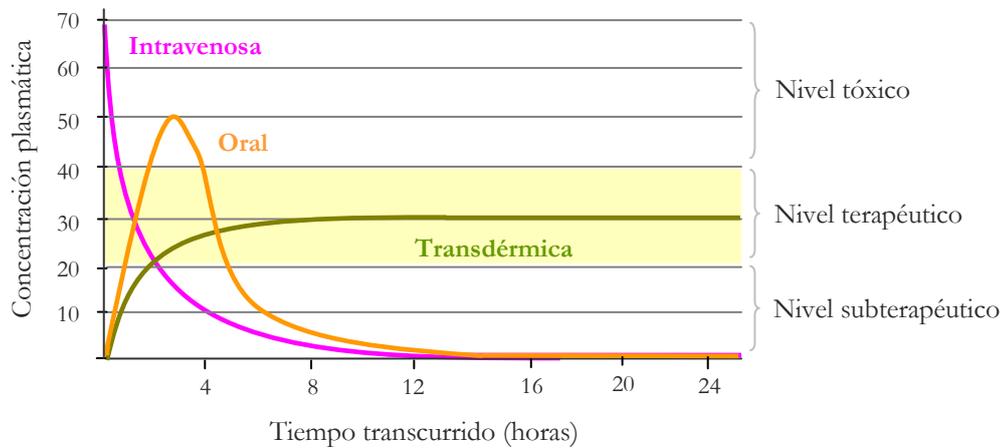


Figura 4. Diferentes perfiles en sangre de un fármaco administrado vía oral, intravenosa y transdérmica.

- Los sistemas de aplicación transdérmica, al suponer mayor comodidad para el paciente, son mejor aceptados y favorecen el cumplimiento terapéutico. Además su uso puede suponer una disminución en el coste ya que, a diferencia de la administración parenteral, no se necesita personal sanitario para su administración.

No obstante, la administración transdérmica de fármacos también presenta inconvenientes (Kneep y col., 1987; Wiechers, 1992):

- El principal problema radica en la función barrera que supone la piel a la penetración de agentes externos. Dicha función reside en su capa más externa, el estrato córneo, capa resistente e hidrofóbica que dificulta la pérdida de agua y la difusión de principios activos para ser administrados por vía transdérmica. Esta extraordinaria función barrera, ha limitado de forma dramática el número de principios activos aptos a ser administrados por esta vía (Ghosh y Pfister, 1997).

- La vía transdérmica está limitada a sustancias farmacológicamente potentes.

- Los flujos transdérmicos son relativamente pequeños aunque su valor pueda variar con las propiedades físico-químicas del principio activo. Además, la absorción transdérmica es relativamente lenta, por lo que no es válida en situaciones donde se desee obtener un efecto inmediato.

- No es posible administrar fármacos que sean potencialmente irritantes al aplicarlos sobre la piel o que puedan provocar algún tipo de reacción alérgica. Es necesario considerar la irritación a nivel local que se pueda producir, ocasionada tanto por el principio activo como por el contacto del dispositivo transdérmico (adhesivos, polímeros o por efecto de la oclusión) con la piel. El caso de la clonidina, por ejemplo, es uno de ellos. Para evitar problemas de sensibilización cutánea, se recomienda a los pacientes cambiar el lugar de aplicación cada 3 ó 5 días de tratamiento (Burris, 1993).

- Existe la posibilidad de que se produzcan procesos metabólicos o biotransformación debida a la existencia de enzimas endógenas de la piel. Aunque la existencia de procesos metabólicos en la piel está demostrada, la distribución anatómica de los sistemas enzimáticos no está perfectamente establecida. Se sabe, sin embargo, que existen diferencias en la actividad enzimática según la zona del organismo y que tanto la actividad de las enzimas como su distribución es diferente entre distintas especies (Berardesca y col., 1991; Wester y Maibach, 1999).

2.2. La piel y sus anexos. Fisiología y funciones

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano. Presenta una superficie total aproximada de 1.7 m² y su peso alcanza unos 4 Kg, constituyendo cerca del 10% del peso corporal.

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), establecer las relaciones sensoriales y por supuesto, mantener la forma del cuerpo (Edwards y Marks, 1995; Wilkes y col., 1973).

Desde el punto de vista estructural, la piel se compone de cuatro capas perfectamente caracterizadas y funcionalmente diferentes: capa superficial, epidermis, dermis e hipodermis (Williams, 2003). La capa superficial está en contacto con el medio externo y la hipodermis separa la piel de los tejidos subyacentes. Además, la piel está atravesada por dos tipos de estructuras denominadas anexos: el sistema pilosebáceo y las glándulas sudoríparas (figura 5).

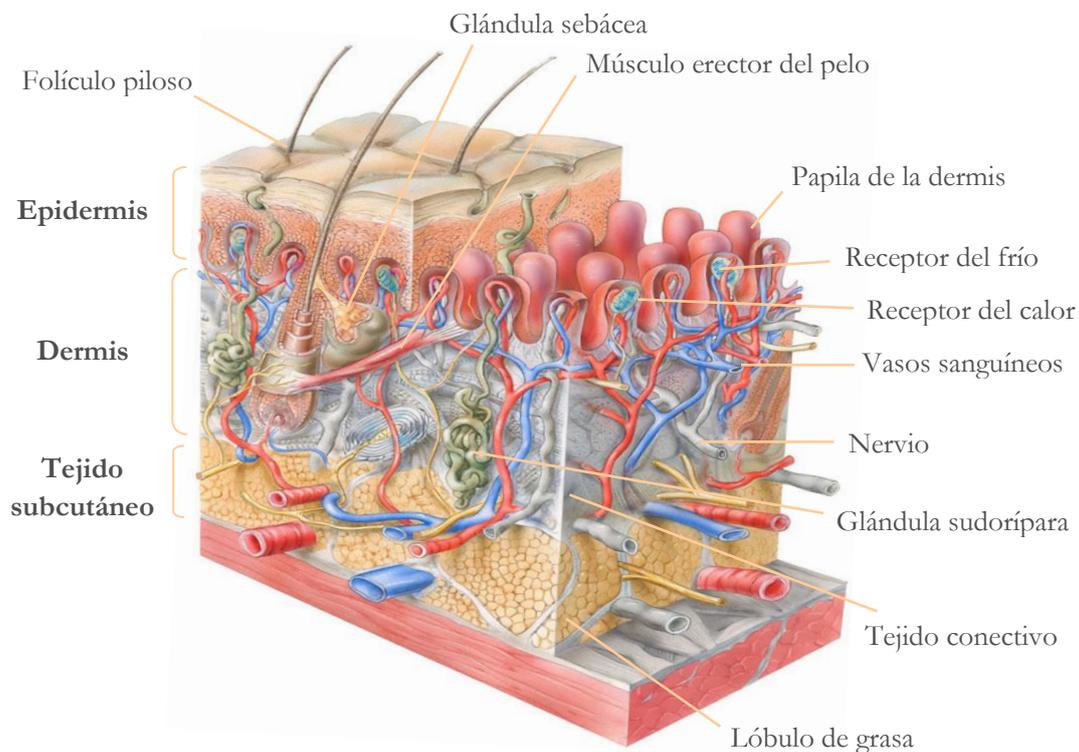


Figura 5. Estructura de la piel. Imagen adaptada (Leonhardt, 1990).

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. Es miscible con el agua y su pH es ácido (5.2 por término medio, aunque con variaciones zonales), lo que le permite actuar como defensa eficaz frente a infecciones cutáneas. Este pH se incrementa cuando aparecen alteraciones o infecciones.

La **epidermis** es una capa epitelial estratificada y avascular de la que surgen los folículos pilosebáceos, las glándulas sudoríparas y las uñas. Presenta un espesor aproximado de 100 μm . Hay cuatro tipos celulares en ella: queratinocitos, melanocitos, células de Merkel de las terminaciones nerviosas y células fagocíticas de Langerhans. Estas células sufren modificaciones químicas enriqueciéndose en queratina a medida que progresan hacia el exterior. Éstas nacen en una capa basal interna, 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 distinguen varios estratos que aparecen esquematizados en la figura 6.

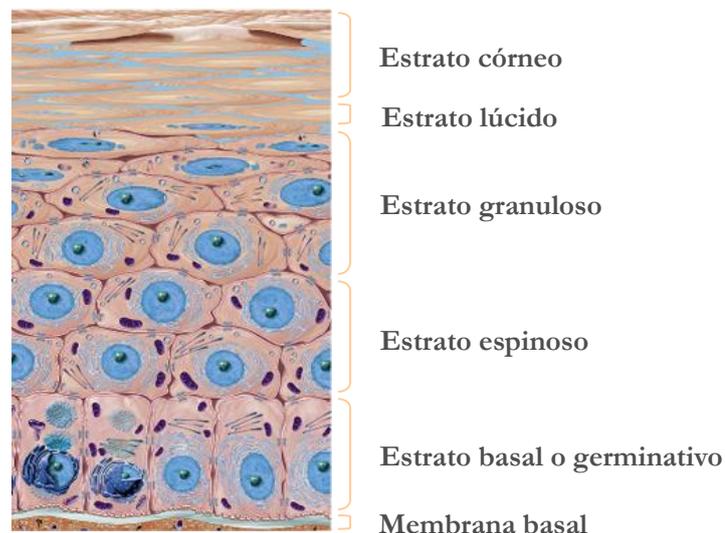


Figura 6. Estructura microscópica de la epidermis.

Imagen reproducida de www.eucerin.com (Eucerin®).

La **capa basal** o **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 están 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. Se ha podido observar 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 provienen una serie de aminoácidos que, junto con otras sustancias higroscópicas, constituyen el denominado factor de hidratación natural (NMF, *natural moisturizing factor*). Éste 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 (Wertz y Downing, 1989). Un reciente estudio establece además que es la primera línea de defensa antioxidante (Schäfer y Werner, 2011).

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 y col., 1995^a). 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 (Wertz y col., 1989). 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 (Downing, 1992). Estas bicapas se han podido observar utilizando distintas técnicas, mediante microscopía electrónica (Garson y col., 1991). El número de bicapas entre dos células es variable (4-20 ó más). El hecho de que estas bicapas se orienten de forma paralela a la superficie implica que una molécula que atravesase 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 pueda ser un factor condicionante de su permeabilidad. Como se resume en la tabla 8, los lípidos que intervienen en mayor proporción en el estrato córneo son colesterol, ácidos grasos y ceramidas (Elias, 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. Éstas 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.

Lípidos en la matriz intercelular del estrato córneo	
Clasificación	% del total en peso (m/m)
Ceramidas	38.1
Colesterol	23.4
Ácidos grasos	17.0
Ésteres de colesterol	7.50
Sulfato de colesterol	3.00
Otros	11.1

Tabla 8. Composición de los lípidos del estrato córneo (Elias, 1983; Wertz y Downing, 1989).

La **dermis** constituye el sostén de la epidermis, situada inmediatamente por debajo de la epidermis. Tiene un espesor de 3 a 5 mm y está compuesta por una matriz densa de tejido conectivo, formada por fibras de colágeno y elastina (Wilkes y col., 1973).

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 que hayan atravesado el estrato córneo y la epidermis viva.

Está formada por un parénquima de células conjuntivas entre las que se encuentran vasos 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 y células plasmáticas por ejemplo, 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**, representa 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 aislamiento térmico, además de dotar a la piel de su elasticidad y capacidad de movimiento.

El conjunto de folículos pilosos y glándulas sebáceas se conoce como **sistema pilosebáceo** (figura 7). Aunque en algunas zonas, muy circunscritas, las glándulas sebáceas aparecen como estructuras independientes, normalmente están asociadas al folículo piloso.

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 papel termorregulador importante. 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.

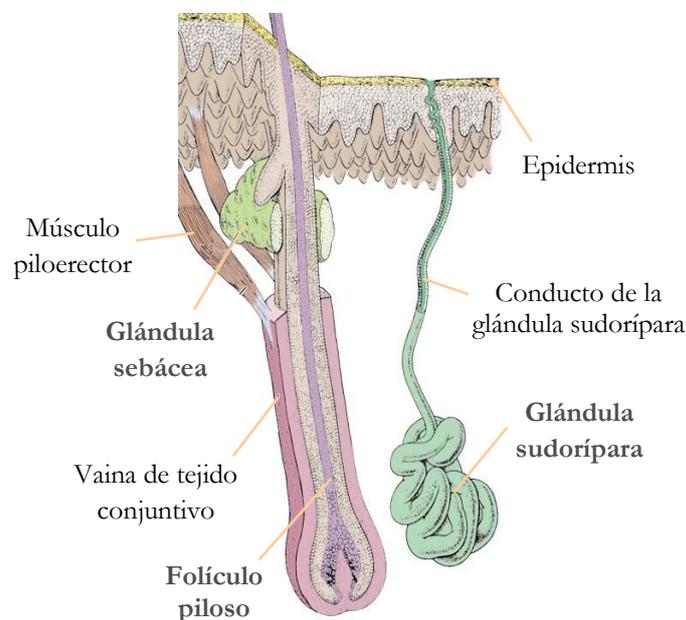


Figura 7. Esquema que muestra la piel con un folículo piloso, una glándula sebácea, un músculo piloerector y una glándula sudorípara. Imagen adaptada (Junqueira y Carneiro, 2005).

2.3. Vías de penetración cutánea

Aunque durante mucho tiempo se consideró que la epidermis era más impermeable que la dermis, no fue hasta la década de los cuarenta cuando se estableció que la función barrera reside en el estrato córneo. Se ha demostrado que dicha función barrera está asociada a los lípidos intercelulares de dicho estrato (Hadgraft y col., 1992; Kennedy y col., 1996). Además, un aumento de la pérdida transepidérmica de agua (T.E.W.L.) causada por una perturbación tanto física como química del estrato córneo desencadena de forma inmediata una serie de procesos destinados a reparar el daño causado. Éstos incluyen un aumento de la síntesis de lípidos y su posterior extrusión al espacio intercelular y una respuesta inflamatoria (Nickoloff y Naidu, 1994; Proksch y col., 1993). Cuando un fármaco se aplica sobre la piel en primer lugar debe disolverse en la capa superficial de la misma y si se absorbe accederá posteriormente a la red de capilares que irriga la dermis.

Existen dos vías posibles para su penetración. A través de los espacios intercelulares o de las células constituyentes de la epidermis (vía transepidérmica) o bien, a través de las glándulas sudoríparas y los folículos pilosebáceos (vía transapendicular) (véase figura 8).

Vía transepidérmica

La mayoría de sustancias que permean a través de la piel, la atraviesan por esta vía. A su vez, las sustancias pueden seguir dos vías (Elias, 1983; Wertz y col., 1989) (véase figura 9):

- Intercelular. Se considera la principal para la mayoría de sustancias. Consiste en la difusión a través de los espacios intercelulares del estrato córneo. La sustancia permeante atraviesa el estrato córneo siguiendo un camino tortuoso a través de los lípidos de la matriz intercelular.
- Transcelular. Las sustancias atraviesan varias veces los lípidos intercelulares, las bicapas lipídicas y los corneocitos. En esta ruta, se realiza repartos repetidos entre regiones hidrofílicas y lipofílicas. La gran dificultad del proceso hace que no sea considerada relevante en la mayoría de los casos.

Vía transapendicular

El paso de sustancias a través de esta vía se realiza por las glándulas sudoríparas y los folículos pilosebáceos. Debido a la pequeña superficie que ocupan los folículos y la

relativa escasez de las glándulas sudoríparas, la contribución de esta ruta es prácticamente despreciable (Scheuplein, 1967). Sin embargo, según ciertos autores, esta vía puede ser utilizada prioritariamente por moléculas de gran volumen y carácter lipofílico (Franz, 1975; Illel y col. 1991; Lademann y col., 2005; Schaefer y Lademann, 2001).

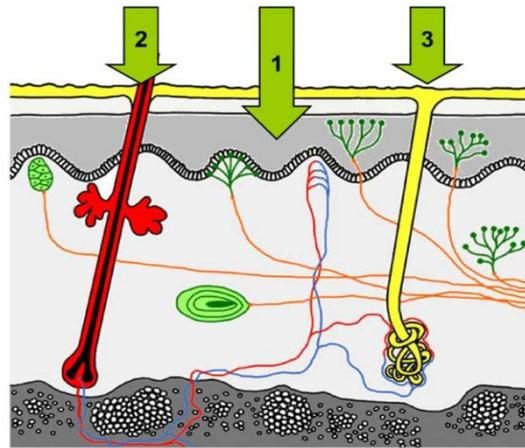


Figura 8. Principales vías de penetración a través de la piel: transepidérmica (1) y transapendicular, a través de los folículos pilosebáceos (2) y glándulas sudoríparas (3).
Imagen reproducida de www.skin-care-forum.basf.com.

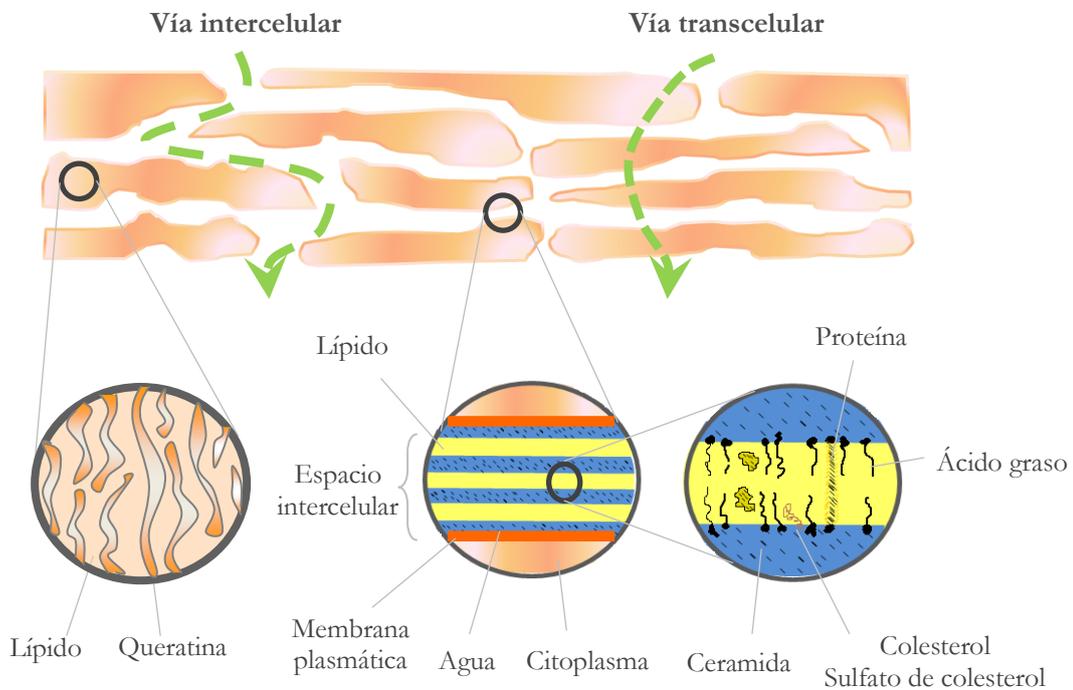


Figura 9. Vías de penetración intercelular y transcelular a través de la epidermis.

2.4. Factores implicados en la absorción transdérmica

Son muchos los factores de influencia a considerar en la absorción transdérmica de sustancias, fármacos u otros xenobióticos: biológicos, fisicoquímicos, farmacológicos, farmacocinéticos y biofarmacéuticos.

Los **factores biológicos**, están relacionados con la propia naturaleza de la piel y, por tanto, participan de la gran variabilidad interindividual. Es imprescindible conocerlos para lograr tratamientos adecuados a través de la vía transdérmica.

La **edad** es uno de los factores fisiológicos más ampliamente investigados. Hay claras alteraciones estructurales y funcionales (Lober y Fenske, 1991) así como mecánicas y a nivel de la circulación (Mattar, 2011) que se producen en la piel a medida que ésta envejece, aunque es difícil atribuir algunos de los cambios relacionados con la edad a los procesos de envejecimiento inherentes o daños ambientales acumulativos. Por ejemplo, el daño puede resultar de una exposición continuada a una sustancia química o a radiación UV como la luz del sol. Respecto a esto último, un reciente estudio donde se evalúa la permeabilidad de diversas sustancias (queratina, tetraciclina y oxibenzona) a través de piel dorsal de ratón normal e irradiada con UV concluye que el incremento de permeabilidad depende de la longitud de onda, mayor absorción con UVA, y la energía con que se irradia la piel (Hung y col., 2012). Por otra parte, Potts y colaboradores demostraron que el contenido de agua de la piel humana disminuye con la edad; lo que podría alterar la permeabilidad de fármacos (Potts y col., 1984). Sin embargo, algunos estudios demuestran que el envejecimiento no tiene ningún efecto sobre la permeación transdérmica de agua, el estradiol, la nicotina, cafeína o aspirina (Feldmann y Maibach, 1970; Lober y Fenske, 1991; Roskos y col., 1989).

Mientras que los efectos del envejecimiento en una piel normal son mínimos, existen importantes diferencias morfológicas entre piel normal (edad adulta) y la piel de un recién nacido (prematuro). La diferencia clínica más obvia es la presencia de una sustancia blanco-amarillenta, húmeda y grasa, denominada vérnix caseosa, que es una envoltura que contiene una combinación de sustancias secretadas por glándulas sebáceas, células cutáneas descamadas y pelos de lanugo desprendidos (Holbrook, 1982; Solomon y Esterly, 1970). La vérnix caseosa tiene un importante papel en el mantenimiento de la hidratación y el equilibrio del pH y para evitar las infecciones durante los primeros días de vida (Marchini y col., 2002; Visscher y col., 2011). Esta capa persiste durante los primeros días de vida

posnatal, aunque al final llega a desaparecer por completo para poner de manifiesto la piel moderadamente seca, típica del recién nacido.

La estructura de la piel del recién nacido es histológicamente similar a la de los individuos de edad más avanzada; sin embargo, la piel del lactante prematuro muestra algunas características únicas. La epidermis y el estrato córneo del recién nacido a término están bien desarrollados y las propiedades de barrera son excelentes (Barker y col., 1987). Tienen una epidermis bien desarrollada, con varias capas gruesas y un estrato córneo bien formado (Kalia y col., 1998). En cambio, los lactantes prematuros tienen una mayor permeabilidad cutánea y una barrera que funciona peor por falta de madurez (Bressler y Bressler, 1989). Por otra parte, respecto a la dermis del recién nacido, existe una mayor transición en el grosor de los haces de fibras de colágeno presentes, así como una distribución de las fibras elásticas similar al adulto pero con disminución del contenido de elastina. Además, la piel del recién nacido presenta grasa parda (tejido adiposo muy vascularizado), no presente en piel adulta, y constituye un 5-6% del peso total del recién nacido (Aguilar Cordero, 2003).

Conjuntamente con lo plasmado con anterioridad, existen problemas asociados con la barrera de la piel imperfecta del neonato; la superficie a razón del peso corporal puede ser de tres a cinco veces mayor que en un adulto y aún mayor en el prematuro respecto del adulto, causando dificultades con la termorregulación, la pérdida de agua transepidermica, la infección y la absorción de los productos químicos exógenos.

Por otro lado, no hay que olvidar la existencia de diferencias inherentes al género. Por ejemplo, los queratinocitos tienden a ser ligeramente más largos en las mujeres (37-46 μm) que en los hombres (34-44 μm) aunque no existen evidencias de que en una misma localización del cuerpo existan variaciones de permeación (Roberts y Walters, 1998).

La **raza** también puede ser causa de diferencias aunque existe controversia. Lotte y colaboradores mostraron que la pérdida transepidermica de agua en sujetos de diferente raza y género no mostraba diferencias en la función barrera del estrato córneo para la absorción de moléculas como ácido benzoico, nicotina y ácido acetilsalicílico entre pieles africanas, asiáticas o europeas (Lotte y col., 1993). Sin embargo, un estudio reciente comparando las diferentes etnias, sí demuestra diferencias en espesor del estrato córneo, maduración y microestructura de la piel (Muizzuddin y col., 2010). Además, se ha observado diferencias en la cantidad de agua presente en estrato córneo, desigual descamación de los corneocitos, contenido lipídico variable así como la microcirculación

diversa entre razas (Berardesca y col., 1991; Wesley y Maibach, 2003) y ésto se puede traducir en diferencias en la absorción transdérmica. Por otra parte, la piel de individuos de raza negra presenta una menor permeabilidad debido a la mayor densidad de la misma (Reed y col., 1995; Weigand y col., 1974).

Además, el espesor del estrato córneo es variable, ya que las zonas del cuerpo más expuestas al roce, como las palmas de las manos y las plantas de los pies, presentan un espesor mayor que otras zonas menos expuestas. Por este motivo, la **zona de aplicación** resulta decisiva para garantizar el éxito del tratamiento (Tsai y col., 2003; Treffel y col., 1994; Wester y Maibach, 1999).

El **flujo sanguíneo** y sus modificaciones pueden tener una transcendencia importante (Cross y Roberts, 1995). Al aumentar el flujo sanguíneo se reduce el tiempo de permanencia de las sustancias en la dermis y aumenta el gradiente de concentración de las mismas, favoreciendo su difusión desde la superficie cutánea hacia la dermis. Este hecho se aprecia fundamentalmente cuando se presentan alteraciones en el estrato córneo, o, en el caso de fármacos de carácter lipofílico, para los que dicho estrato no supone un factor limitativo de la absorción (Cross y Roberts, 2008; Panchagnula y col., 2004). Cuando por alguna causa el flujo sanguíneo disminuye y no puede drenar la sustancia a medida que ésta penetra, este factor se convierte en el factor limitante de la absorción del fármaco (Barry, 1983). De esta forma, la utilización de vasoconstrictores puede reducir el drenaje y, por tanto, la absorción de sustancias a través de la piel (Riviere y col. 1991).

Se debe considerar también las variaciones de **hidratación** del estrato córneo; un aumento de la misma, tiene como consecuencia un incremento en la permeabilidad sobretodo en moléculas polares (Chen y Li, 2001; Gupta y col., 2005).

Un incremento de la **temperatura** de la piel también tiene como consecuencia una mayor penetración de las moléculas, debido al aumento del coeficiente de difusión de las mismas (Chang y Riviere, 1991). Una elevada temperatura provoca desorden en los lípidos del estrato córneo, disrupción de la estructura de queratina así como descomposición y vaporización de la queratina (Park y col., 2008).

Además, no hay que olvidar que determinadas **patologías** dermatológicas producen una alteración en las capas más superficiales de la piel como en algunas dermatitis, eczemas y psoriasis, modificando la función barrera y como consecuencia, se ocasiona un aumento en la permeabilidad de la misma (Blank, 1964). Una inflamación crónica de la epidermis, la conocida dermatitis atópica, compromete la barrera del estrato córneo hasta tal punto que

la pérdida transepidérmica de agua se incrementa un 10% (Aalto-Korte y Turpeinen, 1996; Ogawa y Yoshiike, 1992). En algunas enfermedades metabólicas, como la diabetes, que originan alteraciones en las membranas basales de la epidermis y en los capilares cutáneos, la difusión de sustancias se encuentra favorecida (Braverman y col., 1990).

Entre los **factores fisicoquímicos** se consideran tanto las características fisicoquímicas del fármaco, como la naturaleza del vehículo empleado para su aplicación sobre la piel.

La elección de los **excipientes** que intervienen en la formulación del medicamento debe realizarse con precaución ya que, en ocasiones, pueden causar modificaciones en la absorción transdérmica del principio activo; bien sea por una interacción fármaco-vehículo, por una acción directa sobre la estructura o propiedades de la membrana, o por una acción indirecta, al variar, por ejemplo la temperatura del tejido, su grado de hidratación u otras propiedades del mismo (Hilton y col., 1994; Williams y Barry, 1989; Yamane y col., 1995).

De entre las características fisicoquímicas del **principio activo**, las más relevantes en el proceso de absorción son: la concentración de fármaco en el vehículo, el coeficiente de difusión, el coeficiente de reparto y, en el caso de fármacos ionizables, el pH. Las primeras tres derivan de la primera ley de Fick de la difusión:

$$J = \frac{C \cdot D \cdot P}{h} \quad \text{Ec. 1}$$

donde **J**, el flujo de permeante por unidad de superficie, es proporcional a **C**, concentración del fármaco, **D**, coeficiente de difusión del fármaco en la piel y **P**, coeficiente de reparto en la membrana, e inversamente proporcional a **h**, espesor de la membrana.

Respecto a la **concentración**, tal y como se deduce de las leyes de Fick, la cantidad de fármaco que penetra por unidad de tiempo y superficie es proporcional a la concentración del mismo en el vehículo. Sin embargo, esto es válido hasta cierto límite ya que, para concentraciones muy elevadas, la cantidad de fármaco absorbida es superior a la que cabría esperar de acuerdo con su concentración en el vehículo. La explicación de este hecho, podría residir en la aparición de modificaciones en la estructura de la piel o de variaciones en el coeficiente de reparto vehículo-membrana (Scheuplein y Blank, 1971).

La *difusión* de una molécula a través de una membrana viene determinada por la resistencia que oponga el medio a su migración que depende principalmente de las características del penetrante, de las posibles interacciones con moléculas del vehículo o de la membrana, y de la viscosidad y temperatura del medio.

Si se asume que las moléculas del penetrante son similares entre sí en cuanto a tamaño, y que adoptan una conformación esférica, el *coeficiente de difusión* (D) se puede calcular aplicando la ley de Stokes-Einstein (Flynn y Yalkowsky, 1972):

$$D = \frac{K \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad \text{Ec. 2}$$

donde K es la constante de Boltzman, T , la temperatura absoluta, r es el radio de la molécula y η representa la viscosidad del medio.

Los estudios realizados por Marzulli y colaboradores demuestran cómo, a partir de esta ecuación, se puede deducir que a medida que aumenta el peso molecular de la sustancia, la difusión tendrá lugar con mayor dificultad (Marzulli y col., 1965).

Durante mucho tiempo se ha apreciado que, en medios isótropos, el peso molecular influye en el coeficiente de difusión y más con moléculas voluminosas disminuyendo su difusión (Crank, 1979). A pesar de la heterogeneidad en la piel humana, esta relación también ha sido mostrada, e Idson sugirió que existía una relación inversa (Idson, 1975). De forma similar, Scheuplein y colaboradores, estudiando la permeación de esteroides, concluyeron que moléculas pequeñas atravesaban con mayor velocidad la piel que las grandes (Scheuplein y col., 1969).

Sin embargo, esto no puede generalizarse a todos los casos ya que, como regla general, un incremento del peso molecular se traduce en un aumento del carácter lipófilo de la molécula y es este factor, el de mayor influencia en la capacidad de difusión de la sustancia a través de la membrana. Los resultados obtenidos con una serie homóloga de alcoholes alifáticos por Scheuplein y Blank corroboran esta afirmación (Scheuplein y Blank, 1973). Por otro lado, moléculas que presentan grupos polares, como los esteroides antiinflamatorios, pueden formar enlaces con componentes de la membrana, hecho que se traduce en una constante de difusión pequeña (Hadgraft, 1979). Se considera que fármacos de masa molecular inferior a 500 Da (daltons) difunden con facilidad.

La *lipofilia* de un compuesto, como se ha comentado anteriormente, constituye un factor importante en la penetración del mismo a través de la piel. Una manera de cuantificar el grado de lipofilia de una molécula es a través de su *coeficiente de reparto* (P). Este parámetro es de gran importancia en los estudios de absorción percutánea a la hora de establecer correlaciones absorción-lipofilia, ya que la afinidad relativa de un soluto entre el medio acuoso que le rodea y la membrana cutánea marca de modo trascendente su absorción a través de la piel (Díez-Sales y col., 1993).

Para la determinación del coeficiente de reparto se recurre a un sistema bifásico que proporcione las concentraciones de la sustancia en el disolvente orgánico (C_d) y en agua (C_a), de modo que:

$$P = \frac{C_d}{C_a} \quad \text{Ec. 3}$$

Diversos estudios avalan la idea de que un incremento en la lipofilia del compuesto supone un aumento de la permeabilidad (Lee y col., 1994; Scheuplein, 1965).

Sin embargo, un coeficiente de reparto elevado no siempre es indicativo de una mayor facilidad de difusión a través de la piel, ya que las sustancias muy lipófilas pueden acumularse en el estrato córneo, con lo cual se ve dificultada su absorción posterior (Anderson y Raykar, 1989).

Se considera como mejores candidatos aquellos fármacos de lipofilia comprendida entre los valores de coeficiente de reparto en n-octanol/solución acuosa de $\log P$ entre -1.0 y 4.0.

Por otra parte, puesto que muchos principios activos son ácidos o bases débiles, es importante tener en cuenta la influencia del pH , es decir el *grado de ionización*, ya que la proporción de principio activo que se encuentre ionizado depende de su pK_a y del pH del medio en el que esté disuelto (Cázares-Delgadillo y col., 2005; Crouthamel y col., 1971; Valenta y col., 2000). Se ha podido observar que la forma no ionizada presenta un mayor coeficiente de reparto lípido-agua que la forma ionizada, por lo que cabría esperar una mayor permeabilidad de la fracción de fármaco no ionizada en estrato córneo. Sin embargo, la penetración de las formas ionizadas a través de la piel es posible y, por tanto, no se puede considerar despreciable, especialmente para aquellos valores de pH en los que existe un alto grado de ionización (Hadgraft y Valenta, 2000).

En referencia a las **propiedades farmacológicas** es necesario que los fármacos posean una acción farmacológica intrínseca elevada de tal manera que la dosis de fármaco requerida sea inferior a 30 mg/día. Además no deben producir dermatitis alérgica, ni irritativa, ni reacciones de fotosensibilidad.

Por último, otros factores a considerar son las **propiedades farmacocinéticas** y **biofarmacéuticas** de los fármacos. Para que éstos sean candidatos a ser incluidos en un sistema transdérmico deberán presentar un efecto reducido de primer paso cutáneo y, preferentemente, una semivida de eliminación corta que implique una falta de adherencia al tratamiento debido a la complejidad del régimen de dosificación. Asimismo, serán buenos candidatos aquellos fármacos que se utilicen en tratamientos crónicos o de larga duración.

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

La absorción percutánea depende de un gran número de factores: características del permeante, composición de la formulación, tipo de piel, condiciones experimentales, técnica de promoción utilizada, temperatura, oclusión, etc. (Romonchuk y Bunge, 2004; Vecchia y Bunge, 2005; Wilkinson y col., 2006; Wilkinson y Williams, 2002; Zhai y Maibach, 2001). Lo más deseable para establecer la relevancia de todos ellos sería realizar los estudios *in vivo* en humanos. Sin embargo, debido al coste que suponen y por motivos éticos, dichos estudios no son frecuentes. Asimismo, la realización de estudios transdérmicos *in vitro* con piel procedente de donantes humanos se complica en gran medida por la baja disponibilidad y por la dificultad en el control de factores como la edad, raza, género, condiciones de obtención y conservación de la muestra.

Por ello, la mayoría de los estudios transdérmicos se llevan a cabo *in vitro*, en menor medida *in vivo* y muy frecuentemente recurriendo a modelos animales, tales como roedores, cerdo de guinea, cerdo y conejos.

El objetivo principal de los métodos experimentales *in vitro* es llegar a correlaciones entre los datos obtenidos por estos métodos y la absorción observada *in vivo* (Bronaugh, 2004; Franz, 1978; Mitragotri y col., 2011).

Estos métodos ofrecen la posibilidad de 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. Los estudios *in vitro* aportan información sobre el proceso limitante de la absorción, las propiedades intrínsecas de la membrana como barrera así como la capacidad de difusión del fármaco. Además, pueden identificar la vía de difusión predominante, detectar los efectos producidos por los componentes del vehículo y la variabilidad existente entre membranas de distinto origen y observar la acción de los compuestos promotores de la penetración cutánea (OECD, 2004^{a,b}; SCCS, 2010).

3.1. Modelos animales como alternativa a la piel humana

La elección de la piel depende de la finalidad de la prueba y la disponibilidad de muestras de piel. Tanto la piel humana como de animales de laboratorio se puede utilizar. Sin embargo, aunque el uso de piel humana ofrece los datos más cercanos a condiciones *in vivo*, muestras de este tipo de piel no son siempre fácilmente disponibles. Además, el uso de piel humana está sujeta a consideraciones éticas nacionales e internacionales (CEIHER, 2007; ECETOC, 1993). Por todo ello es obvia la necesidad de encontrar un modelo animal para la investigación biomédica relacionada con la piel.

Los modelos animales más utilizados para el estudio y desarrollo de sistemas transdérmicos de fármacos son la piel de cerdo (Marro y col., 2001^a), conejo (van de Sandt y Rutten, 1995) y rata o ratón (Ohara y col., 1995; van Ravenzwaay y Leibold, 2004). De éstos últimos, la variedad preferida es la de "sin pelo" también conocido como "hairless" (Simon y Maibach, 1998).

Si bien existe información sobre las características de permeabilidad pasiva de los distintos modelos de piel (Scott y col., 1986; Vecchia y Bunge, 2005; Wagner y col., 2001), se desconoce básicamente cómo puede influir la microestructura cutánea en la absorción percutánea de fármacos. Por ello, en este apartado se pretende comparar brevemente la morfología e histología de los modelos animales más utilizados en el estudio y desarrollo de sistemas transdérmicos de fármacos, como son: cerdo doméstico adulto y recién nacido, así como piel de rata o ratón sin pelo.

La piel de cerdo doméstico se considera la más parecida a la piel humana, sin embargo se encuentran diferencias a nivel morfológico. El cerdo por ejemplo, posee pelo distribuido de forma escasa e irregular siendo más grueso y largo en el lomo del animal que en otras zonas. Los folículos pilosos, histológicamente similares a los de otros mamíferos,

son robustos y no demasiado largos. Por otra parte, la densidad de folículos en el hombre y en el cerdo es similar, unos 11 folículos/cm², mientras que la rata suele presentar unos 290/cm² y la variedad sin pelo aproximadamente unos 100 folículos/cm². La disposición de los folículos pilosos varía con la edad. Cabe destacar además la gran diferencia existente entre la piel de cerdo adulto y la de neonato. Este último presenta una mayor densidad folicular, unos 730/cm² (Bronaugh y col., 1982; Ferry y col., 1995).

La epidermis humana (50-120 μm) y la de cerdo (70-140 μm) son relativamente gruesas comparadas con las de otros mamíferos (Meyer y col., 1978^a). La vascularización es mucho más extensa en el hombre que posee una mayor densidad de vasos sanguíneos.

El cerdo no posee glándulas ecrinas sudoríparas, glomérulo y conducto excretor que desemboquen directamente a la superficie de la piel, mientras que éstas recubren la práctica totalidad del cuerpo humano. En cambio, posee únicamente glándulas apocrinas que desemboca en el folículo pilosebáceo saliendo al exterior junto con el sebo (Meyer y col., 1978^b).

A nivel de lípidos, ambas especies contienen componentes propios como ceramidas y colesterol en proporciones diferentes que el ser humano (Caussin y col., 2008). La organización de los lípidos y proteínas presentes en estrato córneo humano, de cerdo y rata o ratón se ha estudiado mediante técnicas como la microscopía electrónica, cromatografía de capa fina y difracción de rayos X. La disposición de éstos se ha intentado relacionar con la distinta permeabilidad al paso de moléculas entre las tres especies (Bouwstra y col., 1995^b; Gray y Yardley, 1975).

En general, se estima que la piel de cerdo es la que presenta características de permeabilidad pasiva más parecidas a la piel humana (Meyer y col., 1978^a; Schmook y col., 2001), además de considerarse como modelo de estudio de la absorción transdérmica de fármacos para neonatos (Sekkat y col., 2004).

3.2. Células de difusión con membrana limitante

La mayor parte de experimentos *in vitro* utilizan células de difusión formadas por dos compartimentos (a veces tres) separadas entre sí por una membrana que puede ser de distinta naturaleza según la finalidad del ensayo planteado. Uno de los compartimentos, el dador, contiene el penetrante o la formulación a estudiar, y el otro, el receptor con la solución receptora que normalmente es una solución tampón o fisiológica. Es en esta

solución donde se suele valorar el fármaco mediante alguna de las técnicas existentes (cromatografía, fotometría, contaje de radioisótopos, etc.). Es frecuente además, la determinación del principio activo retenido en la piel o bien de su distribución en el estrato córneo, epidermis y dermis.

Existen dos tipos básicos de diseños de células de difusión: estáticas (Coldman y col., 1969; Franz, 1975; Franz, 1978) y de flujo continuo (Bronaugh y Steward, 1985; Foreman y col., 1977). En ambos casos el compartimento dador se sitúa sobre el receptor y entre ambos se dispone la membrana en posición horizontal. En las primeras, el compartimento receptor no se renueva excepto para reponer el volumen de las muestras tomadas para su valoración, mientras que las de flujo continuo proporcionan una renovación continua del volumen de la cámara receptora 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). Ambas incluyen un sistema de cierre por presión que permite colocar la piel entre ambos compartimentos y la mantiene en una posición fija. Existe la variante de células de flujo horizontal, en las que los compartimentos dador y receptor están dispuestos uno al lado del otro y la piel se dispone en posición vertical. Los volúmenes de los compartimentos receptores son variables (0.5-10 mL) y áreas de superficies de membrana expuestas oscilan entre 0.2-2 cm² (Brain y col., 1998).

Las membranas utilizadas suelen ser muestras de piel procedentes de animales o de la especie humana. En ocasiones se emplean membranas artificiales, de fácil adquisición y normalmente reutilizables, como las de polidimetilsiloxano (Cronin y col., 1998; Hatanaka y col., 1990), acetato de celulosa (Barry y Brace, 1977), poliuretano (Hunke y Matheson, 1981) e incluso complejos de silicona asemejando el estrato córneo (Oshima y col., 2012). Sin embargo, son las naturales las que permiten una mayor aproximación a la realidad, y de ellas la piel humana sería la de elección (Díez-Sales y col., 1993). No obstante, esto no siempre es posible por lo que habitualmente se utilizan pieles procedentes de otras especies animales muy variadas: ratas (Ohara y col., 1995; van Ravenzwaay y Leibold, 2004), ratones (Hinz y col., 1989), conejo (van de Sandt y Rutten, 1995), cerdo (Marro y col., 2001^a; Meyer y col., 1978^a; Schmook y col., 2001), perros (Meyer y col., 1978^a), monos (Bucks y col., 1990), e incluso serpientes (Craane-van Hinsberg y col., 1995). Cada tipo de piel posee unas

características de permeabilidad algo diferentes (Bronaugh y col., 1982), por ello los valores obtenidos hay que trasladarlos a un valor predictivo de la situación *in vivo* en humanos.

Cuando la membrana utilizada es piel, ésta puede ser empleada de diferentes modos: piel íntegra incorporando estrato córneo, epidermis y dermis completa (OECD, 2004^b; SCCS, 2010), o parcial (eliminada con dermatomo) (Steiling y col., 2001), la epidermis con el estrato córneo (Bronaugh, 2004) o bien estrato córneo solo (Brain y col., 1998).

3.3. Técnicas experimentales

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

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. Normalmente el vehículo dador no se agita durante el tiempo de ensayo con el fin de reproducir las condiciones atmosféricas en las que el medicamento se aplica sobre la piel, donde se dan fenómenos de evaporación, difusión y depleción (Anissimov y Roberts, 2001).

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, temperatura u otros factores ambientales. De este modo, mediante ensayos comparativos, se pueden determinar los efectos de las técnicas de administración (Kubota y Yamada, 1990). Además, la membrana puede tratarse, previamente o durante el ensayo, con promotores, disolventes u otras sustancias para determinar su efecto sobre la permeabilidad.

Metodología de la dosis infinita: 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, relacionadas con la geometría de las células utilizadas, la disposición de las membranas y el modo de agitación de las soluciones contenidas en ambos compartimentos (Barry y Brace, 1977).

En los experimentos *in vitro*, generalmente se determinan las cantidades de soluto acumuladas en el compartimento receptor en función del tiempo. Cuando se representan dichas cantidades, para las dos técnicas descritas se obtienen los perfiles que se representan en la figura 10.

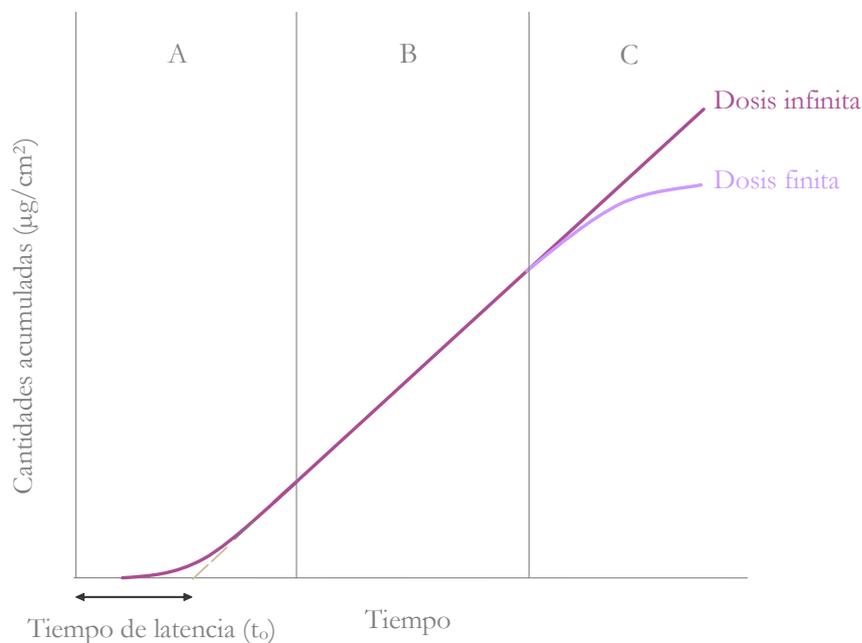


Figura 10. Perfil de las cantidades acumuladas en el compartimento receptor en función del tiempo, para las metodologías de la dosis finita e infinita.

La mayor información relativa a la absorción percutánea se obtiene a partir del estado estacionario (región B en la dosis finita; B y C en la dosis infinita). En la dosis finita, debido a que el perfil no es siempre lineal, pueden presentarse dificultades para obtener las medidas seguras en estado estacionario.

3.4. Dermatofarmacocinética

Las determinaciones de fármacos en plasma, sangre u orina tras una administración tópica son normalmente inadecuadas porque los niveles que se obtienen suelen ser bajos y por ello existe un debate, abierto desde hace tiempo por la FDA, sobre la necesidad de determinar qué parámetros resultarían adecuados para cuantificar la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía tópica.

La dermatofarmacocinética fue descrita por primera vez en 1998 por la FDA como método para evaluar el proceso de absorción y aclaramiento de un fármaco a nivel del estrato córneo. Desde entonces dicho método ha suscitado un interés creciente entre la comunidad científica puesto que permite la cuantificación de fármacos en el estrato córneo, la determinación de parámetros cinéticos en esta capa de la piel, y en última instancia la realización de pruebas de bioequivalencia entre formulaciones tópicas (FDA, 1998; Shah y col., 1998). En 2002, el protocolo de actuación para determinar la bioequivalencia entre formas tópicas fue retirado, en parte debido a dudas surgidas en estudios con geles de tretinoína cuyos resultados fueron dispares entre laboratorios (FDA, 2002). En la actualidad, no obstante, el método está siendo reevaluado, mejorado y se han publicado una serie de estudios detallados sobre la potencial utilidad de la metodología y sus limitaciones (Herkenne y col., 2008^a; N'Dri-Stempffer y col., 2008; N'Dri-Stempffer y col., 2009; Wiedersberg y col., 2009^a; Wiedersberg y col., 2009^b).

Para llevar a cabo los estudios dermatofarmacocinéticos se emplea una técnica mínimamente invasiva conocida como "tape-stripping" que está cada vez más aceptada y consiste en la aplicación y retirada secuencial de tiras adhesivas en la superficie de la piel. En teoría, una tira adhesiva quita una capa de corneocitos (figura 11). *In vivo* normalmente se realiza en el antebrazo, se requieren cerca de 30 tiras para eliminar la mayor parte de la capa córnea. Sin embargo, por lo general, la cantidad de estrato córneo eliminado no es linealmente proporcional al número de cintas adhesivas (Escobar-Chávez y col., 2008). El procedimiento es relativamente indoloro y no invasivo, dado que sólo las células muertas, los corneocitos embebidos en la matriz intercelular, se eliminan. Además, se ha demostrado que tras la aplicación de las tiras, existe una respuesta reparadora homeostática en la epidermis (Jiang y col., 1998; Menon y col., 1992) que provoca un rápido restablecimiento de la función barrera (Bashir y col., 2001).

Se han considerado diversos enfoques para cuantificar la cantidad de estrato córneo eliminado y determinar la integridad del mismo, tales como la espectroscopía confocal Raman (Mateus y col., 2013), un nuevo método de imagen mediante absorción UV (Russell y Guy, 2012) o sensores dieléctricos de capacitancia basados en imágenes (Klang y col., 2013). No obstante, en este momento, ningún método ha alcanzado aceptación universal.

El procedimiento fundamental, necesario para validar todos los demás, consiste en cuantificar el estrato córneo eliminado. Para ello se debe pesar cada tira adhesiva antes y después de su aplicación sobre la superficie de la piel (véase figura 11). Es necesario normalizar el número de capas de estrato córneo eliminadas en cada una de las aplicaciones de adhesivo. Una de las técnicas más aceptadas para ello consiste en evaluar la pérdida transepidérmica de agua tras cada una de las aplicaciones de cinta adhesiva ya que se puede utilizar para caracterizar la función barrera de la piel tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La pérdida transepidérmica de agua, más conocida por sus siglas en inglés TEWL (Transepidermal Water Loss), generalmente hace referencia a la cantidad total de vapor de agua que se pierde a través de la piel. Ésta tiene lugar por dos procesos: (a) una difusión constante de vapor de agua a través de la epidermis y (b) la pérdida de agua que tiene lugar a través del sudor. Sin embargo, solamente el primero de ellos constituye una medida de la función barrera de la piel.

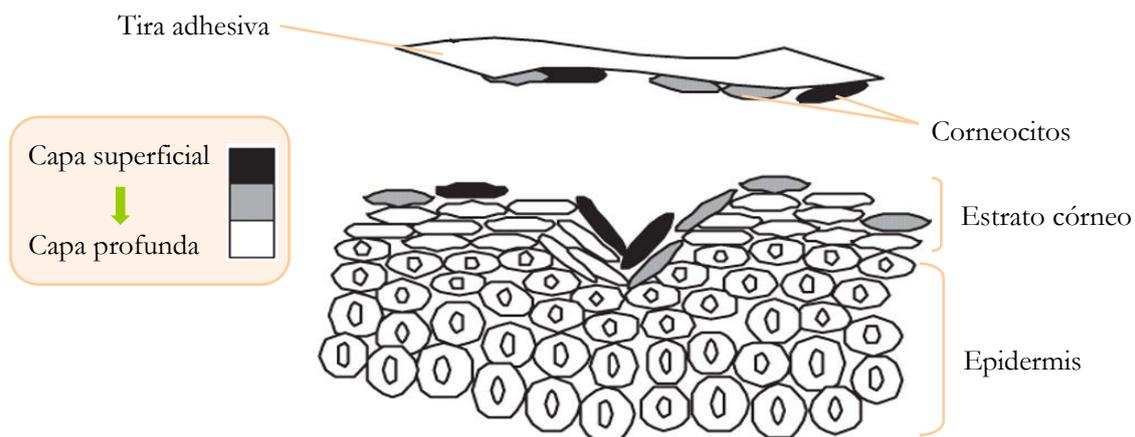


Figura 11. Ilustración de la técnica "tape-stripping". Imagen adaptada (Pailler-Mattei, 2011).

La técnica *tape-stripping* parece ser simple y fácil de realizar, sin embargo hay diferentes parámetros que pueden influir en la cantidad de estrato córneo extraído por un pedazo de tira adhesiva. Influye en los resultados el hecho de que éstos se hayan obtenido *in vitro* o *in vivo* (Bashir y col., 2001; Herkenne y col., 2006; Tsai y col., 1991^b), la hidratación de la piel, la cohesión entre las células (que aumenta con la profundidad del estrato córneo), la parte anatómica del cuerpo y las diferencias individuales (Breternitz y col., 2007; Löffler y col., 2004; Marttin y col., 1996).

Así pues, mediante la aplicación de tiras adhesivas que se retiran secuencialmente, es posible examinar la localización y distribución de sustancias en el estrato córneo, y posterior determinación de los parámetros farmacocinéticos (Alberti y col., 2001^a; Bommannan y col., 1990; Herkenne y col., 2007^a; Herkenne y col., 2007^b; Kalia y col., 2001; Lademann y col., 2009; Löffler y col., 2004; Lotte y col., 1993; Nicoli y col., 2009; Reddy y col., 2002), así como investigar la integridad del estrato córneo mediante la cuantificación del mismo (Escobar-Chávez y col., 2008; Russell y col., 2008). En humanos se utiliza para evaluar la función barrera (Bashir y col., 2001; Russell y col., 2008; van der Valk y Maibach, 1990), investigar patologías cutáneas tales como enfermedades inflamatorias o neoplásicas (Amarbayasgalan y col., 2012) o controlar la expresión génica. Recientemente se ha patentado un sistema no invasivo, EGIR[®] (Epidermal Genetic Information Retrieval) con una tecnología similar al *tape-stripping* cuyo fundamento es recoger células del estrato córneo para diagnosticar enfermedades como el melanoma (Wachsman y col., 2011; Wang y Maibach, 2011). Asimismo, es una buena metodología para evaluar la biodisponibilidad local de fármacos cuya diana terapéutica sea el mismo estrato córneo, tales como agentes antifúngicos (Alberti y col., 2001^b; Alberti y col., 2001^c), los filtros UVA/UVB (Chatelain y col., 2003; Fernandez y col., 2002; Scalia y col., 2011) o los antisépticos (Lboutounne y col., 2002; Parfitt y col., 2011), así como evaluar la reversibilidad de los efectos provocados cuando se aplican técnicas de promoción de fármacos a través de la piel que comprometen, en mayor o menor medida, la función barrera de la piel (Escobar-Chávez y col., 2008; Russell y col., 2008).

4. Métodos para incrementar la absorción transdérmica de fármacos

El número de fármacos capaces de atravesar por sí mismos el estrato córneo en cantidad suficiente para acceder a la circulación sanguínea y producir una respuesta terapéutica es reducido. Para ampliar el número de fármacos candidatos de ser integrantes de sistemas de administración transdérmica, es importante incrementar la penetración de fármacos a través de la piel.

Actualmente un considerable esfuerzo se dirige a reducir la función barrera del estrato córneo, de modo que mediante un parche de tamaño razonable pueda ser administrada una dosis efectiva, y así conseguir que el sistema de liberación mantenga el control de la velocidad de absorción. Para tal fin se han desarrollado diversas metodologías (Alexander y col., 2012; Hadgraft y Lane, 2005; Rizwan y col., 2009; Subedi y col., 2010), esquematizadas en la tabla 9. Entre ellos podemos destacar los *promotores químicos* de la absorción transdérmica y los métodos físicos, como la *iontoforesis*, entre otras estrategias promotoras.

Además, existen *procedimientos mínimamente invasivos*, cuyo objetivo común es romper la estructura continua de la piel, incrementando así el paso de fármacos a través de ella. Entre ellos destacan: dispositivos que bombardean la piel con partículas a elevada velocidad, dispositivos que eliminan el estrato córneo y los que atraviesan el estrato córneo, como las microagujas.

Estrategias para incrementar la absorción transdérmica			
Método	Mecanismo	Ventajas/Limitaciones	Referencias
Profármacos	Derivados inactivos sufren una biotransformación que origina la molécula terapéuticamente activa.	Se incrementa la lipofilia de ciertos fármacos facilitando su penetración. Se utiliza más para un efecto local.	Sloan y col., 2011
Sistemas sobresaturados	El flujo de fármaco es proporcional al grado de saturación que alcanza el fármaco en la formulación.	La estabilidad es un problema aunque se resuelve con el uso de polímeros que previenen el crecimiento de cristales.	Davis y Hadgraft, 1993 Pellet y col., 2003 Zhang y col., 2013
Transporte facilitado	Al pH ácido de la superficie de la piel, aminoras disustituidas forman pares iónicos con fármacos. Posteriormente, al pH de la epidermis viva (7.4), el par iónico se rompe liberando el permeante.	Se utiliza para compuestos aniónicos que no penetran fácilmente a través del estrato córneo.	Hadgraft y Valenta, 2000 Matschiner y col., 1995 Tan y col., 2009
Liposomas	Sistemas coloidales que transportan sustancias hidrófilas en su seno acuoso o lipófilas en la membrana.	Son los más utilizados desde los años 60. Presentan limitaciones en la estabilidad física y química, dificultad de escalado industrial y variabilidad biológica.	Nanda y col., 2006 Pierre y Dos Santos Miranda Costa, 2011
Promotores químicos	Sustancias químicas de diversa naturaleza que alteran la barrera de la piel.	Estrategia muy utilizada. La inclusión en formulaciones tópicas en cambio, en la actualidad, está limitada por sensibilización e irritación.	Ahad y col., 2009 Williams y Barry, 2004
Iontoforesis	Aplicación de corriente eléctrica durante un período de tiempo corto provocando movimiento de iones a través de la membrana bajo el efecto del campo eléctrico creado. Método físico: electrorrepulsión/electroósmosis.	Técnica no invasiva que promueve paso de fármacos ionizados. Máxima densidad de corriente en humanos (0.5 mA/cm ²), produce en la piel modificaciones y útil en un tamaño de molécula no superior a 7000 Da.	Guy y col., 2000 Kanikkannan, 2002
Electroporación	Método físico que consiste en la creación de poros acuosos tras exposición de voltajes elevados (30-100 V/cm) durante tiempos muy cortos (10 microsegundos-500 milisegundos).	La conductancia eléctrica y permeabilidad se incrementan y, dependiendo de la magnitud y duración del pulso aplicado, el efecto es reversible o irreversible.	Charoo y col., 2010 Denet y col., 2004 Prausnitz y col., 1995
Sonoforesis	Cavitación (oscilación de pequeñas bolsas de aire) y fluidificación lipídica debido a un aumento de temperatura por aplicación de ultrasonidos.	Bajas frecuencias inducen una mayor perturbación en la función barrera. Muchas cuestiones por resolver en cuanto a su mecanismo de acción, toxicidad y diseño tecnológico.	Mitragotri y col., 1996 Polat y col., 2011 Santoanni y col., 2004
Microaguja	Microproyecciones que producen el paso directo a través del estrato córneo sin romper ni estimular nervios de tejidos profundos.	Administración de moléculas grandes como péptidos, proteínas y vacunas.	Bariya y col., 2012 Sachdeva y Banga, 2011 Pettis y Harvey, 2012

Tabla 9. Estrategias para incrementar la absorción transdérmica.

4.1. Promotores químicos

Consiste en el empleo de sustancias químicas de diversa naturaleza susceptibles de incrementar la absorción transdérmica de fármacos. Estas sustancias tienen la capacidad de alterar las propiedades de barrera de la piel, y por tanto puede actuar como promotores de la absorción transdérmica (Barry, 1983; Barry 1987; Chattaraj y Walker, 1995; Hadgraft y Walters, 1992; Moser y col., 2001; Williams, 2003).

Un promotor de la absorción transdérmica debe reunir diversas características:

- Ser farmacológico, físico y químicamente inerte y estable.
- Ser potente, con actividad específica y producir efectos reversibles en la piel.
- Compatible con el fármaco y el resto de excipientes de la formulación.
- No debe producir irritación, ni ser sensibilizante o fototóxico.
- Poseer buenas características organolépticas.

En la actualidad los mecanismos de acción de estas sustancias promotoras de la absorción transdérmica no están totalmente aclarados, aunque sí han sido revisados en la última década por *Williams* y *Barry* (Williams y Barry, 2004). El efecto de los distintos promotores puede explicarse en parte por la teoría enunciada por *Barry* como "lipid-protein-partitioning" de donde se deduce que estas sustancias producen modificaciones en la estructura de los lípidos intercelulares y la conformación de las proteínas intracelulares, sumándole que pueden alterar el coeficiente de reparto del fármaco en la piel (Barry, 1991). Además, los compuestos promotores también pueden afectar indirectamente la piel mediante modificación de la actividad termodinámica del vehículo de la formulación transdérmica.

En la tabla 10 que se presenta a continuación, se muestra una clasificación de algunas de las sustancias químicas más estudiadas como promotores de absorción transdérmica en función de su naturaleza química y que pueden ser incluidas en un sistema de administración transdérmica.

Promotores químicos	
Clasificación química	Componente
Agua	Agua
Sulfóxidos y similares	Dimetilsulfóxido, Dodecilmetilsulfóxido
Ureas	Urea
Pirrolidonas y derivados	N-metil-2-pirrolidona, 2-pirrolidona
Azone® y derivados	Azone® (1-dodecilazacicloheptan-2-ona)
Derivados del dioxolano	SEPA®
Tensioactivos	
Aniónicos	Lauril sulfato sódico
Catiónicos	Bromuro de cetiltrimetil amonio
No iónicos	Monolaurato de sorbitano, Polisorbato 80
Zwiteriónicos	Sulfato de dodecildimetilamonio
Terpenos	Mentol, Limoneno
Alcoholes	
Alcanoles	Etanol
Alcoholes grasos	Alcohol caprílico
Glicoles	Propilenglicol
Ácidos grasos	Ácido oleico, Ácido undecanoico, Ácido decenoico

Tabla 10. Ejemplos de sustancias químicas empleadas como promotores químicos de la absorción transdérmica.

El **agua** es el promotor químico más natural (Roberts y Walter, 1993) y 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 (Feldman y Maibach, 1965; Idson, 1975). 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 a 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 (Barry, 1987). 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 corneo, incluso con porcentajes de hidratación elevados (hasta 150%) (Bouwstra y col., 1995^a). Asimismo, también se ha relacionado el efecto promotor del agua con su capacidad disolvente (Wester y Maibach, 1995).

El **dimetilsulfóxido (DMSO)** es uno de los primeros promotores de absorción transdérmica estudiados (Stoughton y Fritsch, 1964; Sulzberger y col., 1967). Este compuesto incrementa la penetración cutánea de numerosos fármacos (Reddy y Goosh, 2001; Shen y col., 1976; Sugibayashi y col., 1988), favoreciendo la absorción de sustancias tanto hidrófilas como lipófilas. Su mecanismo de acción se atribuye, por una parte, a sus propiedades disolventes que incrementan el reparto de los fármacos en la piel y, por otra, a sus efectos sobre los lípidos del estrato córneo, que incrementan la difusión (Barry, 1991). En la actualidad su uso está restringido debido a la irreversibilidad de su efecto sobre la piel por la creación de poros a altas concentraciones e interrupción general de la piel (Gurtovenko y Anwar, 2007), los problemas toxicológicos cutáneos que aparecen a los niveles requeridos para su efecto (Anigbogu y col., 1995; Sjögren y Anderson, 2000) y los efectos negativos en el epitelio pulmonar provocados por su inhalación (Sharma y col., 2011). Sin embargo, este promotor químico, DMSO, se utiliza en la solución tópica de diclofenaco sódico (aprobado en los Estados Unidos para tratar los signos y síntomas de la artrosis) y la solución de idoxuridina tópica (aprobada en Europa para el tratamiento del herpes zóster) (Marren, 2011).

Entre otros promotores de la penetración cutánea de fármacos, destaca el empleo de algunas aminas y amidas, entre las que destacan la urea, las pirrolidonas y el Azone[®].

En el caso de la **urea**, ésta es capaz de actuar sobre la estructura cutánea e incrementar la difusión de numerosos fármacos (Han y col., 1991). Se han descrito diferentes modos de actuación que se detallan a continuación. Al ser un compuesto de naturaleza higroscópica su principal efecto en la piel implica la hidratación del estrato córneo, aunque también actúa como queratolítico de la piel tras un contacto prolongado (Hellgren y Larson, 1974). Otros autores indican su capacidad de aumentar la fluidez de los lípidos cutáneos (Beastall y col., 1986). *Kim y colaboradores* (Kim y col., 1993^a) le atribuyen la capacidad de formación de canales hidrófilos que alteran la estructura del estrato córneo. Los resultados obtenidos por *Williams* indican, en cambio, que puede interactuar con las

proteínas de la piel y disminuir la unión a la queratina de fármacos que difunden en las proteínas, incrementando, por tanto, su absorción transdérmica (Williams, 1995).

Las **pirrolidonas** son utilizadas como promotores de la absorción percutánea de numerosas moléculas tanto hidrofílicas (manitol, 5-fluorouracilo, sulfaguanidina, etc.) como lipofílicas (betametasona-17-benzoato, hidrocortisona, progesterona, etc.) (Williams y Barry, 2004; Rizwan y col., 2009). Se trata de sustancias dotadas de estructuras del tipo de las sustancias presentes en el llamado factor hidratante natural (NMF). Los derivados de la pirrolidona más lipófilos parece ser que interactúan con los lípidos del estrato córneo, desorganizando su estructura (Kim y col., 1993^a). La 2-pirrolidona, a bajas concentraciones, desnaturaliza la α -queratina y a concentraciones elevadas interacciona con los lípidos incrementando la fluidez de la barrera cutánea (Barry, 1987).

El **Azone**[®] (1-dodecilazacicloheptan-2-ona o laurocapram) fue la primera molécula específicamente diseñada como promotor de la penetración cutánea de fármacos. Desde principios del año 1980 ha sido extensamente estudiada como tal. Presenta una amplia capacidad para actuar como promotor transdérmico de numerosos fármacos destinados a ser administrados vía tópica o sistémica y su efecto ha quedado demostrado en múltiples estudios llevados a cabo con fármacos de naturaleza hidrófila, lipófila e incluso neutra (Afouna y col., 2003; Hadgraft y col., 1985; Jampilek y Brychtova, 2012; López-Cervantes y col., 2006; Sugibayashi y col., 1992; Svozil y col., 2007; Williams, 2003). Además, Azone[®] es una sustancia segura para su uso en humanos (Wiechers y de Zeeuw, 1990). Actualmente, una nueva formulación transdérmica con triamcinolona acetónido con Azone[®] bajo el nombre de Durhalieve[™] se está probando para su comercialización en el tratamiento de dermatosis (Ranade y Cannon, 2011). Desde un punto de vista químico, se trata de una molécula compuesta por dos fracciones o porciones, una cadena de carácter lipófilo y un grupo lactámico de naturaleza altamente polar. Debido a su particular estructura, esta sustancia es muy lipófila ($\log P=6.4$) y su mecanismo de acción se relaciona con su capacidad de interacción con la región polar de los lípidos del estrato córneo, aumentando su fluidez (Hadgraft y col., 1996). 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-cerámidas y así fluidificar el estrato córneo, haciéndolo más permeable (Allan, 1995). Existen estudios que indican que el Azone[®] favorece en mayor medida la penetración de compuestos hidrofílicos (Barry y Bennet, 1987). Otros 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 córneo (Díez-Sales y col., 1996; Pilgram y col., 2001; Ward y Tallon, 1988). Sus efectos dependen de la concentración a la que se emplee, éste es más efectivo a bajas concentraciones, por ello se utiliza comúnmente a concentraciones entre el 1-5%.

La familia de compuestos **SEPA**[®] "Soft Enhancemet of Percutaneous Absorption" se ha desarrollado específicamente para ser promotores de absorción transdérmica. Se caracteriza por presentar en su estructura una molécula de carbono, hidrógeno y oxígeno (no contienen nitrógeno) a fin de disminuir el riesgo de sufrir metabolización derivando en compuestos altamente tóxicos. Su efecto promotor se atribuye a un incremento en la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos de la piel junto a una modificación producida en las interacciones de proteínas hidrofóbicas. Entre las moléculas SEPA[®], el 2-n-nonil-1,3-dioxolano, fue expresamente seleccionado, tras demostrar su eficacia como promotor de absorción en estudios de difusión transdérmica *in vitro*, como el mayor promotor de dicha familia (Goldstein y col., 2001).

Los agentes **tensiactivos** son componentes de un gran número de formulaciones cosméticas, farmacéuticas y alimentarias. Se caracterizan por la presencia de grupos polares y no polares (generalmente cadenas alquílicas o arílicas flexibles) en la misma molécula. Entre todos, los **tensiactivos no iónicos** son los más empleados en el sector farmacéutico, por su elevada capacidad de emulsificación y solubilización, y mínimas acciones secundarias, tanto en caso de aplicación tópica como de administración sistémica (Murahata y col., 1988). Al igual que ocurre con otros sistemas tensiactivos, los no iónicos se han mostrado capaces de promover, retardar o carecer de efecto sobre la velocidad de penetración cutánea de distintos fármacos (Hwang y Danti, 1983).

Los **tensiactivos aniónicos** pueden penetrar en la piel y modificar su capacidad de actuar como barrera (Gibson y Teall, 1983; Karande y Mitagroti, 2002; Shokri y col. 2001). Sus efectos dependen, en gran medida, de la longitud de la cadena alquílica de la molécula, mostrándose más eficaces aquellos que poseen una cadena de 10 o 12 átomos de carbono. Los más ampliamente estudiados dentro de este grupo son los alquilsulfatos, como el laurilsulfato sódico, cuya acción podría estar relacionada con la interacción producida a nivel de los lípidos del estrato córneo. Este compuesto puede incrementar el volumen de agua entre los lípidos intercelulares y, a su vez, desorganizarlos (Gibson y Teall, 1983). Sin

embargo, estos tensiactivos producen problemas de irritación cutánea que limitan sus posibilidades de uso como promotores (Rhein y col., 1990).

Los **tensiactivos catiónicos** son más irritantes que los aniónicos. A pesar de ello, las aminas de cadena alquílica larga han demostrado ser capaces de facilitar la permeación de fármacos aniónicos mediante un mecanismo de transporte facilitado que consiste en la formación de pares iónicos (Barker y Hadgraft, 1981).

Los **terpenos** son sustancias naturales presentes en los aceites esenciales (Paduch y col., 2007). Ambos, aceites esenciales y terpenos, han sido descritos como promotores de la absorción transdérmica de diversas sustancias (Aqil y col., 2007; Sapro y col., 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 (Sapro y col., 2008). También se atribuyen a estos compuestos efectos disolventes que incrementan el reparto de fármacos lipófilos en este estrato (El-Kattan y col., 2001; Godwin y Michniak, 1999; Williams y Barry, 1991). Otros estudios 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 (Cornwell y Barry, 1993). 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 **etanol**, es una sustancia utilizada en muchas formulaciones transdérmicas como solvente. Diversos estudios han demostrado su acción promotora de penetración cutánea de diversos fármacos (Berner y col., 1989; Manabe y col., 1996; Watkinson y col., 2009). 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 vehículo, mientras que a concentraciones elevadas, se ha indicado que produce la extracción de los lípidos intercelulares y produce expansiones osmóticas en el estrato córneo. 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 (Chattaraj y Walker, 1995; Megrab y col., 1995).

Otros **alcoholes** presentan un efecto promotor que se ha relacionado con la longitud de su cadena alquílica (Kim y col., 1992) con la consecuencia de un posible aumento de la solubilidad del fármaco aunque no se descarta una acción directa sobre los componentes de la membrana (Tsuzuki y col., 1988). De hecho, para el alcohol láurico, que actúa como promotor de la penetración transdérmica, se ha sugerido una acción directa sobre los lípidos cutáneos (Yamada y Uda, 1987). Por otra parte, se ha visto 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 (Berner y Liu, 1995). Entre los glicoles más estudiados con efecto promotor de la absorción transdérmica destaca el propilenglicol. 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 no se descarta un aumento del reparto del fármaco en el estrato córneo motivado por la presencia del propilenglicol (Barry, 1991; Puglia y col. 2001).

Los **ácidos grasos** son promotores de absorción de numerosos fármacos (Barry y Bennett, 1987; Mittal y col., 2009; Thomas y Panchagnula, 2003). Se ha determinado además que ceramidas presentes en la piel contienen ácidos grasos utilizados como promotores químicos (Novotný y col., 2009). 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 (Andega y col., 2001; Thomas y Panchagnula, 2003). Asimismo, estudios sobre la posición y configuración de los dobles enlaces permiten demostrar que los isómeros *cis* son más eficaces que los *trans* (Cooper, 1984). 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 del estrato córneo (Rowat y col., 2006; Hoopes y col., 2011). Además, un reciente estudio determina que ciertos ácidos grasos insaturados, especialmente el ácido oleico, modula la actividad inflamatoria en las heridas e incrementa la respuesta reparadora *in vivo* siendo efectivo en el tratamiento de lesiones cutáneas (Cardoso y col., 2011).

4.2. Iontoforesis

Se conoce así al método físico más utilizado con el fin de incrementar el paso de fármacos a través de la barrera cutánea (Costello y Jeste, 1995; Dixit y col., 2007; Guy y col., 2000; Hu y col., 2011; Kalia y col., 2004; Kanikkannan, 2002; Nolan y col., 2007). Esta

estrategia también puede ser utilizada para promover fármacos a través de mucosas (Ciach y col., 2011; Hu y col., 2011; Wei y col., 2012), uñas (Delgado-Charro, 2012) e incluso por vía ocular (Gaudana y col., 2012; Kralinger y col., 2003; Vollmer y col., 2002).

La iontoforesis es una estrategia que produce un aumento en la absorción transdérmica de fármacos al aplicar una pequeña corriente eléctrica (no superior a 0.5 mA/cm^2) durante un período de tiempo relativamente corto (Nanda y col., 2006).

Un **dispositivo** básico **iontoforético** (figura 12) consta de dos reservorios, que contienen el principio activo y electrolitos, en los cuales se disponen el ánodo y cátodo, respectivamente. Éstos se conectan por medio de un generador de corriente continua de baja intensidad, de modo que al cerrar el circuito el campo eléctrico que se crea aumenta el transporte de las sustancias ionizadas a través de la membrana, respecto al flujo debido a la difusión pasiva (Hadgraft y Guy, 1989; Phipps y col., 2007; Walters y Hadgraft, 1993). De esta manera, se incrementa el paso de fármacos, principalmente cargados positivamente ya que la piel actúa como una membrana de permeabilidad selectiva, por su carga neta negativa (Burnette y Ongpipatanakul, 1987). Como la corriente favorece el transporte de cationes se produce un flujo de disolvente del ánodo al cátodo y por tanto se favorece también el transporte de solutos no cargados, que se encuentran disueltos, en la misma dirección (Delgado-Charro y Guy, 1994; Pikal, 1990).

Los electrodos de Ag/AgCl, esquematizados en la figura 12, son los más utilizados por su reproducibilidad, estabilidad (Cullander y col., 1993; Janz e Ives, 1968; Tassinary y col., 1990) y reversibilidad (pueden funcionar en ambos sentidos de la reacción electroquímica). Al aplicar un campo eléctrico al sistema, se fuerza el movimiento de electrones en el circuito externo que producen reacciones electroquímicas en cada compartimento del circuito interno. Por una parte, en el ánodo (electrodo positivo) tiene lugar la oxidación de la plata (Ag^0) que, mediante la presencia de iones cloruro (Cl^-), se deposita como AgCl sobre el electrodo. Por otra parte, en el cátodo (electrodo negativo) se deposita Ag^0 a partir del AgCl del que está constituido el electrodo, liberándose iones cloruro al medio. En el circuito interno, los iones presentes en el medio deben transportar la misma cantidad de carga aplicada en el circuito externo. De este modo, los cationes se desplazan desde el ánodo hacia el cátodo por el circuito interno, atravesando así la piel. Este transporte es el utilizado para el transporte transdérmico de fármacos cargados positivamente. Los aniones, por otra parte, son repelidos en sentido inverso, es decir, desde el cátodo hacia el ánodo.

Este mecanismo es el que permite el transporte transdérmico de principios activos cargados negativamente.

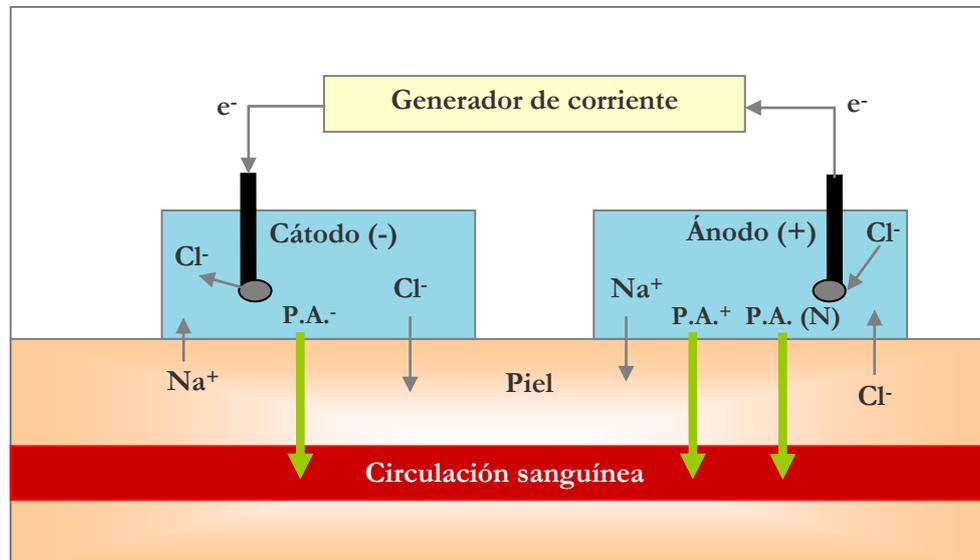


Figura 12. Esquema de un dispositivo iontoforético.

Generalmente las densidades de corriente eléctrica utilizadas en la aplicación de la iontoforesis están comprendidas entre 0.1 y 0.5 mA/cm², ya que a partir de 0.5 mA/cm² el paso de corriente empieza a percibirse como una sensación molesta para el paciente (Ledger, 1992).

Frente a otras estrategias utilizadas para incrementar el paso de fármacos a través de la piel, la iontoforesis presenta numerosas **ventajas** entre las que se pueden citar las siguientes:

- Es una técnica de administración no invasiva que minimiza el riesgo de infección.
- Se puede aplicar tanto en terapias con finalidad local como sistémica.
- La corriente eléctrica promueve el paso de fármacos ionizados que por el hecho de estar cargados se absorben con mucha dificultad a través de la piel.
- Se trata de una técnica efectiva. En comparación con los métodos convencionales de administración transdérmica, las cantidades de fármaco y

velocidades de absorción son elevadas y controladas por el dispositivo mediante la modificación de la densidad de corriente aplicada.

- Presenta menor variabilidad que la difusión pasiva, hecho que aporta una mayor seguridad en la administración (Wang y col., 2005^a).
- Es una técnica muy versátil que permite una administración del fármaco constante o pulsátil, adaptándose a las necesidades del paciente y/o tratamiento (Kalaria y col., 2012).
- Es posible diseñar dispositivos de reducido tamaño, hecho que aumenta la aceptación por parte del paciente.
- El efecto que el paso de corriente eléctrica provoca en la piel, durante períodos de tiempo cortos y a intensidades bajas, son totalmente transitorios y reversibles (Brand y col., 1997; Ledger, 1992; Oh y Guy, 1995), adaptándose a las necesidades del paciente y/o del tratamiento.
- Presenta un gran potencial para la administración de proteínas o de principios activos de tipo péptido que, debido a sus características, no pueden ser administrados vía oral por la metabolización y degradación química que sufren en el tracto gastrointestinal (Gratieri y col., 2011).

El paso de un fármaco a través de la piel mediante la aplicación de la técnica de iontoforesis representa diferencias respecto a su paso a través de la misma mediante difusión pasiva (Cullander, 1992; Wang y col., 2005^a). Aunque los apéndices cutáneos representan una pequeña fracción del área total de la piel, la vía transapendicular participa en el transporte iontoforético en mayor proporción que en el caso del transporte pasivo (Bath y col., 2000; Burnette y Ongpipatanakul, 1988; Cullander y Guy, 1991; Cullander 1992; Essa y col., 2002; Scott y col., 1993^a; Scott y col., 1993^b). Algunos autores (Burnette y Ongpipatanakul, 1988; Cullander, 1992; Delgado-Charro y Guy, 1994; Ledger, 1992; Scott y col., 1992) sugieren que la implicación de los apéndices en el transporte mediado por iontoforesis pueda ser debido a la creación de canales iónicos. En cambio, otros autores, han localizado el flujo electroosmótico en los folículos pilosos (Bath y col., 2000). Por otra parte, la vía transepidérmica y, dentro de esta, la vía intercelular, participa de manera importante en el transporte por iontoforesis (Turner y Guy, 1997). Diversos estudios evidencian que, a pesar de que la vía transapendicular cuatriplica el transporte iontoforético

de moléculas por unidad de superficie, la vía transepidérmica, contribuye, en términos absolutos, en mayor medida al transporte total de moléculas.

Asimismo, el paso de una molécula por iontoforesis depende de sus propiedades fisicoquímicas, siendo los apéndices la vía preferente para moléculas hidrófilas, mientras que la vía transepidérmica (principalmente la intercelular) es la utilizada por compuestos lipófilos (Turner y Guy, 1997).

Los **mecanismos de transporte** de un fármaco mediante iontoforesis son, principalmente, la electrorrepulsión y la electroósmosis.

La **electrorrepulsión**, también conocida como electromigración, es el resultado directo de la interacción del campo eléctrico aplicado con los iones existentes en la solución (Guy y col., 2000; Guy y col., 2001; Kalia y col., 2004). El flujo transdérmico de un fármaco debido a la electrorrepulsión (J_{er}) se puede obtener mediante la ecuación:

$$J_{er} = \frac{t \cdot I}{Z \cdot F} \quad \text{Ec. 4}$$

donde t es el número de transporte de dicho fármaco, I es la intensidad de corriente aplicada, F la constante de Faraday y Z la carga del compuesto.

De este modo, si se mantiene constante el número de transporte del compuesto, su flujo transdérmico puede ser controlado mediante la intensidad de corriente aplicada, tal como predice la ley de Faraday (ecuación 4) (Burnette, 1989; Phipps y Guory, 1992). En este hecho reside una de las ventajas de la iontoforesis, que asegura una administración controlada del fármaco, proporcional a la cantidad de corriente aplicada.

La fracción de carga i transportada por un ión x constituye su número de transporte (t) y éste se puede expresar como:

$$t_x = \frac{i_x}{i_t} \quad \text{Ec. 5}$$

No sólo el compuesto de interés va a transportar la carga eléctrica generada en el campo eléctrico, sino que todos los iones presentes en el circuito van a competir por transportar dicha carga. Los iones presentes en gran concentración y de pequeño tamaño

(por su mayor movilidad) van a ser los que transporten una mayor fracción de carga, hecho que repercute negativamente en la efectividad del transporte de fármacos de mayor tamaño mediante la aplicación de iontoforesis.

La suma de todos los números de transporte de los iones presentes es igual a la unidad. Por este motivo, los fármacos aplicados nunca alcanzan un número de transporte elevado, ya que se mantiene la competición con los iones endógenos (Clemessy y col., 1995; Lopez y col. 2003^a; Thysman y col., 1992).

Por otra parte, la **electroósmosis** consiste en un flujo de solvente que se origina bajo la aplicación de un campo iontoforético debido a la carga eléctrica de la piel y que ocurre desde el ánodo hacia el cátodo (Marro y col., 2001^b; Pikal, 2001).

La piel humana posee cargas eléctricas en su estructura procedentes, por ejemplo, de aminoácidos de las proteínas y de ácidos grasos libres. El conjunto de todas estas cargas presentes en la piel da como resultado una carga neta negativa, lo que la convierte en una membrana de permeabilidad selectiva a los cationes. Gracias a la permeabilidad selectiva de la piel este flujo electroosmótico de solvente se produce fundamentalmente desde el ánodo (Burnette y Ongpipattanakul, 1987; Pikal y Shah, 1990^a). Con él arrastra moléculas, ya sean neutras o estén cargadas, que se encuentran disueltas en el medio. De esta manera, el flujo electroosmótico favorece el transporte de fármacos cargados positivamente, ya que se suma al flujo por electrorrepulsión; en cambio, reduce el transporte de fármacos con carga negativa, debido a que contrarresta su flujo por electrorrepulsión (Green y col., 1991^a; Green y col., 1991^b). Por otra parte, el flujo electroosmótico constituye el único mecanismo de transporte en el caso de fármacos neutros (Delgado-Charro y Guy, 1995^a; Guy y col., 2001; Kim y col., 1993^b).

A pesar de la importancia de la electroósmosis, la electrorrepulsión constituye un mecanismo de transporte mucho más eficaz. Por este motivo, para compuestos ionizados con números de transporte significativos, la electrorrepulsión constituye el principal factor del flujo iontoforético observado. Por el contrario, en el caso de compuestos con números de transporte muy bajos, la electroósmosis cobra una importancia mucho mayor, llegando incluso, en el caso de moléculas neutras, a ser el único mecanismo implicado en el transporte por iontoforesis.

La iontoforesis por su mecanismo de actuación puede utilizarse con fines diagnósticos o analíticos, ya que, mediante iontoforesis reversa, la corriente aplicada se

puede utilizar para extraer sustancias, bien sean neutras o bien estén cargadas, del interior del organismo. El proceso de extracción puede variarse si se modifican parámetros como el pH del medio, la densidad de corriente aplicada y/o la fuerza iónica del medio (Leboulanger y col., 2004; Merino y col., 1999; Sieg y col., 2009).

Existen diversos **factores que modifican el transporte iontoforético** de un fármaco. Por ejemplo, el flujo transdérmico de una molécula bajo la aplicación de un campo iontoforético puede controlarse, tal y como se deduce de la ecuación 4, mediante la **intensidad de corriente aplicada** y el **tiempo de aplicación** (Brand y col., 1997; Femenía-Font y col., 2005^a; Phipps y Gyory, 1992). En este hecho radica la enorme utilidad de la iontoforesis como sistema de administración controlada para numerosos fármacos.

La **fuerza iónica del medio** es un factor muy importante, como se ha mencionado anteriormente, ya que es necesaria la presencia de una cantidad mínima de electrolitos para transportar la carga eléctrica. No obstante, iones muy pequeños y móviles, como Na^+ y Cl^- , compiten por transportar la carga con el fármaco reflejándose en una disminución del número de transporte y consecuentemente del flujo transdérmico (Clemessy y col., 1995).

Un cambio del valor de **pH** durante el transporte mediante iontoforesis de un fármaco puede alterar desde el transporte del fármaco por electrorrepulsión, por variaciones en el grado de ionización del fármaco, hasta el transporte por electroósmosis, por cambios en la carga neta de la piel (Burnette y Ongipattanakul, 1987; Green y col., 1991^b; Guy y col., 2001; Kim y col., 1993^b; Merino y col., 1999). Por otra parte, los iones hidrogeniones (H^+) e hidroxilos (OH^-) poseen movilidades muy elevadas, por lo que es importante mantener la concentración de aquel que vaya a competir con la molécula a administrar lo más bajas posible a fin de evitar su competencia por el transporte de la carga y optimizar el flujo del fármaco.

En principio, el transporte del fármaco se ve reducido en presencia de soluciones amortiguadoras de pH, ya que la presencia de otros iones competidores por la carga produce, como se ha comentado, una disminución en el número de transporte del fármaco y, en consecuencia, del flujo iontoforético total observado (Clemessy y col., 1995; Green y col., 1991^b; Phipps y Gyory, 1992; Yoshida y Roberts, 1995). A pesar de ello, las soluciones amortiguadoras de pH son, en muchos de casos, imprescindibles para mantener estable el pH del medio.

El transporte iontoforético, tanto si el fármaco es neutro o está cargado (catiónico o aniónico) depende de su **masa molecular**. Cuanto mayor sea la masa molecular del fármaco, menor será su movilidad y, en consecuencia, su número de transporte. Asimismo, cuanto menor sea su número de transporte, la contribución electroosmótica en su transporte por iontoforesis será mayor (Nair y Panchagnula, 2003; Turner y col., 1997; Yoshida y Roberts, 1993). A pesar de ello, sustancias de elevada masa molecular; por ejemplo proteínas (Gratieri y col., 2011), así como hormonas del tipo luteinizante (LHRH) (Raiman y col., 2004), calcitonina (Stamatialis y col., 2004; Thysman y col., 1994), hormona del crecimiento (Kumar y col., 1992), paratiroidea (Suzuki y col., 2002), insulina (Pillai y col., 2003), la hormona antidiurética, también conocida como arginina vasopresina (Nair y Panchagnula, 2003) y oligodesoxinucleótidos (Liu y col., 2013), pueden ser transportadas con éxito a través de la piel mediante la aplicación de iontoforesis.

Por último, el efecto de la **concentración del fármaco** sobre su transporte mediante iontoforesis depende de la presencia de otros iones en el vehículo. En presencia de otros iones, al aumentar la concentración de fármaco en el vehículo los flujos iontoforéticos observados son mayores, ya que al aumentar la concentración de éste aumentan sus posibilidades de transportar la carga. No obstante, algunos cationes lipófilos se adsorben a la piel y su transporte no aumenta proporcionalmente a la concentración (Delgado-Charro y col., 1995^a; Delgado-Charro y col., 1995^b). Sin embargo, en ausencia de iones competidores, el flujo transdérmico del fármaco es prácticamente independiente de la concentración de fármaco (Kasting y Keister, 1989).

Hasta la fecha existen **dispositivos iontoforéticos** aprobados para su comercialización y también en proceso de estudio por la FDA. Sin embargo, algunos de ellos han sido retirados del mercado farmacéutico por falta de seguridad y la generación de ciertas reacciones alérgicas a nivel cutáneo (véase tabla 11).

Un ejemplo es la comercialización del primer parche transdérmico precargado autorizado por la FDA en el año 2005 llamado LidoSite™ que contiene lidocaína y epinefrina además de llevar incorporado una pila de tal manera que no es necesario conectarlo a un generador de corriente. En su interior se encuentran el ánodo y cátodo y un dispositivo que permite al paciente controlar a demanda la liberación del principio activo incluido en el dispositivo (Zempsky y col., 2004).

Otro dispositivo transdérmico de estas características comercializado hasta hace poco es aquel que contenía fentanilo indicado para el dolor post-operatorio y para personas

que requieran analgesia con opiodes. Éste es un sistema Ionsys™ con una tecnología de transporte eléctrico E-trans® donde el ánodo contiene fentanilo y el cátodo sustancias inactivas (Ashburn y col., 1995). La Agencia Europea de Medicamentos lo retiró del mercado en el año 2008 por falta de seguridad en la corriente eléctrica y la continua administración de fentanilo (European Medicines Agency, 2009).

Asimismo, otra de las aplicaciones atractivas de los sistemas iontoforéticos es el diagnóstico y detección de sustancias en sangre de manera no invasiva. Un ejemplo fue GlucoWatch Biographer® que permitió la detección de niveles de glucosa en sangre en adultos y niños (Eastman y col., 2002; Tierney y col., 2001). Éste también fue retirado por la FDA en el año 2010 aunque los motivos no fueron especificados (FDA, 2010).

Sistemas transdérmicos iontoforéticos			
Nombre comercial	Principio activo	Indicación terapéutica	Estado
Ionsys	Fentanilo	Dolor	Retirado
Lidosite	Lidocaina/Epinefrina	Anestesia local	Retirado
Phoresor II	Pilocarpina, morfina	Dolor	Comercializado
Iontopatch	Dexametasona	Artritis	Estudio (Fase III)
Solovir	Aciclovir	Herpes labial	Estudio (Fase II)
Zecuity	Sumatriptán	Migraña	Comercializado

Tabla 11. Ejemplos de sistemas terapéuticos iontoforéticos de administración local o sistémica en el mercado farmacéutico (Drugs@FDA, 2013; Goldstein y col., 2012; Ranade y Cannon, 2011).

Capítulo III

Validación de dos métodos analíticos para la determinación del nadolol e hidrocloreuro de propranolol

1. Introducción

Los métodos analíticos que se utilizan en todos los laboratorios deben demostrar que proporcionan resultados fiables y adecuados para su finalidad ya que muchas decisiones que se toman están basadas en la información que estos datos proporcionan. Validar un método consiste en verificar y documentar su validez, adecuarse a unos determinados requisitos, previamente establecidos para poder resolver un problema analítico particular. Estos requisitos, según la FDA, son los que definen los parámetros o criterios de calidad que debe poseer un método a utilizar para resolver el problema analítico. La tabla 12 muestra los parámetros que pueden ser de tipo estadístico o bien de tipo operativo/económico (FDA, 2000).

El nadolol y el hidrocloreuro de propranolol son dos beta-bloqueantes comúnmente utilizados en la prevención de la migraña. Si se considera la baja biodisponibilidad oral de los dos fármacos y los inconvenientes propios de la administración intravenosa, surge la necesidad de estudiar nuevas vías de administración como es la vía transdérmica.

Con el fin de realizar los ensayos de absorción transdérmica del nadolol y propranolol es imprescindible disponer de dos métodos analíticos que permitan la cuantificación de ambos beta-bloqueantes en las muestras provenientes de dichos ensayos.

Criterios de calidad	
Tipo estadístico	Tipo operativo/económico
Exactitud	Inversión
Precisión	Mantenimiento
Reproducibilidad	Rapidez
Especificidad	Facilidad de uso
Selectividad	Simplicidad
Límite de detección	
Límite de cuantificación	
Robustez	

Tabla 12. Parámetros de calidad de un método analítico.

Una revisión bibliográfica exhaustiva revela que son diversos los autores que han descrito previamente métodos analíticos para la detección y cuantificación de ambos fármacos. Entre ellos se incluyen métodos de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con fotodiodo de detección UV/Visible (Delamoye y col., 2004; Patel y col., 1981; Salman y col., 2010), la combinación con detector de fluorescencia (Ranta y col., 2002), espectrometría de masas (MS) (Maurer y col., 2004), la combinación de éste con HPLC (Umezawa y col., 2008), MS con cromatografía de gas (Liu y col., 2009), colorimetría (Amin y col., 2002), fluorescencia (Belas y col., 1995; Hoshino y col., 1994; Srinivas y col., 1995) y detección electroquímica (Collins y Arrigan, 2009; Collins y col., 2010). La infraestructura necesaria para aplicar algunos de estos métodos no es asequible, factible ni aplicable para laboratorios pequeños; otros requieren una compleja preparación previa de las muestras y un número elevado de los métodos son de detección múltiple de beta-bloqueantes procedentes de fluidos corporales como plasma y orina. Además, la muestra proveniente de difusión transdérmica se caracteriza por la presencia de compuestos endógenos de la piel que genera interferencias, limitando así su manejo y la detección de fármacos.

El objetivo del trabajo descrito en este capítulo es el desarrollo de dos métodos analíticos rápidos y sencillos, capaces de cuantificar el nadolol e hidrocloreuro de propranolol presentes en muestras procedentes de los ensayos de difusión transdérmica y la validación de los mismos, de modo que se pueda demostrar que proporcionan resultados fiables y adecuados para garantizar los resultados obtenidos. Asimismo, se han realizado estudios para verificar la estabilidad de ambos fármacos en la muestras tras los experimentos transdérmicos.

2. Materiales y métodos

2.1. Fármacos ensayados

El **nadolol** (Monografía 1789 de la Farmacopea Europea) y el **hidrocloruro de propranolol** (Monografía 0568 de la Farmacopea Europea) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Química, S.A. (Tres Cantos, Madrid, España) con unas purzas del 98.0% y 98.9% (m/m), respectivamente. Ambos beta-bloqueantes presentan un aspecto físico similar aunque propiedades diferentes (véase tabla 13).

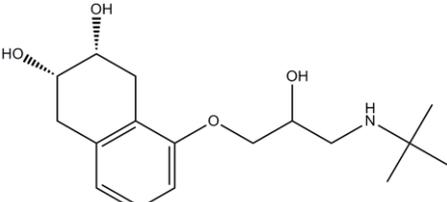
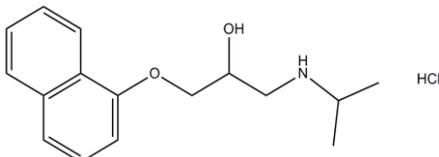
	Nadolol	Hidrocloruro de propranolol
Nombre químico	1-(terc-Butilamino)-3-[(5,6,7,8 tetrahidro- <i>cis</i> -6, 7-dihidroxi-1 naftil)oxi]-2-propanol	Hidrocloruro de 1-isopropilamino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol
Estructura química		
Fórmula empírica	C ₁₇ H ₂₇ NO ₄	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂ · HCl
Peso molecular	309.4 g/mol	295.8 g/mol
Lipofilia (pH 7.4)	log P = 1.2	log P = 3.03
Solubilidad	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Etanol, metanol y ácido clorhídrico: soluble ✓ Cloroformo, cloruro de metileno y alcohol isopropílico: ligeramente soluble ✓ Agua a 20°C; 8.4 mg/mL 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Etanol y dimetilsulfóxido: soluble ✓ Agua a 20°C; 0.1 mg/mL ✓ Agua a 60°C; 50 mg/mL
pKa (22°C)	9.67	9.45
Punto fusión	~130°C	~163°C
Forma física	Polvo cristalino blanquecino e inodoro	Polvo blanco e inodoro

Tabla 13. Características del nadolol y del hidrocloruro de propranolol.

2.2. Solución amortiguadora de pH

Para la preparación de las soluciones estándar se empleó una solución tampón, isotónica con el plasma de pH 7.4 [NaCl (150 mM)-HEPES (20 mM)]. El cloruro sódico y el HEPES [N-(2-Hydroxiethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)] de grado analítico, fueron suministrados por Sigma-Aldrich CO. (St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Una vez preparada, la solución se almacenó en frascos topacio a 4°C. Antes de su utilización, el pH de la solución se ajustó a 7.4 con una base fuerte, NaOH 1N, o con un ácido fuerte, HCl 1N (también suministrados por Sigma-Aldrich CO) y seguidamente se filtró a vacío a través de filtros desechables de 0.45 µm de diámetro MF Monitor Refills® suministrados por Millipore Corporate (Billerica, Massachusetts (MA), Estados Unidos).

Para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua ultrapura que se obtuvo a partir de un sistema Barnstead Nanopure Analytical de Thermo Fisher Scientific (Alcobendas, Madrid, España) de una conductividad a 25°C de 18.2 MegaOhmios-cm, un nivel de carbono orgánico total entre 5-10 ppb y sin la presencia de partículas (0.2 µm).

2.3. Método analítico

El equipo empleado para el análisis de muestras fue un sistema de cromatografía líquido-líquido de alta eficacia (HPLC) que permite la detección de cantidades mínimas de permeantes.

El cromatógrafo líquido-líquido utilizado consta de:

- Bomba cuaternaria Waters 600 Controller.
- Inyector automático Waters 717 Plus Autosampler.
- Detector UV-visible, modelo Water 996 Photodiode Array Detector.

La adquisición y procesado de los datos, así como la gestión de su instrumentación se realizó mediante el programa informático Millennium Chromatography Software® (Waters Cromatografía, S.A.; Barcelona, España).

2.3.1. Condiciones cromatográficas

La separación de los componentes presentes en las muestras analizadas, obtenidas tanto de los ensayos de permeación del nadolol como hidrocloreuro de propranolol, se llevó

a cabo a temperatura ambiente (25 ± 2)°C mediante una columna de fase reversa de 250 x 4.0 mm con un empaquetamiento formado por partículas de sílice C₁₈ de 5 µm de diámetro medio (Kromasil® C₁₈).

En el análisis de las muestras se utilizó una fase móvil diferente para cada fármaco. Ambas fases consistían en una mezcla de solución acuosa de amonio di-hidrógeno fosfato monobásico 0.05 M y acetonitrilo, obtenidos ambos de Análisis Vínicos S.L. (Tomelloso, Castilla la Mancha, España). El pH de la mezcla se ajustó con ácido orto-fosfórico (Panreac Química S.A.; Barcelona, España) al 0.05 M. Las fases móviles se filtraron, una vez preparadas, a través de filtros MF Monitor Refills® (Millipore Corpotare; Billerica, MA, Estados Unidos) con un tamaño de poro de 0.45 µm. La cuantificación del nadolol e hidrocloreuro de propranolol en las muestras, se realizó midiendo la absorbancia a 269 y 291 nm, respectivamente. El flujo de la fase eluyente se mantuvo constante a 1 mL/min. Se inyectaron alícuotas de 50 µL. En la tabla 14 se especifican las condiciones cromatográficas para la detección y cuantificación de ambos beta-bloqueantes.

Condiciones cromatográficas		
	Nadolol	Hidrocloreuro de propranolol
Columna	Kromasil® C ₁₈ (250 x 4.0 mm, 5 µm)	
Fase móvil [A:B (v/v)]*	80:20	60:40
pH	4.8	
Flujo eluyente	1 mL/min	
Volumen inyección	50 µL	
Detección UV	269 nm	291 nm

Tabla 14. Condiciones cromatográficas para el análisis del nadolol e hidrocloreuro de propranolol por HPLC-UV. * Fase móvil [A (amonio di-hidrógeno fosfato) : B (acetonitrilo)].

2.3.2. Validación de los métodos analíticos

La validación de ambos métodos analíticos se llevó a cabo mediante la construcción de múltiples rectas de calibrado para ambos beta-bloqueantes. Para la obtención de dichas rectas se realizaron una serie de diluciones a partir de la solución madre de los fármacos con la solución salina isotónica de pH 7.4 hasta conseguir soluciones de distintas concentraciones que abarcaron el intervalo de concentraciones de las muestras obtenidas

en los ensayos. La tabla 15 especifica las concentraciones de las soluciones madre y diluciones.

Soluciones de partida y patrones		
Fármaco	Concentración solución madre (μM)	Concentración patrones (μM)
Nadolol	16700	0.17, 0.84, 1.67, 16.7, 83.5, 167
Hidrocloruro de propranolol	1130	0.11, 1.13, 5.64, 11.3, 56.4, 113

Tabla 15. Concentraciones de las soluciones madre y de los distintos patrones empleados (μM) para la obtención de las rectas de calibrado.

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

$$y = b \cdot x + a \quad \text{Ec. 6}$$

donde, y es el área del cromatograma, x la concentración, b la pendiente de la recta y a 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 significativa entre las áreas de los cromatogramas y las concentraciones del fármaco patrón ($r > 0.98$). Además se comparó estadísticamente (prueba t de Student) la pendiente de la recta y la ordenada en el origen con cero. Como criterios de aceptación, se emplearon los plasmados en las Conferencias Internacionales de armonización de requisitos técnicos en el registro de productos farmacéuticos de uso humano (ICH, 1994; ICH, 1996) y los estudios planteados por Crowther y colaboradores (Crowther y col., 2000).

La **reproducibilidad interdía** se calculó mediante el análisis por triplicado de una alícuota de cada una de las diluciones, preparadas el mismo día del análisis, días alternos durante los diez días en los que se llevaron a cabo las valoraciones ($n=5$).

Para determinar la **reproducibilidad intradía** se analizaron en un mismo día cinco alícuotas de cada dilución, recién preparadas (n=5).

La **precisión**, grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas, puede considerarse representativo de su reproducibilidad. La precisión del método analítico se ha expresado como coeficiente de variación (**C.V.**) de una serie de medidas y la media (\bar{x}) de las concentraciones estimadas, tanto en los ensayos intradía como en los realizados en días distintos (interdía). Esta expresión se observa en la ecuación 7. Los límites establecidos en ensayos con muestras biológicas para la precisión son del 10% (Jenke, 1996^a; Jenke, 1996^b; Karnes y March, 1993).

$$C.V.(\%) = \frac{D.E.}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 7}$$

donde **D.E.** es la desviación estándar correspondiente a la distribución de valores de la concentración de fármaco ensayado y (\bar{x}) es el valor medio de la concentración calculada de fármaco correspondiente a cada nivel de concentración.

La **exactitud** viene dada por el error relativo de la medida (E_r), de acuerdo con la siguiente expresión:

$$E_r(\%) = \frac{\bar{x}_i - x_i}{x_i} \quad \text{Ec. 8}$$

donde x_i es la concentración teórica, y (\bar{x}_i) es la concentración estimada del fármaco patrón. Para ensayos de este tipo el E_r no debe superar el 10% (Jenke, 1996^a; Jenke, 1996^b).

La **especificidad** o selectividad del método analítico se determinó mediante el análisis de 10 blancos, consistentes en la solución salina isotónica [NaCl (150 mM)-HEPES (20 mM), pH 7.4] y 10 soluciones idénticas obtenidas tras estudios transdérmicos sin fármaco, pero sí con sustancias endógenas de la piel extraídas durante los ensayos.

El **límite de detección** (LD) se define como la concentración correspondiente al área de un pico tres veces el ruido detectado al tiempo de retención del patrón y el **límite de cuantificación** (LC) es considerado como la cantidad más pequeña del analito en una

muestra que puede ser cuantificada con exactitud aceptable. Respecto al cálculo de ambos límites (documentos guía Q2A y Q2B respectivamente, editados por la ICH), se recomienda emplear las siguientes ecuaciones:

$$LD = 3.3 \cdot \frac{D.E.}{b} \quad \text{Ec. 9}$$

$$LC = 10 \cdot \frac{D.E.}{b} \quad \text{Ec. 10}$$

donde **D.E.** es la desviación estándar de la respuesta y **b** la pendiente de la curva de calibración (Miller y Miller, 1993).

Los datos requeridos para tales ecuaciones (desviación estándar de la respuesta y pendiente de la curva de calibración) se obtienen mediante el análisis de regresión lineal de las curvas de calibración para la linealidad del sistema analítico.

La **robustez** es una medida de la capacidad de respuesta adecuada del método analítico, ante una implementación no perfecta. Se valoró el área de un patrón de concentración variando: la longitud de onda, pH final de la muestra, velocidad del eluyente y proporción de amonio di-hidrógeno fosfato monobásico con el acetonitrilo.

2.3.3. Estabilidad de ambos fármacos

Se analizó la estabilidad del nadolol e hidrocloreuro de propranolol en solución isotónica de pH 7.4. Para ello, se prepararon 7 grupos de soluciones de nadolol y otros tantos de hidrocloreuro de propranolol de concentraciones 83.5 y 56.4 μM , respectivamente, se conservaron en distintas condiciones: -80°C , -20°C , 4°C , T^{a} ambiente, 37°C y 60°C en la oscuridad, además de un séptimo grupo que se almacenó a T^{a} ambiente con exposición a la luz. Las concentraciones de los fármacos se analizaron los días 1, 3, 6, 10, 15, 30, 60 y 120 tras su preparación, para determinar su concentración residual.

Además, cada día de valoración se prepararon soluciones de referencia que se analizaron inmediatamente.

3. Resultados y discusión

3.1. Validación de los métodos analíticos

Con el fin de iniciar el trabajo de investigación en la absorción transdérmica *in vitro* del nadolol e hidrocloreuro de propranolol a través de la piel de cerdo, detallado en los siguientes capítulos IV y V, fue necesario poner a punto una técnica analítica para cada beta-bloqueante para determinarlos en los diferentes sustratos a analizar.

Tal como se ha comentado en la introducción del presente capítulo, la bibliografía recoge diversos métodos para la determinación de nadolol e hidrocloreuro de propranolol por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV/visible, espectrometría de masas, fluorescencia, colorimetría y detección electroquímica. Sin embargo, los métodos de HPLC descritos han sido validados para una determinación simultánea de beta-bloqueantes (Delamoye y col., 2004; Patel y col., 1981; Ranta y col., 2002), como el atenolol, sotalol, caretolol, pindolol, metoprolol, propranolol y nadolol entre otros, o el propranolol aislado (Salman y col., 2010) en plasma. Sin embargo, dichos métodos utilizan fases móviles que consisten en disoluciones combinadas de metanol o acetonitrilo con una solución tamponada de pH comprendido entre 3.4-3.8 de ácido trifluoroacético, HCl, NaCl o una mezcla de ácido acético con trietilamina. Asimismo, muchos de ellos requieren una infraestructura no disponible en los laboratorios pequeños y una preparación compleja no necesaria en las muestras de experimentos transdérmicos. Además, presentan tiempos de retención de aproximadamente 10 minutos para el nadolol y 22 minutos para el propranolol, tiempos muy elevados con la consecuente pérdida de tiempo, coste de material fungible y fases móviles además de desgaste del sistema. Por estos motivos, se validaron dos métodos analíticos que nos permitieran detectar y cuantificar ambos fármacos en muestras provenientes de ensayos de difusión *in vitro*. Los métodos utilizados con este fin deben ser específicos, ya que las muestras que proceden de los ensayos de permeación contienen normalmente compuestos endógenos de la piel que se liberan a la fase receptora durante los mismos, además la concentración de analito suele ser baja por lo que deben tener sensibilidad suficiente para poder cuantificarlos.

La validación de ambos métodos analíticos parten del mismo fundamento, la misma finalidad que es asegurar que tanto los métodos analíticos como el sistema analítico asociado a la determinación cuantitativa de ambos beta-bloqueantes produzcan resultados

fiables y por tanto las dos validaciones se realizaron de la misma manera por lo que será explicado conjuntamente.

3.1.1. Nadolol

La longitud de onda seleccionada para cuantificar el fármaco es 269 nm ya que, aunque el espectro de absorción del nadolol presenta dos máximos de absorción a 220.1 y 269.8 nm (figura 13), a 220.1 nm aparecerían interferencias debidas a compuestos de la piel. A 269 nm de longitud de onda, la sensibilidad y la especificidad ofrecidas por el método fueron suficientes para cuantificar el nadolol en el rango de concentraciones de las muestras obtenidas en los ensayos de difusión *in vitro*.

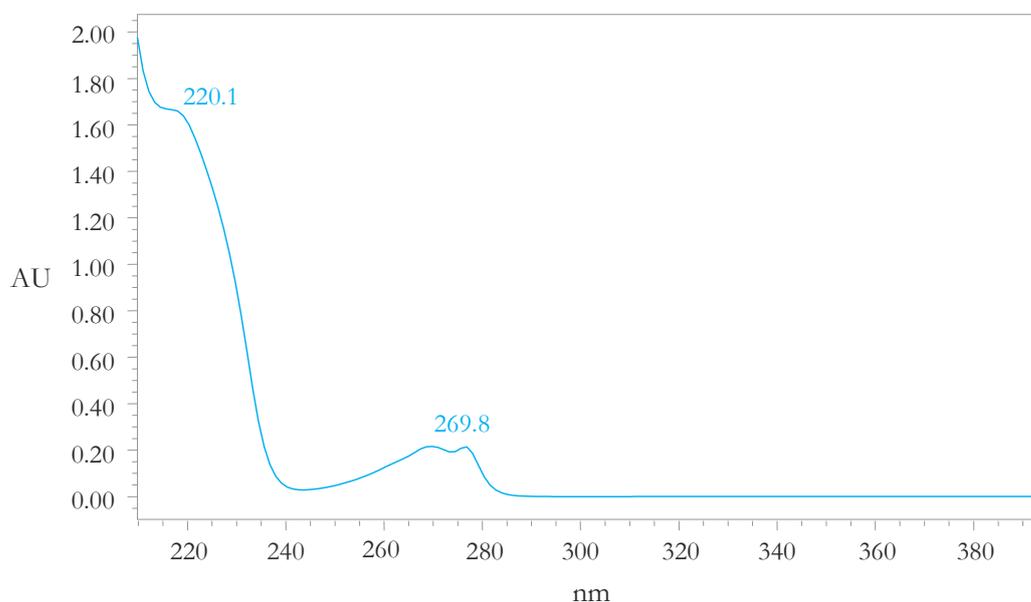


Figura 13. Espectro de absorción del nadolol (concentración patrón 167 μM).

Las condiciones cromatográficas utilizadas permitieron una buena separación del nadolol del resto de componentes de nuestras muestras. La figura 14 muestra un cromatograma ejemplo, correspondiente a un patrón de nadolol (16.7 μM) usado en la validación del método analítico (a) y una muestra de nadolol obtenida en un ensayo de difusión transdérmica (b). El tiempo de retención es 3.45 ± 0.05 minutos (Media \pm D.E.; n=20).

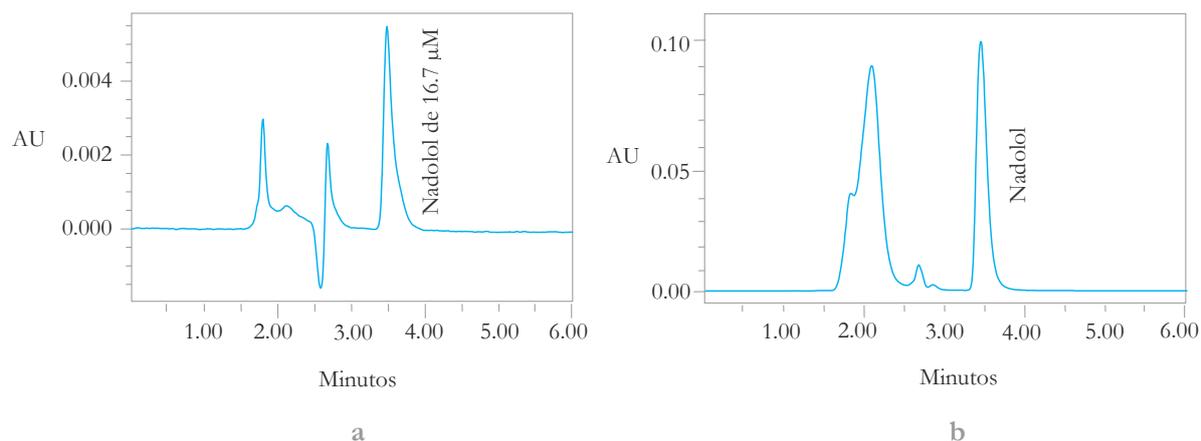


Figura 14. Cromatogramas del nadolol: (a) patrón de concentración 16.7 μM y (b) una muestra obtenida en un ensayo de absorción transdérmica.

Para determinar la reproducibilidad del método se realizaron determinaciones tanto en diferentes días (interdía) como el mismo día (intradía). Con este fin, en cada uno de los diez días correspondientes al análisis interdía, se determinó por triplicado el fármaco contenido en alícuotas de cada una de las diluciones a estudiar. Asimismo, se realizaron cinco análisis en un mismo día de cada dilución recién preparada del intervalo de concentraciones para determinar la reproducibilidad intradía. La tabla 16 muestra el intervalo de concentraciones medias obtenidas en los ensayos a partir de los análisis de cada concentración realizados en cada uno de los días (interdía) o el mismo día (intradía) respecto a la concentración teórica de nadolol presente en la solución analizada.

Concentración experimental de nadolol (μM)		
Teórica	Interdía (n=5) Media \pm D.E.	Intradía (n=5) Media \pm D.E.
0.17	0.18 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01
0.84	0.85 \pm 0.03	0.84 \pm 0.03
1.67	1.69 \pm 0.06	1.69 \pm 0.03
16.7	16.6 \pm 1.01	16.0 \pm 0.07
83.5	83.9 \pm 1.00	83.7 \pm 0.23
167	167 \pm 0.43	167 \pm 0.32

Tabla 16. Concentración teórica y las medias determinadas en los análisis por quintuplicado de los patrones de nadolol realizados en distintos días y el mismo día.

A partir de estos resultados, se calcularon para el mismo día y diferentes días, la exactitud y la precisión (véase la tabla 17). La exactitud se detalla como el error relativo (E_r) calculado a partir de las concentraciones experimentales obtenidas por el método analítico y la precisión es calculada a partir del coeficiente de variación (C.V.) de cada concentración analizada.

Exactitud y precisión del método validado del nadolol				
Concentración real (μM)	Interdía (n=5)		Intradía (n=5)	
	E_r (máx.) (%)	C.V. (%)	E_r (máx.) (%)	C.V. (%)
0.17	5.19	3.43	2.99	3.02
0.84	2.24	3.69	1.10	3.26
1.67	1.00	3.57	1.20	1.57
16.7	-0.56	6.08	-4.46	0.46
83.5	0.48	1.20	0.21	0.28
167	-0.11	0.26	-0.01	0.19

Tabla 17. Exactitud expresada como error relativo máximo de la medida (%) y precisión como coeficiente de variación (C.V.) para cada una de las concentraciones del intervalo validado, tanto en los ensayos interdía como intradía.

Como se observa en la anterior tabla, tanto en los ensayos interdía como en los intradía, el error relativo máximo (E_r (máx.)) de la concentración más baja (0.17 μM) presenta el valor más elevado. Sin embargo no ocurre lo mismo al valorar la precisión, el valor más cercano al límite se obtuvo para la concentración teórica de 16.7 μM en los ensayos interdía con un valor de 6.08%. Ambos parámetros se encuentran, en todo el intervalo de concentraciones estudiado, dentro de los límites establecidos en la bibliografía (Jenke, 1996^a; Jenke, 1996^b).

El estudio de la linealidad del método analítico permite demostrar la proporcionalidad entre la variable área y la variable concentración. Con los datos obtenidos con las rectas de calibrado, se construyó una recta global. Ésta fue lineal en todo el rango de concentraciones analizado [$y = 3026 (\pm 4) x + 217 (\pm 171)$]. Se demostró una relación significativa entre las áreas de los cromatogramas y las concentraciones del fármaco patrón pues se cumple con los requerimientos de un coeficiente de correlación lineal (r) mayor o igual a 0.98. Asimismo, se comprobó que el valor de la pendiente de la recta era

significativamente distinta de cero ($p < 0.05$), cercana a la unidad, y que la ordenada en el origen no era estadísticamente diferente de cero ($p > 0.05$) (ICH, 1994; ICH, 1996).

La especificidad, capacidad de evaluar de forma inequívoca al fármaco en presencia de los componentes cuya presencia cabría esperar, tales como impurezas, productos de degradación y compuestos endógenos propios de la piel, se determinó mediante el análisis de 20 soluciones salinas isotónicas, 10 de las cuales fueron obtenidas tras el paso de éstas por piel al realizar ensayos transdérmicos sin fármaco. Se pudo observar que no se observaban interferencias en los cromatogramas en el tiempo de retención correspondiente del nadolol.

Los límites de detección y cuantificación establecidos para el presente método analítico son 0.058 y 0.171 μM , respectivamente. Éstos fueron obtenidos por las ecuaciones (9 y 10) recomendadas en las guías Q2A y Q2B editados por la ICH y ampliamente reconocidas (ICH, 1994; ICH, 1996; Miller y Miller, 1993).

No obstante, se hace mención en el presente trabajo que ambos límites también se determinaron mediante otros métodos empleados en el laboratorio. Para la determinación del límite de detección se empleó un método instrumental de comparación "blanco" con "blanco enriquecido" a una sola concentración y respecto al límite de cuantificación, éste se obtuvo por un método de comparación señal/ruido donde se prepararon muestras de concentraciones conocidas a bajos niveles y un blanco y así se midieron las señales de las soluciones preparadas.

Los valores de ambos límites conseguidos de ambas maneras no mostraron diferencias estadísticas entre sí ($p > 0.05$, t de Student) aunque sí obtuvieron valores superiores los obtenidos mediante las ecuaciones.

Asimismo se estudió la robustez del método que es la capacidad del procedimiento analítico de permanecer inalterado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método. Con este fin se valoraron muestras de concentración fija (16.7 μM), tras haber variado la longitud de onda del detector, la composición de la fase móvil así como el pH final de la muestra y velocidad del eluyente. La tabla 18 muestra la robustez del método para la determinación del nadolol.

Los tiempos de retención (cuando se variaron pH, composición y flujo de la fase móvil) y las áreas de los picos de nadolol (cuando se modificó la longitud de onda), no mostraron diferencias significativas (test ANOVA, $p > 0.05$) respecto a la situación inicial.

Robustez del método analítico del nadolol					
Condición		Modificación	Unidades de área ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) (Media \pm D.E.)	C.V. (%)	Tiempo retención (min) (Media \pm D.E.)
Longitud de onda (nm)		268	50895 \pm 668	1.31	3.45 \pm 0.06
		269	50291 \pm 4251	4.48	3.45 \pm 0.05
		271	50078 \pm 6762	3.51	3.45 \pm 0.05
pH		4.6	51784 \pm 8977	5.75	3.47 \pm 0.08
		4.8	50134 \pm 3121	6.23	3.45 \pm 0.04
		5.0	50892 \pm 767	1.51	3.46 \pm 0.06
Fase móvil	Composición (v/v)	82:18	50234 \pm 1895	3.77	3.49 \pm 0.06
		80:20	50126 \pm 2579	5.15	3.45 \pm 0.01
		78:22	50456 \pm 1786	3.34	3.42 \pm 0.04
Flujo (mL/min)		0.9	50127 \pm 668	1.33	3.51 \pm 0.07
		1.0	50211 \pm 3172	6.32	3.45 \pm 0.04
		1.1	49527 \pm 1782	3.59	3.44 \pm 0.01

Tabla 18. Robustez del método analítico validado. Modificaciones en la longitud de onda (nm) y ciertos parámetros de la fase móvil. Datos de las unidades de área (Media \pm D.E.), coeficientes de variación (C.V.) y tiempo de retención del analito de cada una de las modificaciones. Concentración patrón 16.7 μM ($n=3$).

Todos los resultados expuestos sobre la validación del método analítico para la detección y cuantificación del beta-bloqueante nadolol, demuestran que el método es preciso, exacto y sensible y por tanto útil para cuantificar el nadolol en las muestras provenientes del estudio de absorción transdérmica *in vitro*, que se describe en los siguientes capítulos IV y V.

3.1.2. Hidrocloruro de propranolol

La figura 15 muestra el espectro de absorción del hidrocloruro de propranolol. En ésta se observa que el espectro tiene dos máximos, 214.5 y 292.2 nm. Para el primero la absorbancia de la molécula es mayor, aún así, la longitud de onda seleccionada para detectar

el fármaco fue 291 nm porque así se evitan posibles interferencias que pueden surgir en los ensayos de permeación por la presencia de compuestos endógenos de la piel.

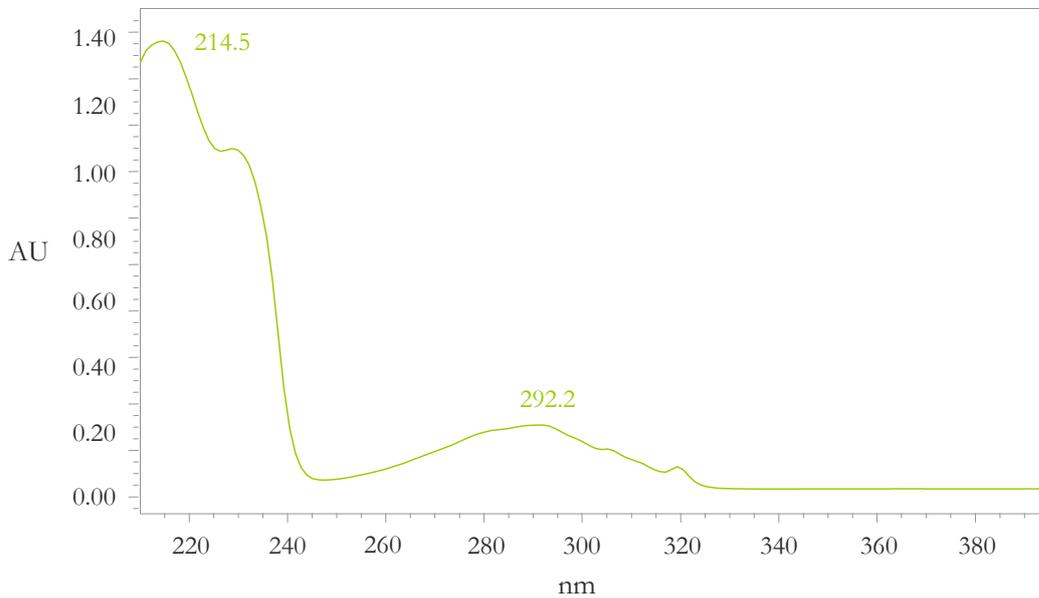


Figura 15. Espectro de absorción del hidrocloreuro de propranolol (patrón 113 μM).

Se obtuvo una correcta separación del beta-bloqueante del resto de componentes de las muestras. La figura 16 muestra un cromatograma de un patrón usado en la validación de concentración 11.3 μM (a) y en él se observa que el tiempo de retención del analito es 3.35 ± 0.10 minutos (media \pm D.E.; $n=20$) y, un cromatograma obtenido tras un ensayo de absorción transdérmica (b).

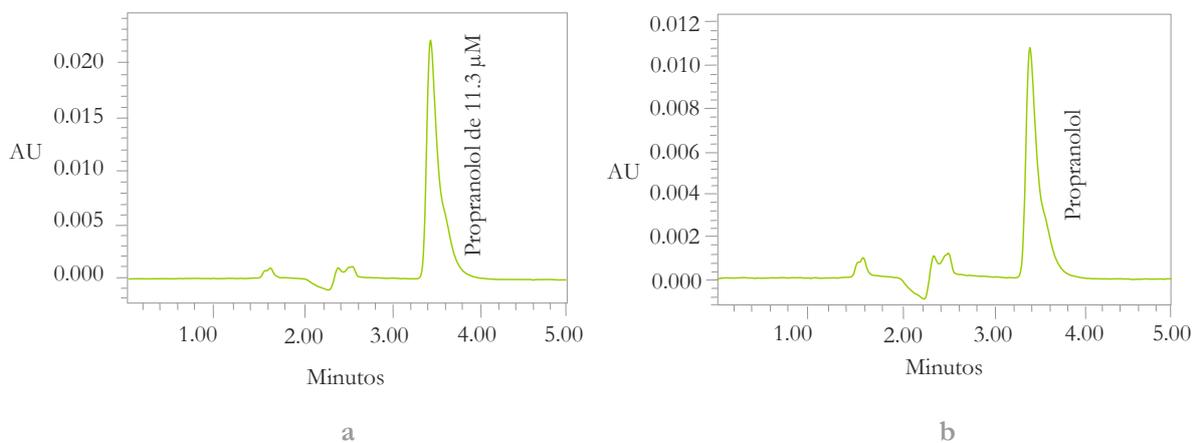


Figura 16. Cromatogramas del hidrocloreuro de propranolol: (a) patrón de concentración 11.3 μM y (b) una muestra obtenida en un ensayo de absorción transdérmica.

La determinación de la reproducibilidad tanto interdía como intradía se realizó del mismo modo que la validación del método analítico, descrito con anterioridad, para determinar el nadolol. Se construyeron diferentes rectas de calibrado en distintos días ($n=5$) del fármaco contenido en alícuotas de cada una de las diluciones a estudiar, así como el examen en un mismo día de cada dilución recién preparada del intervalo de concentraciones para obtener la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo, por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo. Posteriormente a la obtención de las concentraciones experimentales en el intervalo teórico estudiado (tabla 19), se analizaron tanto en diferentes días como el mismo día, la exactitud y la precisión del método analítico para la determinación del segundo beta-bloqueante estudiado, el hidrocloreuro de propranolol (véase la tabla 20). La exactitud se detalla como el error relativo máximo ($E_r(\text{máx.})$) calculado a partir de las concentraciones experimentales obtenidas y la precisión es calculada a partir del coeficiente de variación (C.V.) de cada concentración analizada.

Concentración experimental de hidrocloreuro de propranolol (μM)		
Teórica	Interdía ($n=5$) Media \pm D.E.	Intradía ($n=5$) Media \pm D.E.
0.11	0.11 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01
1.13	1.16 \pm 0.08	1.17 \pm 0.03
5.64	5.43 \pm 0.11	5.42 \pm 0.07
11.3	11.0 \pm 0.19	11.2 \pm 0.28
56.4	56.4 \pm 0.64	56.3 \pm 0.72
113	113 \pm 0.31	113 \pm 0.34

Tabla 19. Concentración teórica y las medias determinadas en los análisis por quintuplicado de los patrones de hidrocloreuro de propranolol realizados en distintos días y el mismo día.

La tabla 20 muestra que las concentraciones más pequeñas del intervalo valorado (0.11 y 1.13 μM), tanto en los ensayos interdía como intradía, presentan un error relativo y coeficiente de variación más elevados, siendo 3.57% el $E_r(\text{máx.})$ y 7.28% el C.V. No obstante, los porcentajes se encuentran, en todo el intervalo de concentraciones estudiado, dentro de los límites establecidos de acuerdo con la bibliografía (Jenke, 1996^a; Jenke, 1996^b).

Exactitud y precisión del método del hidrocloreuro de propranolol validado				
Concentración real (μM)	Interdía (n=5)		Intradía (n=5)	
	E_r (máx.) (%)	C.V. (%)	E_r (máx.) (%)	C.V. (%)
0.11	-1.90	6.44	-4.21	5.71
1.13	2.77	7.28	3.57	2.84
5.64	-1.31	2.03	-1.54	1.27
11.3	-2.10	1.69	-0.42	2.50
56.4	0.03	1.13	0.25	1.27
113	0.03	0.28	0.07	0.30

Tabla 20. Exactitud expresada como error relativo de la media (%) y precisión como coeficiente de variación (C.V.) para cada una de las concentraciones del intervalo validado, tanto en los ensayos interdía como intradía.

Con los datos obtenidos con las rectas de calibrado se construyó una recta global. La relación entre la concentración de fármaco y la respuesta en esta recta fue lineal en todo el rango de concentraciones validado [$y = 18353 (\pm 21) x - 2158 (\pm 2009)$]. 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 hidrocloreuro de propranolol en cada muestra-patrón viene expresada por el coeficiente de correlación. En todos los casos se demostró una relación lineal significativa entre las áreas de los cromatogramas y las concentraciones del fármaco patrón ya que se cumplen los requerimientos propuestos por la ICH donde el coeficiente de correlación lineal (r) debe ser mayor o igual a 0.98, no significativamente diferente de 1 (prueba t de Student, $p > 0.05$). Asimismo, utilizando la misma prueba estadística se comprobó que el valor de la pendiente de la recta era significativamente distinta de cero ($p < 0.05$), cercana a la unidad, y que la ordenada al origen no era estadísticamente diferente de cero ($p > 0.05$) (ICH, 1994; ICH, 1996).

La especificidad del método analítico se determinó de manera similar al método del nadolol. Se comprobó que no se observaban interferencias en los cromatogramas en el tiempo de retención correspondiente del hidrocloreuro de propranolol.

Los límites de detección y cuantificación determinados para el presente método analítico son 0.038 y 0.115 μM , respectivamente.

Por último, se evidenció la robustez que tiene este método analítico al modificar ciertas variables como la fase móvil o la longitud de onda entre otras (véase la tabla 21). Las variaciones fueron estudiadas estadísticamente mediante un test de varianza de una vía. Los tiempos de retención más heterogéneos se obtuvieron al modificar la composición de la fase móvil, obteniendo retenciones un poco más elevadas cuando se estudiaba fases con acetonitrilo en menor proporción (62:38) (menos de 5 segundos). Sin embargo, los tiempos de retención y las áreas de los picos en sus cromatogramas, no mostraron diferencias significativas (test ANOVA, $p > 0.05$).

Robustez del método analítico del hidrocloreuro de propranolol					
Condición	Modificación	Unidades de área ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$) (Media \pm D.E.)	C.V. (%)	Tiempo retención (min) (Media \pm D.E.)	
Longitud de onda (nm)	289	203782 \pm 8668	4.34	3.25 \pm 0.06	
	291	205002 \pm 3251	1.61	3.25 \pm 0.13	
	293	204996 \pm 11672	5.78	3.26 \pm 0.02	
Fase móvil	pH	4.6	205445 \pm 2977	1.48	3.24 \pm 0.03
		4.8	205228 \pm 3783	1.87	3.25 \pm 0.04
		5.0	205892 \pm 11829	5.80	3.25 \pm 0.04
	Composición (v/v)	62:38	205728 \pm 7281	3.61	3.29 \pm 0.03
		60:40	204778 \pm 8673	4.28	3.25 \pm 0.03
		58:42	204672 \pm 11832	5.89	3.24 \pm 0.02
Flujo (mL/min)	0.9	206738 \pm 7231	3.58	3.27 \pm 0.02	
	1.0	205674 \pm 5630	2.78	3.25 \pm 0.06	
	1.1	205893 \pm 8392	4.16	3.24 \pm 0.01	

Tabla 21. Robustez del método analítico validado. Modificaciones en la longitud de onda (nm) y ciertos parámetros de la fase móvil. Datos de las unidades de área (Media \pm D.E.), coeficientes de variación (C.V.) y tiempo de retención del analito de cada una de las modificaciones. Concentración patrón 11.3 μM ($n=3$).

Los resultados obtenidos apoyan la adecuación del método analítico. La aplicabilidad del método validado ha sido demostrada mediante el estudio *in vitro* de absorción a través de la piel tal y como se describe a continuación en los siguientes capítulos.

3.2. Estudio de estabilidad

Los estudios de estabilidad para los productos farmacéuticos son una parte fundamental de todo el proceso de investigación y desarrollo que debe hacerse previamente, con el fin de determinar si el producto mantiene sus especificaciones de calidad aceptadas en la monografía del principio activo.

La estabilidad de ambos fármacos en la solución isotónica de pH 7.4 se estudió utilizando 7 grupos, para cada uno, almacenados en distintas condiciones (-80°C, -20°C, 4°C, T^a ambiente, 37°C y 60°C en oscuridad y un séptimo grupo expuesto a la luz a T^a ambiente) en dos concentraciones, 83.5 y 56.4 µM, según fuera nadolol o hidrocloruro de propranolol, respectivamente.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 17 (nadolol) y 18 (hidrocloruro de propranolol).

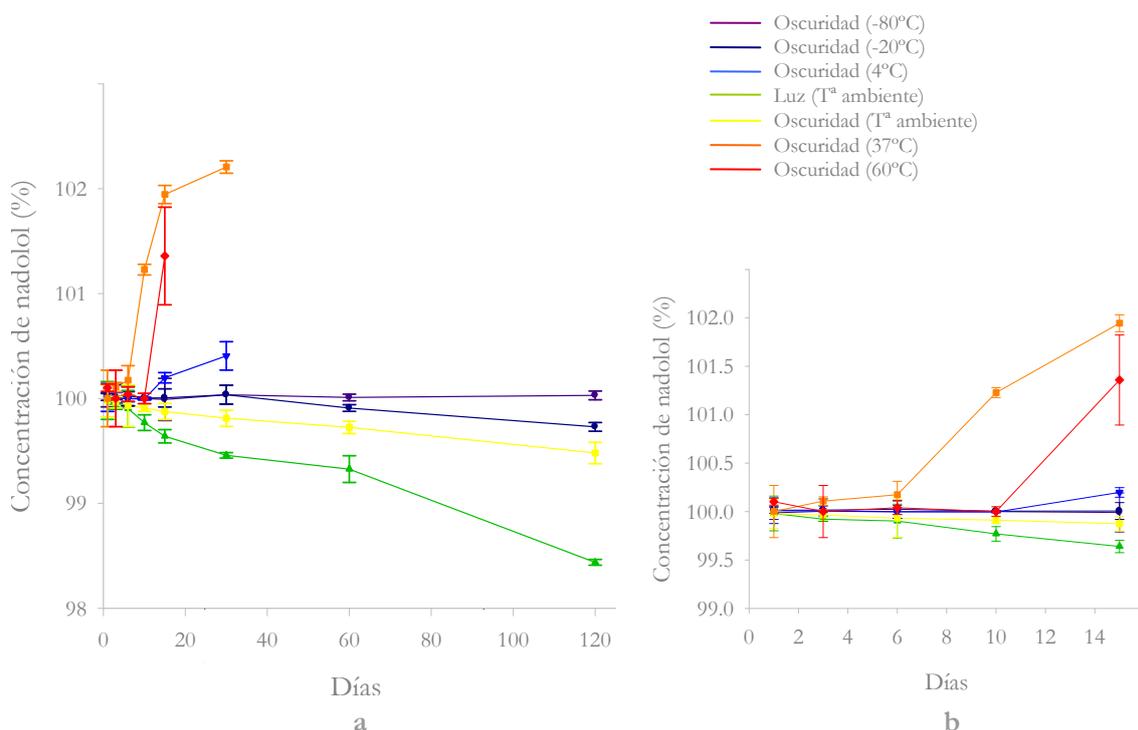


Figura 17. (a) Gráfica de datos de estabilidad del nadolol en solución isotónica tamponada a pH 7.4 en las distintas condiciones de conservación (n=3) durante los 120 días de estudio y (b) ampliación de la gráfica, estabilidad de los primeros 15 días. Las concentraciones se han expresado como porcentaje de concentración de fármaco respecto a la disolución inicial y con sus desviaciones estándar.

La solución almacenada a temperatura ambiente y expuesta a la luz presenta mayor degradación desde los primeros instantes que el resto de soluciones. No obstante, esta disminución de concentración durante los 15 primeros días no es significativa. Por otra parte, los grupos de soluciones almacenados a mayores temperaturas (37°C y 60°C) sufren un incremento que puede atribuirse a la evaporación del disolvente y por tanto un aumento de la concentración del fármaco. Por ello se puede considerar que no existe una degradación del fármaco.

Este hecho es importante debido a que estas condiciones son necesarias para desarrollar, en el futuro, sistemas terapéuticos de absorción transdérmica con objeto de conseguir un rápido secado de los mismos. Por otra parte, los grupos almacenados a -20°C y -80°C fueron los que mejor se conservaron en el tiempo, ya que no aparece degradación alguna hasta aproximadamente los 60 días de estudio.

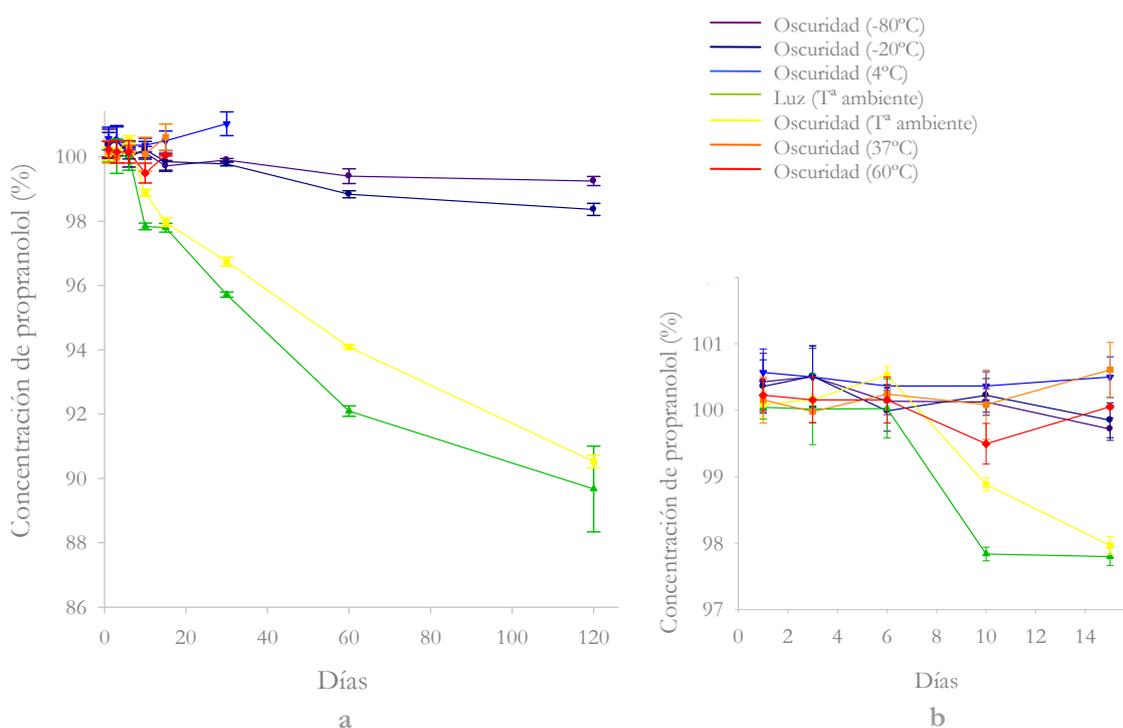


Figura 18. (a) Gráfica de datos de estabilidad durante los 120 días de estudio del hidrocloreto del propranolol en solución isotónica tamponada a pH 7.4 en las distintas condiciones de conservación (n=3) y (b) ampliación de la gráfica, estabilidad de los primeros 15 días. Las concentraciones se han expresado como porcentaje de concentración de fármaco respecto a la disolución inicial y con sus desviaciones estándar.

El hidrocloreto de propranolol sufre una mayor degradación a temperatura ambiente que el nadolol y el descenso de concentración es más notorio. Todos los grupos

almacenados se conservan de forma similar durante los primeros 15 días y tras este período se observa claramente que los grupos que mejor se conservan son los expuestos a menor temperatura, permaneciendo en concentraciones por encima de 98% de la inicial hasta los 120 días del estudio.

Los resultados de estabilidad en ambos beta-bloqueantes muestran una mínima degradación. Sin embargo, las muestras deben ser analizadas preferiblemente tras la toma de muestra para evitar cualquier alteración. Si esto no es posible, deben conservarse en congelador preferiblemente a -80°C . Las muestras pueden guardarse hasta 120 días sin riesgo de degradación del compuesto en solución.

Capítulo IV

**Estudio de la absorción transdérmica
in vitro del nadolol e hidrocloreuro de propranolol**

1. Introducción

La administración transdérmica de fármacos ha demostrado, en las últimas décadas, ser una alternativa válida frente a otras vías de administración, como la oral o la parenteral. Sin embargo, la piel humana es una barrera protectora eficiente que dificulta el paso a su través de fármacos, proteínas y xenobióticos ajenos al organismo (Godin y Touitou, 2007; Hadgraft y Lane, 2011), ya que pocos poseen las características físico-químicas necesarias para atravesar el estrato córneo en cantidad y velocidad suficientes como para alcanzar concentraciones terapéuticas en sangre.

El uso de **promotores químicos** es una de las estrategias más ampliamente utilizadas para incrementar el número de fármacos capaces de ser administrados por vía transdérmica de manera efectiva (Chattaraj y Walker, 1995; Hadgraft y Walters, 1992; Williams, 2003). Hasta la actualidad, se ha ensayado un número elevado de compuestos químicos como promotores de absorción transdérmica, aunque su inclusión en formulaciones está limitada ya que el mecanismo de acción y la toxicidad a largo plazo de la mayoría de agentes químicos no han sido claramente definidos.

La difusión a través de la piel está controlada por su capa más superficial, el estrato córneo. La aplicación de estos promotores químicos sobre la piel puede modificar algunas de las propiedades del estrato córneo. De este modo, un promotor químico podría incrementar el coeficiente de difusión del fármaco en la piel (desorganizando, por ejemplo, los lípidos intercelulares del estrato córneo), o podría aumentar el reparto del fármaco entre la formulación que lo contiene y el estrato córneo (alterando la naturaleza solvente de los lípidos de membrana de la piel para mejorar el reparto en el tejido) (Barry, 1987). Pese a sus mecanismos de acción, ninguno de los compuestos químicos ensayados como promotores químicos de la absorción transdérmica, tanto en piel humana como en animal, ha resultado ser el ideal (Williams, 2003).

Por otra parte, la **iontoforesis** consiste en la aplicación de una corriente eléctrica de muy baja densidad ($<0.5 \text{ mA/cm}^2$) que permite incrementar el transporte de fármacos a través de la piel (Alexander y col., 2012; Guy y col., 2000; Kalia y col., 2004).

Los mecanismos mediante los cuales la iontoforesis aumenta el transporte de fármacos a través de la piel son: (a) electrorrepulsión, que implica que iones cargados son repelidos por un electrodo con su misma carga (Green y col., 1991^a; Guy y col., 2000; Guy y col., 2001; Leboulanger y col., 2004; Merino y col., 1999; Turner y Guy, 1997); (b) electroósmosis, que consiste en un flujo de solvente que ocurre a través de la piel cargada en respuesta al paso preferente de un determinado tipo de iones cuando se aplica un campo eléctrico (Kim y col., 1993^b; Leboulanger y col., 2004; Merino y col., 1999; Pikal, 2001; Turner y Guy, 1997); y (c) aumento de la permeabilidad de la piel inducido por el paso de una corriente eléctrica. Asimismo, el transporte transdérmico inducido es directamente dependiente de la densidad de corriente aplicada (Delgado-Charro y col., 1995^b; Femenía-Font y col., 2005^a; Phipps y Gyory, 1992).

En condiciones fisiológicas, la piel humana posee una carga neta negativa y muestra una mayor afinidad por los cationes, por lo que el flujo electroosmótico ocurre desde el ánodo (+) hacia el cátodo (-) (Burnette y Ongpipatanakul, 1987; Kim y col., 1993^b; Pikal, 1990; Pikal y Shah, 1990^a; Pikal y Shah, 1990^b). Este fenómeno ha sido utilizado para aumentar el transporte de moléculas polares sin carga eléctrica (Delgado-Charro y Guy, 1995^a; Guy y col., 2001; Kim y col., 1993^b; Lopez y col., 2003^b). Por otra parte, la contribución de la electroósmosis adquiere mayor relevancia en el transporte de cationes respecto a la electrorrepulsión a medida que aumenta la masa molecular (Green y col., 1991^b; Turner y Guy, 1997). Estas moléculas grandes tienen un número de transporte bajo

debido a la competición que se da con iones más pequeños y móviles que forman parte normalmente de la composición electrolítica de la solución dadora o de la fase receptora. De hecho, los electrolitos presentes en la fase dadora afectan en gran medida la eficacia de la iontoforesis (Phipps y Gyory, 1992).

Debido a las ventajas ofrecidas por la administración transdérmica y al amplio uso de los beta-bloqueantes, varios autores han estudiado previamente la penetración percutánea de estos fármacos de manera conjunta como se muestra en diferentes trabajos (Aqil y col., 2006; Modamio y col., 2000). Respecto a los estudios transdérmicos de los fármacos objeto de estudio, la mayoría se limitan al estudio del transporte pasivo del propranolol junto con el uso de algún promotor químico a través de membranas artificiales (Green y col., 1989; Iordanskii y col., 2000; Maitani y col., 1993), piel de conejo (Ogiso y Shintani, 1990), piel de rata y ratón sin pelo (Ahad y col., 2011; Corbo y col., 1990; Cui y col., 2011; Hori y col., 1992; Kunta y col., 1997), piel porcina (Zhao y Singh, 1999) y piel humana (Ahad y col., 2011; Krishna y Pandit, 1996). Asimismo, también existen estudios iontoforéticos con el propranolol con modelos de membrana de diferente naturaleza como por ejemplo piel de ratón sin pelo (Conjeevaram y col., 2003; Hirvonen y Guy, 1997), y piel de cerdo, conejo y humana (Abla y col., 2005; Jaskari y col., 2000; Marro y col., 2001^a). No obstante, son pocos los estudios de absorción transdérmica del nadolol. Jaskari y sus colaboradores utilizaron ambos beta-bloqueantes para investigar el uso de un vehículo facilitador de absorción transdérmica de fármacos consistente en fibras con cationes e intercambio de aniones. En este estudio, la velocidad de liberación del propranolol, lipófilo, fue significativamente más lenta que la de nadolol, más hidrófilo (Jaskari y col., 2000). Posteriormente, fueron fármacos modelo junto a la hormona luteinizante y la nafarelina para determinar el proceso de absorción de fármacos mediante la medición de cambios en el potencial de transmisión o flujo, fenómeno electrocinético (aplicación de una corriente eléctrica de baja intensidad) que refleja tanto la densidad de carga del soluto como corriente y el tamaño de poro que se produce en la membrana estudio. La adsorción de solutos cargados en las paredes de los poros se detectaba como un cambio de potencial de flujo (Raiman y col., 2003).

En el presente capítulo se describen los ensayos llevados a cabo con el fin de estudiar si beta-bloqueantes como el nadolol o propranolol podrían ser administrados por vía transdérmica. En este sentido, se han realizado experimentos de difusión *in vitro* para caracterizar la difusión de los fármacos e investigar el efecto de la aplicación de distintos

compuestos químicos y el método físico iontoforesis, con el fin de encontrar posibles estrategias candidatas de promoción del paso a través de la piel para ser incluidos en un sistema de administración transdérmica de estos beta-bloqueantes.

Para ello, se seleccionaron compuestos descritos previamente por otros autores como promotores químicos de la absorción: etanol (Berner y col., 1989; Manabe y col., 1996), Azone® (Afouna y col., 2003; Hadgraft y col., 1985; López-Cervantes y col., 2006; Svozil y col., 2007), un terpeno [R-(+)-limoneno] (Femenía-Font y col., 2005^b; Moghimi y col., 1998; Williams y Barry, 1991) y dos ácidos grasos (ácido oleico y ácido caproleico) (Andega y col., 2001; Klimentová y col., 2006); que se escogieron tratando de cubrir distintos grupos de compuestos químicos que habían demostrado ser capaces de incrementar la absorción transdérmica. Además, dado que los beta-bloqueantes objeto de estudio presentan masas moleculares bajas; 309.4 g/mol (nadolol) y 295.8 g/mol (hidrocloruro de propranolol) y están cargados positivamente al pH de trabajo, se consideran buenos candidatos para ser administrados vía transdérmica mediante la ayuda de la iontoforesis (Delgado-Charro y col., 1995^b; Lopez y col., 2003^b; Phipps y Gyory, 1992). Por ello también se estudió el transporte transdérmico mediante este método físico y el efecto de la densidad de corriente sobre dicho transporte.

2. Materiales y métodos

2.1. Fármacos ensayados

El nadolol y el hidrocloruro de propranolol (Monografías de la Farmacopea Europea 1789 y 0568) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Química, S.A. (Tres Cantos, Madrid, España) con purezas del 98.0% y 98.9% (m/m), respectivamente. Éstos presentan propiedades físico-químicas diversas que se muestran en la tabla 13 (Capítulo III).

2.2. Preparación de la piel

Por sus características, muy similares a las de la piel humana, en los experimentos de absorción transdérmica de ambos beta-bloqueantes, se ha utilizado como membrana la piel de oreja de cerdo (Marro y col., 2001^a; Meyer y col., 1978^a; Schmook y col., 2001; Sekkat y col., 2004). Las orejas de cerdo empleadas fueron generosamente suministradas

por la Facultad de Medicina de la Universitat de València (Valencia, España). 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 muy poco vello.

Tras el sacrificio del animal se cortaron las orejas por su base. Seguidamente se separó a mano la piel de la cara exterior de la oreja del cartílago mediante un bisturí quirúrgico ayudado de unas pinzas quirúrgicas (figura 19), teniendo especial cuidado en mantener la integridad de la piel.

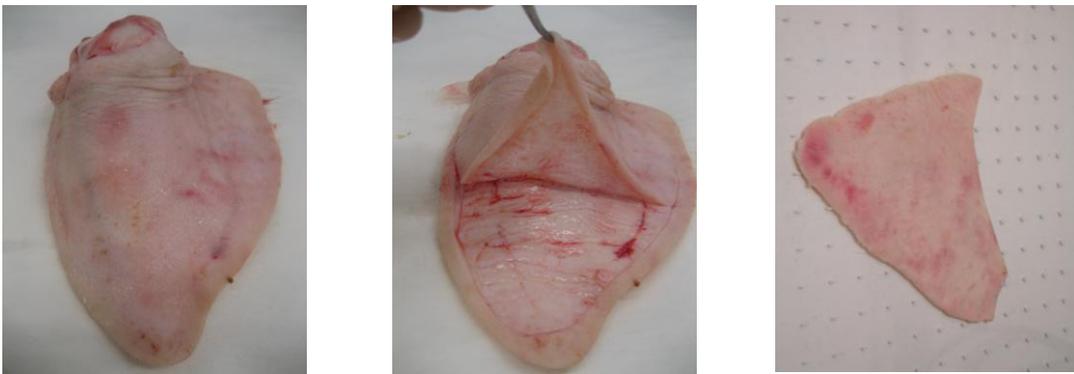


Figura 19. Fotografías ilustrativas del procesado de la oreja de cerdo para la obtención de la piel: oreja de cerdo tras el sacrificio del animal (izquierda), separación de la piel del cartílago mediante bisturí quirúrgico (centro) y piel completa una vez separada de la oreja (derecha).

A continuación, con ayuda de un dermatomo eléctrico, modelo Aesculap-Wagner C. GA 176 suministrado por B. Braun Surgical S.A., Barcelona (España) (véase figura 20a), 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 y se procedió al corte de la piel mediante deslizamiento horizontal paralelo a la superficie de la piel, tal como ilustra la figura 20b. El resultado de este proceso son porciones de piel de espesor constante (600 μm). Estas porciones se envasaron inmediatamente en sobres de papel de aluminio y fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.



Figura 20. (a) Dermatómetro eléctrico Aesculap-Wagner C. GA 176 utilizado en el proceso de corte de la piel de oreja de cerdo. (b) Corte de piel de oreja de cerdo a 600 μm de espesor.

2.3. Células de difusión

Los ensayos de difusión fueron realizados empleando para ello células de difusión (DISA, Milán, Italia) útiles tanto en los estudios con promotores químicos como con iontoforesis. Éstas son una variante del modelo de célula de Franz vertical en la que la membrana de estudio, la piel, se dispone horizontalmente. El área útil de difusión de cada una de las células es de $0.567 \pm 0.008 \text{ cm}^2$ y su compartimento receptor tiene una capacidad aproximada de 4.2 mL (figura 21).

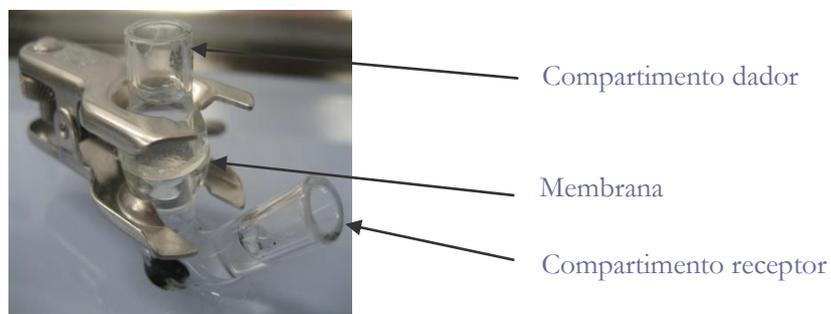


Figura 21. Célula de Franz modificada de tipo vertical.

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.

Ambos compartimentos, dador y receptor, son cilíndricos. El receptor posee una tubuladura en el lado que permite la toma de muestras y la reposición del volumen muestreado con fase receptora. En los experimentos de difusión pasiva, tras el muestreo y reposición, el compartimento receptor permanece cerrado con una película autosellante,

moldeable y flexible llamado Parafilm® M (Fisher Scientific, Madrid, España) para evitar pérdidas. El compartimento dador, al igual que el receptor, también es sellado con Parafilm® M para evitar pérdidas por evaporación. Cuando el ensayo de absorción se realiza aplicando iontoforesis, el sellado de dichas aperturas es más complicado por la presencia del electrodo y el puente salino. Los 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, en contacto con el compartimento dador. Los dos compartimentos se fijan con una pinza de acero de dimensiones adecuadas.

2.4. Soluciones empleadas en el estudio

La composición de las soluciones empleadas para llenar el compartimento dador (donde estará disuelto el fármaco en estudio) y el compartimento receptor de las células de difusión, se detalla a continuación:

Composición de las fases		
	Fase dadora NaCl:HEPES (25:20 mM)	Fase receptora NaCl:HEPES (150:20 mM)
Cloruro sódico (NaCl)	1.461 g	8.766 g
HEPES	4.766 g	4.766 g
Agua ultrapura c.s.p.	1000 mL	1000 mL

Tabla 22. Composición de las fases dadoras y receptoras utilizadas en los ensayos de permeación (pH 7.4).

El cloruro sódico fue suministrado por Análisis Vínicos S.L (Tomelloso, Castilla la Mancha, España) y el HEPES [N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)] de grado analítico por Sigma-Aldrich CO. (St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Una vez preparadas las soluciones, se almacenaron en frascos topacio a 4°C hasta su utilización.

Antes de su utilización se comprobó el pH final, ajustándose en caso necesario a pH 7.4 con NaOH 1N o con HCl 1N. Seguidamente, se filtraron a vacío a través de filtros desechables de 0.45 µm de diámetro MF Monitor Refills® (Millipore Corporate, Billerica, MA, Estados Unidos).

2.5. Promotores químicos ensayados

La estructura, masa molecular y pureza de cada uno de los promotores químicos seleccionados para los experimentos de difusión transdérmica se detallan en la tabla 23.

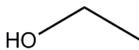
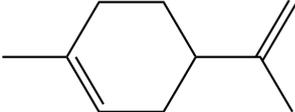
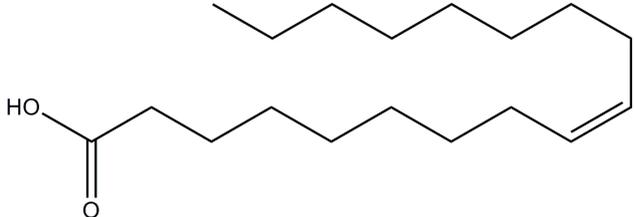
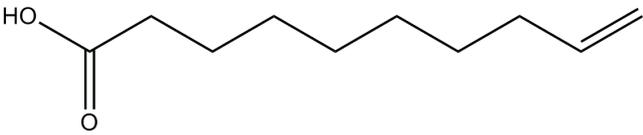
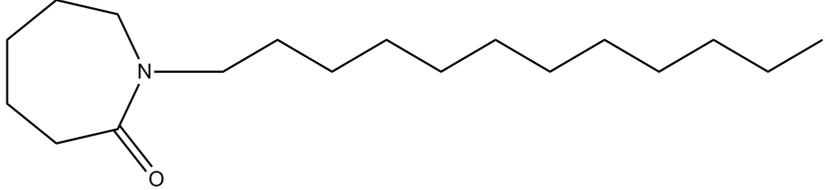
Promotores químicos ensayados		
	Masa molecular 46.07 Pureza ≥99.5% log P -0.1	Masa molecular 136.23 Pureza ≥96.0% log P 3.4
		
Ácido oleico (ácido cis-9-octadecenoico)		
	Masa molecular 282.46 Pureza ≥97.0% log P 6.5	
Ácido caproleico (ácido 9-decenoico)		
	Masa molecular 170.25 Pureza ≥90.0% log P 3.3	
Azone® (1-dodecilazacicloheptan-2-ona ó laurocapram)		
	Masa molecular 281.48 Pureza ≥97.0% log P 5.9	

Tabla 23. Estructura, masa molecular (g/mol), pureza (%) y log P del etanol, R-(+)-limoneno, ácido oleico y caproleico y Azone®.

Los promotores químicos elegidos fueron obtenidos de diferentes laboratorios. El etanol (alcohol etílico) y el ácido oleico (ácido cis-9-octadecenoico) fueron suministrados por Análisis Vínicos S.L. (Tomelloso, Castilla la Mancha, España). El Azone® también conocido como laurocapram (1-Dodecylazacycloheptan-2-one) se obtuvo por Netqem

(Durham, Carolina del Norte, Estados Unidos); el compuesto químico de la familia de los terpenos, el R-(+)-limoneno de los laboratorios Fluka (Buchs, Wendenberg, Suiza); y el ácido caproico también conocido como ácido 9-decenoico fue suministrado por Sigma-Aldrich S.A. (Tres Cantos, Madrid, España).

2.6. Iontoforesis

El equipo iontoforético consta de dos reservorios dispuestos en un ánodo (+) y cátodo (-), que contienen el principio activo y electrolitos. Éstos se conectan por medio de un generador de corriente continua de baja intensidad. Este dispositivo requiere de unos electrodos (conductores eléctricos), unos compartimentos que se conviertan en ánodo y cátodo y además, la presencia de puentes salinos que eviten la competencia del principio activo con ciertos electrolitos presentes.

2.6.1. Fabricación de los electrodos y puentes salinos

- **Electrodos:**

Para la realización de los experimentos de iontoforesis se utiliza el par reversible de electrodos de Ag/AgCl. El empleo de este tipo de electrodos se debe a que éstos no provocan la hidrólisis del medio acuoso en el que se encuentra no dando lugar, por tanto, a variaciones de pH (Raynauld y Laviolette, 1987).

Los electrodos utilizados se fabricaron en nuestro laboratorio de acuerdo con la técnica descrita por Green y colaboradores (Green y col., 1991^a). Este procedimiento consiste en bañar un fragmento de hilo de plata (Ag) de 99.9% de pureza (Aldrich Chemical Company Inc., Estados Unidos) de 1 mm de grosor y aproximadamente 8 cm de largo, lijado previamente a fin de eliminar impurezas y asegurar una buena adherencia, con cloruro de plata (AgCl) (99% de pureza, Aldrich Chemical Company Inc., Reino Unido) fundido a alta temperatura (figura 22).

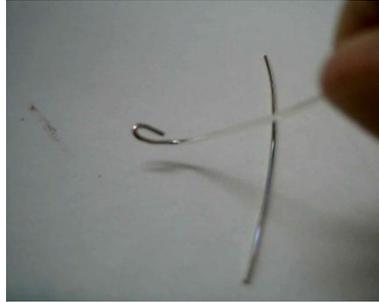


Figura 22. Hilo de plata de 1 mm de diámetro y unos 8 cm de largo, doblado en uno de sus extremos adecuadamente para fabricar el electrodo por inmersión en AgCl fundido.

Para ello, gracias a la utilización de un mechero Bunsen, el cloruro de plata se funde y se introduce en su seno el extremo del hilo de plata doblado durante un segundo aproximadamente y se saca para que se enfríe el cloruro de plata que se le ha depositado, de manera que solidifique sobre el hilo (véase figura 23).



Figura 23. Hilo de plata tras su inmersión en AgCl fundido a elevada temperatura. En el extremo doblado se observa el depósito de AgCl que por repetición del proceso de inmersión dará lugar al cuerpo del electrodo.

Este proceso se repite unas 6 a 10 veces hasta conseguir un espesor en la capa de cloruro de plata depositado de entre 1 y 2 mm (figura 24a). A continuación, el fragmento del hilo que no ha sido recubierto se cubre con un plástico aislante que se adapta a la superficie mediante la aplicación de calor. La figura 24b es una fotografía de un electrodo terminado, preparado para ser usado en el proceso de la iontoforesis como cátodo.

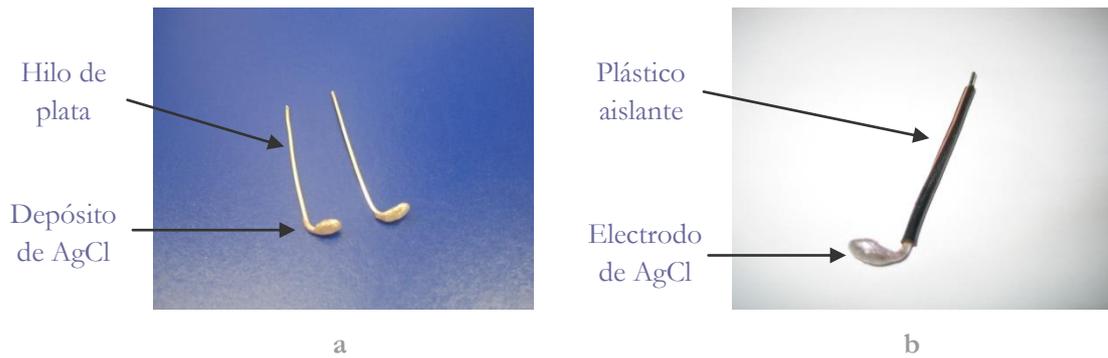


Figura 24. (a) Electrodo tras el proceso de recubrimiento por inmersión en AgCl fundido. (b) Electrodo terminado recubierto con plástico aislante.

A partir de estos electrodos, que actuarán como cátodos en los ensayos de iontoforesis se preparan los electrodos de plata que actuarán de ánodos. Para ello, se prepara un circuito cerrado de electrodos de AgCl , hilo de platino de 0.5 mm de diámetro (99.9% de pureza, Aldrich Chemical Company Inc., Estados Unidos) y una solución de NaCl . Dicho circuito se conecta a un generador de corriente eléctrica Kepco, BHK-MG 0-2000 V (Kepco Inc.; Flushing, Nueva York, Estados Unidos). Así se consigue la reducción electroquímica de la plata del cloruro de plata (Ag^+) a plata metálica (Ag^0).



Figura 25. Proceso de plateado de los electrodos AgCl .

- **Puentes salinos:**

Con el fin de evitar la competencia entre los iones sodio (Na^+) y el fármaco cuando se aplica la corriente eléctrica, se elaboraron puentes salinos de concentración 0.1 M NaCl . De este modo el electrodo de Ag^0 se introduce en un tercer compartimento en el que hay una solución de NaCl . Éste se conecta con la solución dadora (fármaco disuelto en una solución de NaCl :HEPES de 25:20 mM) por medio del puente salino (Cázares-Delgadillo y col., 2007; Cázares-Delgadillo y col., 2010; Shao y Feldman, 2007).

Los puentes salinos se elaboraron disolviendo en agua NaCl a concentración 0.1M y agarosa al 3% (p/v). Esta mezcla se calentó a elevada temperatura y tras agitación constante se obtuvo un gel de agarosa que se introdujo con jeringas quirúrgicas en tubos de silicona flexibles de diámetro interno 2 mm y longitud aproximada de 15 cm. Los puentes salinos se crean inmediatamente antes de su utilización debido a la deshidratación que sufren. La agarosa, Agarose ultrapure[®] electrophoresis grade de Gibco BRL, fue proporcionado por Sigma-Aldrich CO. (St. Louis, Estados Unidos) y los tubos de silicona por laboratorios Levantina, S.L. (Valencia, España).

2.7. Diseño de los ensayos

Se realizaron experimentos de absorción transdérmica, tanto del nadolol como hidrocloreuro de propranolol, con la misma instrumentación y condiciones atmosféricas [temperatura controlada, $(37.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$; n=39]. En ambos casos se realizó:

1. Estudio de absorción transdérmica por difusión pasiva.
2. Estudio del efecto de los promotores químicos ensayados.
3. Ensayos de difusión con aplicación de iontoforesis a diferentes densidades de corriente eléctrica:
 - 0.25 mA/cm²
 - 0.50 mA/cm²

El protocolo de preparación de los ensayos seguido en cada caso fue el que se detalla a continuación:

Aproximadamente 30 minutos antes del inicio de los experimentos, se extrajeron del congelador de -80°C el número de porciones de piel necesarias para los mismos.

La piel de oreja de cerdo descongelada, se situó, con el estrato córneo orientado hacia arriba, sobre el compartimento receptor, en el que previamente se introdujo un pequeño imán agitador. A continuación, se colocó el compartimento dador de forma que queden ambos compartimentos alineados, fijándolos posteriormente con una pinza de acero, cerrando así la célula de difusión.

Cuando la finalidad fue estudiar el efecto de los promotores químicos y caracterizar la absorción transdérmica de ambos beta-bloqueantes a través de la piel de cerdo, se procedió al pretratamiento de la piel con distintas soluciones en función del compuesto a evaluar.

El tratamiento de la piel previo a los ensayos de difusión transdérmica se realizó con 200 μL de soluciones al 5% (p/p) de Azone[®], R-(+)-limoneno, ácido oleico y ácido caproico en etanol, respectivamente. Debido a la lipofilia de algunos de los compuestos ensayados como promotores de absorción, se utilizó como vehículo etanol absoluto. Por este motivo, se analizó el efecto del etanol en la absorción transdérmica de ambos fármacos, y la piel se trató también con 200 μL de etanol (grupo control de vehículo). El pretratamiento se mantuvo durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, se retiraron las soluciones de los compartimentos dadores y se eliminaron los restos de las mismas.

Tras este tratamiento con promotores químicos, el siguiente paso fue idéntico en todos los ensayos. Se procedió al llenado de los compartimentos con fase receptora y dadora. El compartimento receptor de cada una de las células se completó con solución tamponada HEPES/NaCl (20/150 mM) a pH 7.4. En el compartimento dador se dispuso 1 mL de solución de nadolol o hidrocloreuro de propranolol (6 mg/mL) preparada en la solución salina HEPES/NaCl (20/25 mM).

Las células se situaron dentro de un baño con termostato (Trade Raypa[®] BAC/BOC 1 de R. Espinar, S.L.) sobre un multiagitador magnético (Variomag[®] Telesystem 15.20 de H+P Labortechnik AG) tal y como se muestra en la figura 26. Con el sistema en agitación constante, gracias al imán agitador que se colocó en el compartimento receptor, se logró la perfecta homogeneización de la fase receptora y se evitó la formación de capas estáticas de difusión en las proximidades de la membrana.

A continuación, ambos compartimentos se sellaron con Parafilm[®] M evitando así cualquier pérdida posible por evaporación.



Figura 26. Células de Franz sobre un multiagitador colocado en el baño termostático durante un ensayo de difusión transdérmica.

En los ensayos de iontoforesis se sumerge el electrodo AgCl en el compartimento receptor (solución del cátodo) y un extremo del puente salino en el compartimento dador (figura 27a). El otro extremo del puente salino se encuentra en un pequeño frasco de vidrio situado fuera del baño, en el que se sumerge el electrodo Ag en una solución de NaCl (solución del ánodo) (figura 27b). La cantidad de NaCl, necesario en cada frasco para que pase corriente durante el experimento, depende de la intensidad de corriente que se aplique y se calcula con la ecuación de Faraday. Así pues, según la densidad de corriente aplicada, la cantidad de NaCl necesaria es diferente: 2.47 mg (es decir $4.23 \cdot 10^{-5}$ moles) de NaCl (0.25 mA/cm^2) y 4.95 mg ($8.46 \cdot 10^{-5}$ moles) de NaCl (0.5 mA/cm^2).



a



b

Figura 27. (a) Célula tipo Franz con fase receptora en compartimento receptor, en el que se sumerge el electrodo AgCl (cátodo) y extremo de puente salino sumergido en fase dadora con fármaco. (b) Frasco con solución del ánodo donde se encuentran Ag y el otro extremo del puente salino.

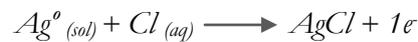
Paralelamente, se llevaron a cabo controles que consistieron en experimentos para comprobar la absorción transdérmica por difusión pasiva.

La duración de todos los ensayos de difusión fue de 30 horas.

En los estudios de iontoforesis se aplicó corriente eléctrica (0.25 ó 0.50 mA/cm²) durante las primeras 8 horas, puesto que la iontoforesis *in vivo* no se aplica por periodos excesivamente prolongados. Tras este tiempo, los ensayos prosiguieron hasta las 30 horas con difusión pasiva. Estos experimentos se realizaron empleando (figura 28):

1. Generador de corriente eléctrica Kepco, BHK, 0-2000 V (Flushing, Nueva York, Estados Unidos). Actúa como fuente de energía, y establece el campo eléctrico necesario.
2. Electrodo de Ag/AgCl. A partir de éstos, las reacciones que tiene lugar son:

Oxidación-ánodo:



Reducción-cátodo:



En el ánodo (electrodo positivo) tiene lugar la oxidación de la plata que se deposita como AgCl en el electrodo. Por el contrario, en el cátodo (electrodo negativo) se deposita Ag⁰ a partir del AgCl del que está constituido el electrodo y se liberan cloruros al medio. Los cationes, incluyendo al principio activo cargado positivamente, se desplazan desde el ánodo al cátodo, para lo cual han de pasar a través de la piel. Los aniones, son repelidos desde el cátodo al ánodo.

3. Compartimentos
 - Dador, donde se incluye la solución tamponada NaCl/HEPES (25:20 mM) pH 7.4, de fármaco a estudiar (6 mg/mL).
 - Receptor, donde se incluye la solución tamponada de NaCl/HEPES (150:20 mM) pH 7.4.
 - Frasco adicional con NaCl.

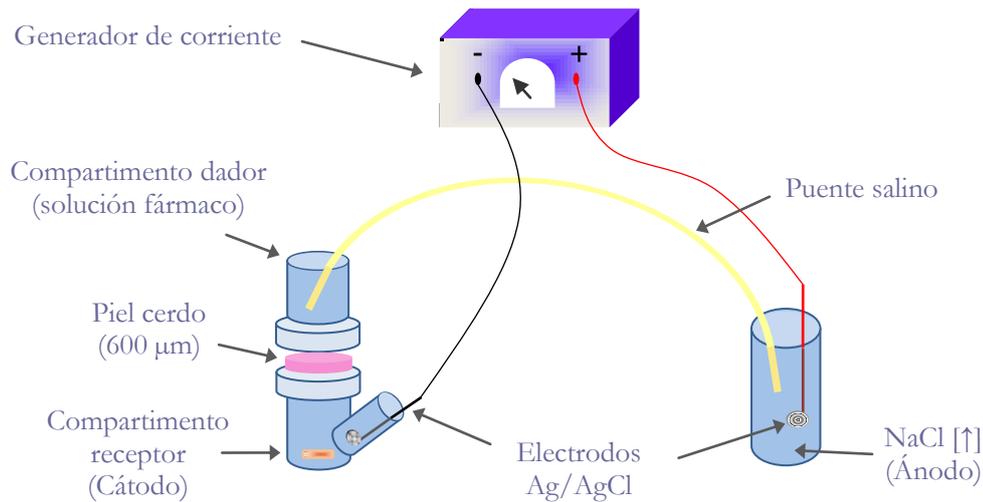


Figura 28. Célula de difusión conectada a un generador de corriente eléctrica.

2.8. Toma de muestras

Durante la realización de los ensayos se tomaron muestras de 200 μL del compartimento receptor. Las muestras fueron depositadas en pequeños viales de vidrio con tapones de cierre a presión a fin de ser valoradas. De manera inmediata, se repuso el mismo volumen con solución tamponada de pH 7.4. Este hecho, además de mantener el volumen de la solución receptora constante, permite, junto con la agitación continua de la misma, el mantenimiento de la condición "sink" o de sumidero en la fase receptora.

Durante las 30 horas que duraron los ensayos de absorción transdérmica, la toma de muestras del compartimento receptor se realizó cada hora durante las primeras 8 horas del ensayo, posteriormente, se tomaron muestras a las 24, 26, 28 y 30 horas (figura 29).

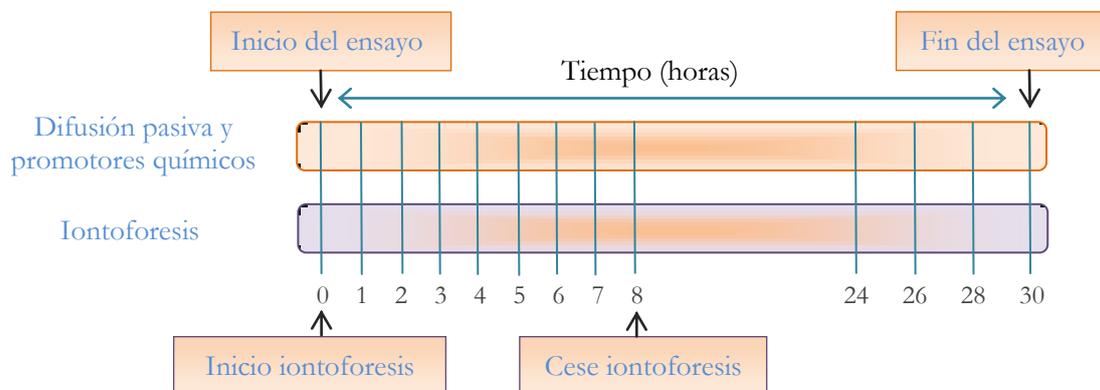


Figura 29. Protocolo de toma de muestras en los ensayos de difusión transdérmica: pasiva, promotores químicos y en los que se aplicó iontoforesis.

2.9. Extracción del nadolol e hidrocloreuro de propranolol retenido en piel

Al finalizar los ensayos de difusión se retiró la piel de la célula. A continuación se recortó el área de difusión de la piel con unas tijeras quirúrgicas. Por último, se introdujo la porción recortada en un frasco de pequeño tamaño con 3 mL de la solución isotónica tamponada de pH 7.4 y un imán agitador. El proceso de extracción del fármaco se realizó situando el frasco sobre un multiagitador magnético, mediante extracción sólido/líquido durante 12 horas bajo agitación continua.

Transcurrido ese tiempo se tomó una muestra de 1 mL del extracto que se filtró a través de un filtro Minisart® (Sartorius AG, Hannover, Alemania) de 0.45 μm de diámetro de poro.

2.10. Valoración de las muestras

Las muestras fueron analizadas inmediatamente mediante los métodos analíticos de cromatografía líquida de alta eficacia previamente descritos en el capítulo III.

2.11. Análisis de datos

A partir de la valoración cromatográfica de las muestras obtenidas en los experimentos de difusión transdérmica se obtuvieron los valores de áreas, que interpoladas en rectas de calibrado permitieron obtener las cantidades de nadolol e hidrocloreuro de propranolol proporcionadas en cada condición ensayada. A continuación, a partir de éstas, se obtuvieron las cantidades acumuladas de ambos beta-bloqueantes en el compartimento receptor para cada tiempo.

A fin de estudiar la absorción transdérmica del nadolol e hidrocloreuro de propranolol se construyeron gráficas de las cantidades de fármaco acumuladas en el compartimento receptor Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo t (horas).

Posteriormente, en los estudios de difusión pasiva y en el estudio del efecto producido por los promotores químicos, se ajustó a los datos obtenidos una cinética de difusión, aplicable cuando no se ha alcanzado el estado estacionario. La ecuación utilizada deriva de la segunda ley de Fick y fue propuesta por Scheuplein (Scheuplein, 1967):

$$Q = (KH)C_{veh} \left[\frac{D}{H^2} t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(\frac{-Dn^2\pi^2 t}{H^2}\right) \right] \quad \text{Ec. 11}$$

En la ecuación, Q es la cantidad acumulada de fármaco en el compartimento receptor por unidad de área durante un determinado tiempo, t . La concentración de fármaco en el vehículo (fase dadora) se representa como C_{veh} , K es el coeficiente de reparto estrato córneo/vehículo, D (cm²/h) es el coeficiente de difusión en la piel, H (cm) es la longitud de camino de difusión que ha de atravesar, es decir el espesor de la membrana (piel) y n un número entero comprendido entre uno e infinito.

El ajustado de los datos permitió obtener el coeficiente de permeabilidad de ambos fármacos a través de la piel (K_p). Siendo éste el valor correspondiente al producto del parámetro de reparto (KH), indicativo del reparto del fármaco en el vehículo - estrato córneo y el parámetro de difusión (D/H^2), representativo de la difusión del fármaco a través de la piel (Flynn y col., 1974). Del mismo modo, dicho ajustado proporcionó el tiempo de latencia de difusión de ambos beta-bloqueantes (t_o).

$$K_p = \frac{K \cdot D}{H} \qquad t_o = \frac{H^2}{6 \cdot D} \quad \text{Ec. 12 y 13}$$

Cuando la cantidad de fármaco que abandona el compartimento dador coincide con el que penetra en el compartimento receptor, se ha alcanzado el estado estacionario. El valor del flujo transdérmico, en esas condiciones, J (µg/cm²·h), equivale a la pendiente de la recta definida por el tramo en el que la relación entre la cantidad de sustancia permeada por unidad de área a través de la piel en el tiempo es lineal. Se puede calcular mediante la expresión:

$$J = K_p \cdot C_{veh} \quad \text{Ec. 14}$$

El cálculo de los parámetros de permeación (KH y D/H^2), se realizó mediante el programa informático de regresión no lineal "Win Nonlin Professional versión 5.0.1" (Pharsight Corporation 2005, Mountain View, California, Estados Unidos).

El ajustado a una cinética de difusión, explicado con anterioridad, no es aplicable en los ensayos con aplicación de iontoforesis ya que se alcanza el estado estacionario desde los primeros momentos de ensayo. En estos estudios, el flujo transdérmico se calculó a partir de la pendiente de la región lineal de la gráfica obtenida al representar las cantidades acumuladas en el compartimento receptor frente al tiempo.

Por otra parte, en los ensayos de permeación aplicando iontoforesis, si se tiene en cuenta que la electrorrepulsión es el principal mecanismo implicado en el transporte de moléculas pequeñas y cargadas, como es el nadolol e hidrocloreuro de propranolol (Vuorio y col., 2003), el flujo de fármaco a través de la piel se puede calcular a partir de la ecuación 4 (Capítulo II: Antecedentes).

De este modo, si se determinan experimentalmente los valores de flujo transdérmico en los ensayos de iontoforesis, aplicada en condiciones controladas (intensidad constante), se puede calcular el número de transporte a partir de la ecuación 15:

$$t = \frac{J \cdot Z \cdot F}{I} \quad \text{Ec. 15}$$

donde t es el número de transporte de dicho fármaco, J es el flujo transdérmico, Z la carga del compuesto, F la constante de Faraday e I es la intensidad de corriente aplicada.

En todos los casos, cuando se detectaron diferencias estadísticas entre flujos transdérmicos de los distintos grupos, se calculó el efecto promotor de la absorción transdérmica del nadolol e hidrocloreuro de propranolol de cada estrategia promotora ensayada. Para establecer el efecto promotor (EP) se determinó el cociente entre el flujo transdérmico obtenido con estrategia promotora y el flujo obtenido en el grupo control.

$$EP = \frac{\text{Flujo con promotor}}{\text{Flujo sin promotor (control)}} \quad \text{Ec. 16}$$

2.11.1. Criterios de calidad

Los criterios seleccionados a fin de determinar la calidad de los datos obtenidos:

- Coeficiente de correlación (r). Proporciona la concordancia entre los valores observados y los predichos. Se obtiene realizando la regresión lineal entre los valores observados y los predichos en cada ajustado. Cuanto más próximo es el valor absoluto de r a la unidad, mayor es la fiabilidad del ajustado.
- Criterio de Información de Akaike (AIC). Es una medida global del ajuste del modelo (Akaike, 1974). Su cálculo se realiza según la siguiente expresión:

$$AIC = n \cdot \ln SC + 2 \cdot p \quad \text{Ec. 17}$$

en la que n es el número de puntos experimentales, SC la suma de cuadrados de los residuales y p es el número de parámetros de la ecuación utilizada para el ajuste. El modelo más probable es el que proporciona un menor valor de AIC.

- Error estándar de estimación de parámetros de los ajustados (E.E.). Es un índice de fiabilidad del ajuste obtenido, ya que expresa la precisión con la que se ha estimado el parámetro.
- Desviación estándar de la media (D.E.). Es una medida de dispersión que da información de la fiabilidad con la que ha sido obtenido el parámetro.

2.11.2. Análisis estadístico de los resultados

Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para detectar la posible existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos en los estudios de difusión transdérmica de ambos beta-bloqueantes. El nivel de confianza fue del 95%, de modo que existen diferencias significativas cuando el valor de probabilidad obtenido es inferior al 5%. El análisis de varianza se completó mediante el test de comparaciones múltiples post-hoc de Scheffé en caso de que las varianzas fueran homogéneas o, la prueba T3 de Dunnett cuando las varianzas fueran heterogéneas.

3. Resultados y discusión

Para investigar la absorción transdérmica del nadolol e hidrocloreuro de propranolol 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 la humana, así la piel de cerdo exhibe un punto isoelectrico muy cercano al de la piel humana y unas propiedades permeoselectivas pH-dependientes muy similares a ésta (Marro y col., 2001^a; van de Sandt y Rutten, 1995). La piel de cerdo tiene un punto isoelectrico de alrededor de 4 (Merino y col., 1999), inferior al descrito para otros modelos de membrana animales como por ejemplo el de rata (Rudy y Senkowski, 1973), pero cercano al descrito para piel humana (Burnette y Ongpipatanakul, 1987; Marro y col., 2001^a). Estas características hacen que la piel de cerdo sea un modelo animal válido para realizar estudios de difusión transdérmica con iontoforesis.

Las tablas 24 a 31 muestran las cantidades medias acumuladas de nadolol en función del tiempo. Las tablas 34 a 41 recogen la misma información correspondiente a los ensayos con hidrocloreuro de propranolol. Con esos datos, se calculó la cinética media de penetración cutánea de ambos beta-bloqueantes en cada condición. En cada tabla se representan las cinéticas asociadas, las barras de error muestran la desviación estándar de la media (D.E.).

En las tablas donde se especifican los datos de los experimentos en difusión pasiva y con promotores químicos se detallan además los parámetros de reparto (KH , cm) y difusión (D/H^2 , h^{-1}), el coeficiente de permeabilidad (K_p , $cm \cdot h^{-1}$), el flujo transdérmico [J , $\mu g/(cm^2h)$] y el tiempo de latencia (t_0 , h), que resultan del ajuste de la ecuación de Scheuplein (ecuación 11) a los datos. También se representan los valores de los parámetros estadísticos que definen la bondad de los ajustados, el coeficiente de correlación entre los valores observados y los predichos (r) y el valor del criterio de información Akaike (AIC).

Por otra parte, los ensayos con iontoforesis, se centraron en el estudio del efecto de la densidad de corriente aplicada: 0.25 mA/cm^2 que se traduce en una intensidad de 0.142 mA y el doble de densidad de corriente 0.50 mA/cm^2 (0.284 mA). El voltaje requerido incrementó aproximadamente un 9.53% y 17.8% para las densidades 0.25 y 0.50 mA/cm^2 , respectivamente, durante las primeras 2 horas de estudio iontoforético. Posteriormente se mantuvo constante el voltaje en valores cercanos a 7.34 V y 13.3 V , respectivamente.

La máxima densidad de corriente tolerable en humanos para la aplicación de iontoforesis sin perjuicio para el paciente es de 0.50 mA/cm², pero eligiendo una densidad de corriente menor se minimizan los posibles daños en la piel (irritación y/o edema) y se consigue mejor tolerancia por parte del paciente, aumentando su confort, y en consecuencia, el cumplimiento terapéutico.

Las tablas 30 y 31 del nadolol y la 40 y 41 en el caso del análogo beta-bloqueante, muestran las cantidades acumuladas en el compartimento receptor frente al tiempo (datos y gráfica de cinética media de permeación) de las dos densidades de corriente eléctrica ensayadas. Se exponen a su vez los flujos transdérmicos en las primeras 8 horas (J_{8h}) de aplicación de iontoforesis y tras su cese (J_{8-30h}) para observar la cinética de permeación del fármaco tras la aplicación de corriente eléctrica y el posible efecto sobre la piel. Los flujos se calcularon a partir de la pendiente de la representación de las cantidades acumuladas de fármaco en el compartimento receptor ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo (horas).

Con fin de estimar las diferencias y semejanzas, se ha representado y plasmado el nadolol en tonos azules y en verde el hidrocloreuro de propranolol.

3.1. Ensayos de difusión transdérmica del nadolol

Las tablas 24 a 29 muestran los datos de las cinéticas medias de penetración cutánea del nadolol en difusión pasiva y con promotores químicos.

Control: DIFUSIÓN PASIVA [n=22]				
Cantidades acumuladas de nadolol en el compartimento receptor				
Tiempo (horas)	Qa ± D.E. (µg/cm ²)			
1	1.90 ± 2.79			
2	6.50 ± 3.41			
3	8.50 ± 2.97			
4	14.0 ± 5.4			
5	21.6 ± 6.2			
6	31.4 ± 9.2			
7	45.6 ± 15.7			
8	57.6 ± 16.9			
24	305 ± 69			
26	342 ± 85			
28	381 ± 90			
30	452 ± 108			

Parámetros de permeación				
KH x 10 ⁵ (cm)	D/H ² x 10 ⁵ (h ⁻¹)	K _p x 10 ⁵ (cm·h ⁻¹)	J (µg·cm ⁻² ·h ⁻¹)	t ₀ (h)
9071 ± 1696	3147 ± 469	286 ± 12	17.1 ± 0.7	5.31 ± 0.79

Criterios de calidad de los ajustados	
r >	AIC
0.998	91.1

Tabla 24. Cantidades acumuladas medias (Qa) de **nadolol** en el compartimento receptor frente al tiempo para el grupo **control (difusión pasiva sin promotor químico)** (Media ± D.E.); parámetros de permeación: reparto (KH) y difusión (D/H²), coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo transdérmico (J) y tiempo de latencia (t₀) obtenidos del ajuste (Media ± E.E.); y en el recuadro inferior, parámetros estadísticos que definen la bondad de los ajustados, coeficiente de correlación (r) y criterio Akaike (AIC).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

La línea continua de la gráfica representa el ajustado de los valores observados según la ecuación de Scheuplein.

Promotor: ETANOL [n=14]				
Cantidades acumuladas de nadolol en el compartimento receptor				
Tiempo (horas)	Qa ± D.E. (µg/cm ²)			
1	5.00 ± 3.62			
2	14.9 ± 11.5			
3	31.1 ± 22.2			
4	50.7 ± 33.0			
5	71.4 ± 32.4			
6	103 ± 49			
7	120 ± 56			
8	152 ± 67			
24	747 ± 210			
26	856 ± 240			
28	938 ± 239			
30	1060 ± 233			

Parámetros de permeación				
KH x 10 ⁵ (cm)	D/H ² x 10 ⁵ (h ⁻¹)	K _p x 10 ⁵ (cm·h ⁻¹)	J (µg·cm ⁻² ·h ⁻¹)	t ₀ (h)
16286 ± 2043	4038 ± 423	658 ± 15	39.5 ± 0.9	4.13 ± 0.43

Criterios de calidad de los ajustados	
r >	AIC
0.999	103

Tabla 25. Cantidades acumuladas medias (Qa) de **nadolol** en el compartimento receptor frente al tiempo para el grupo **control vehículo (etanol)** (Media ± D.E.); parámetros de permeación: reparto (KH) y difusión (D/H²), coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo transdérmico (J) y tiempo de latencia (t₀) obtenidos del ajuste (Media ± E.E.); y en el recuadro inferior, parámetros estadísticos que definen la bondad de los ajustados, coeficiente de correlación (r) y criterio Akaike (AIC).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

La línea continua de la gráfica representa el ajustado de los valores observados según la ecuación de Scheuplein.

Promotor: AZONE® [n=8]				
Cantidades acumuladas de nadolol en el compartimento receptor				
Tiempo (horas)	Qa ± D.E. (µg/cm ²)			
1	12.4 ± 4.9			
2	42.3 ± 16.8			
3	89.9 ± 25.3			
4	153 ± 38			
5	232 ± 49			
6	314 ± 68			
7	350 ± 78			
8	440 ± 83			
24	2039 ± 394			
26	2319 ± 397			
28	2591 ± 557			
30	2837 ± 529			

Parámetros de permeación				
KH x 10 ⁵ (cm)	D/H ² x 10 ⁵ (h ⁻¹)	K _p x 10 ⁵ (cm·h ⁻¹)	J (µg·cm ⁻² ·h ⁻¹)	t ₀ (h)
37382 ± 4422	4666 ± 472	1744 ± 34	105 ± 2	3.57 ± 0.36

Criterios de calidad de los ajustados	
r >	AIC
0.999	125

Tabla 26. Cantidades acumuladas medias (Qa) de **nadolol** en el compartimento receptor frente al tiempo para el grupo pretratado con **Azone®** (Media ± D.E.); parámetros de permeación: reparto (KH) y difusión (D/H²), coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo transdérmico (J) y tiempo de latencia (t₀) obtenidos del ajuste (Media ± E.E.); y en el recuadro inferior, parámetros estadísticos que definen la bondad de los ajustados, coeficiente de correlación (r) y criterio Akaike (AIC).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

La línea continua de la gráfica representa el ajustado de los valores observados según la ecuación de Scheuplein.

Promotor: R-(+)-LIMONENO [n=6]				
Cantidades acumuladas de nadolol en el compartimento receptor				
Tiempo (horas)	Qa ± D.E. (µg/cm ²)			
1	9.60 ± 1.89			
2	17.5 ± 4.43			
3	29.3 ± 10.6			
4	41.7 ± 20.3			
5	56.2 ± 25.1			
6	69.5 ± 39.2			
7	73.6 ± 33.9			
8	91.3 ± 44.1			
24	383 ± 151			
26	429 ± 166			
28	468 ± 190			
30	521 ± 202			

Parámetros de permeación				
KH x 10 ⁵ (cm)	D/H ² x 10 ⁵ (h ⁻¹)	K _p x 10 ⁵ (cm·h ⁻¹)	J (µg·cm ⁻² ·h ⁻¹)	t ₀ (h)
4340 ± 694	7024 ± 1011	305 ± 6	18.3 ± 0.4	2.37 ± 0.34

Criterios de calidad de los ajustados	
r >	AIC
0.998	88.4

Tabla 27. Cantidades acumuladas medias (Qa) de **nadolol** en el compartimento receptor frente al tiempo para el grupo pretratado con **R-(+)-limoneno** (Media ± D.E.); parámetros de permeación: reparto (KH) y difusión (D/H²), coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo transdérmico (J) y tiempo de latencia (t₀) obtenidos del ajuste (Media ± E.E.); y en el recuadro inferior, parámetros estadísticos que definen la bondad de los ajustados, coeficiente de correlación (r) y criterio Akaike (AIC).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

La línea continua de la gráfica representa el ajustado de los valores observados según la ecuación de Scheuplein.

Promotor: ÁCIDO OLEICO [n=7]				
Cantidades acumuladas de nadolol en el compartimento receptor				
Tiempo (horas)	Qa ± D.E. (µg/cm²)			
1	13.6 ± 6.7			
2	50.9 ± 23.9			
3	112 ± 42			
4	179 ± 61			
5	258 ± 74			
6	341 ± 80			
7	406 ± 102			
8	478 ± 113			
24	1794 ± 281			
26	1974 ± 338			
28	2135 ± 388			
30	2370 ± 450			

Parámetros de permeación				
KH x 10⁵ (cm)	D/H² x 10⁵ (h⁻¹)	K_p x 10⁵ (cm·h⁻¹)	J (µg·cm⁻²·h⁻¹)	t₀ (h)
16666 ± 1329	8288 ± 604	1381 ± 12	82.8 ± 0.7	2.01 ± 0.15

Criterios de calidad de los ajustados	
r >	AIC
0.999	106

Tabla 28. Cantidades acumuladas medias (Qa) de **nadolol** en el compartimento receptor frente al tiempo para el grupo pretratado con **ácido oleico** (Media ± D.E.); parámetros de permeación: reparto (KH) y difusión (D/H²), coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo transdérmico (J) y tiempo de latencia (t₀) obtenidos del ajuste (Media ± E.E.); y en el recuadro inferior, parámetros estadísticos que definen la bondad de los ajustados, coeficiente de correlación (r) y criterio Akaike (AIC).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

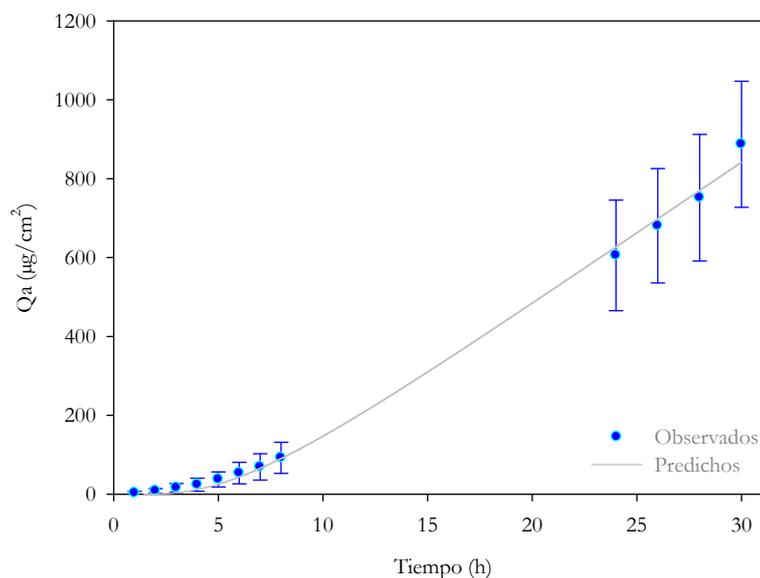
La línea continua de la gráfica representa el ajustado de los valores observados según la ecuación de Scheuplein.

Promotor: ÁCIDO CAPROLEICO [n=8]

Cantidades acumuladas de nadolol en el compartimento receptor

Tiempo (horas) **Qa ± D.E. (µg/cm²)**

1	2.90 ± 4.04
2	8.10 ± 5.83
3	16.0 ± 10.9
4	23.9 ± 16.5
5	37.3 ± 19.1
6	53.5 ± 27.3
7	69.0 ± 33.4
8	92.1 ± 39.5
24	606 ± 140
26	681 ± 145
28	752 ± 161
30	887 ± 160



Parámetros de permeación

KH x 10⁵ (cm)	D/H² x 10⁵ (h⁻¹)	K_p x 10⁵ (cm·h⁻¹)	J (µg·cm⁻²·h⁻¹)	t₀ (h)
23515 ± 3915	2544 ± 320	598 ± 25	35.9 ± 1.5	6.55 ± 0.82

Criterios de calidad de los ajustados

r >	AIC
0.998	103

Tabla 29. Cantidades acumuladas medias (Qa) de **nadolol** en el compartimento receptor frente al tiempo para el grupo pretratado con **ácido caproleico** (Media ± D.E.); parámetros de permeación: reparto (KH) y difusión (D/H²), coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo transdérmico (J) y tiempo de latencia (t₀) obtenidos del ajuste (Media ± E.E.); y en el recuadro inferior, parámetros estadísticos que definen la bondad de los ajustados, coeficiente de correlación (r) y criterio Akaike (AIC).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

La línea continua de la gráfica representa el ajustado de los valores observados según la ecuación de Scheuplein.

Tal y como se puede observar, todos los compuestos ensayados [etanol y todos los promotores al 5% (m/m) en etanol [(Azone[®], R-(+)-limoneno, ácido oleico y ácido caproleico)] incrementan las cantidades acumuladas de fármaco en el compartimento receptor.

Por otra parte, las siguientes dos tablas, 30 y 31 hacen referencia a los experimentos de iontoforesis realizados con el beta-bloqueante nadolol.

IONTOFORESIS 0.25 mA/cm ² [n=6]	
Cantidades acumuladas de nadolol en el compartimento receptor	
Tiempo (horas)	Qa ± D.E. (µg/cm ²)
1	32.7 ± 12.9
2	111 ± 32
3	225 ± 46
4	340 ± 62
5	479 ± 80
6	603 ± 104
7	720 ± 133
8	849 ± 156
24	1351 ± 141
26	1398 ± 135
28	1448 ± 136
30	1484 ± 130

Parámetros de permeación	
J _{0-8h} (µg·cm ⁻² h ⁻¹)	J _{8-30h} (µg·cm ⁻² h ⁻¹)
120 ± 21	29.6 ± 3.2

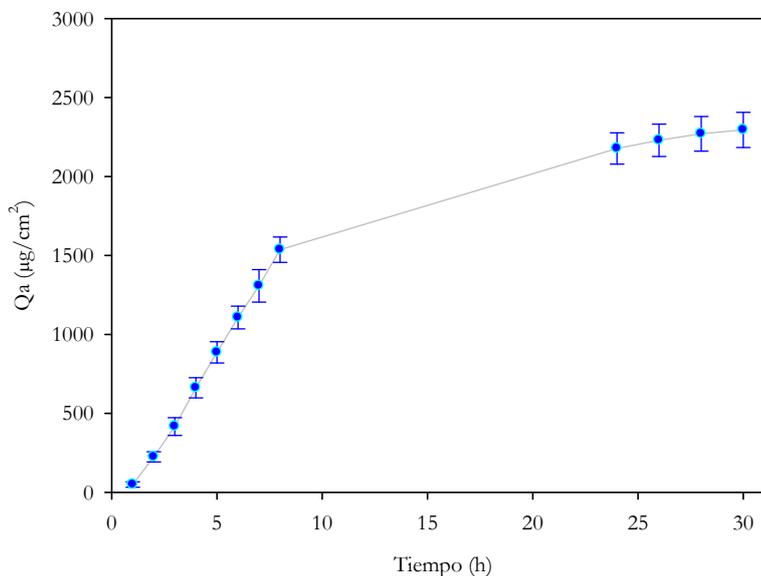
Tabla 30. Cantidades acumuladas medias (Qa) de **nadolol** en el compartimento receptor frente al tiempo obtenidas con **iontoforesis 0.25 mA/cm²** (Media ± D.E.) y flujos transdérmicos medios (J) para las primeras 8 horas de aplicación de corriente eléctrica y tras su cese (flujo post-iontoforesis) (Media ± D.E.).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

IONTOFORESIS 0.50 mA/cm² [n=6]

Cantidades acumuladas de nadolol en el compartimento receptor

Tiempo (horas)	Qa ± D.E. (µg/cm ²)
1	49.9 ± 16.9
2	225 ± 33
3	417 ± 56
4	662 ± 64
5	886 ± 67
6	1107 ± 72
7	1308 ± 103
8	1536 ± 80
24	2178 ± 99
26	2229 ± 103
28	2270 ± 109
30	2295 ± 111



Parámetros de permeación

J_{0-8h} (µg·cm⁻²h⁻¹)

216 ± 11

J_{8-30h} (µg·cm⁻²h⁻¹)

36.1 ± 7.5

Tabla 31. Cantidades acumuladas medias (Qa) de **nadolol** en el compartimento receptor frente al tiempo obtenidas con **iontoforesis 0.50 mA/cm²** (Media ± D.E.) y flujos transdérmicos medios (J) para las primeras 8 horas de aplicación de corriente eléctrica y tras su cese (flujo post-iontoforesis) (Media ± D.E.).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

La aplicación de iontoforesis durante las primeras 8 horas provoca un incremento importante de las cantidades acumuladas en el compartimento receptor frente al tiempo y posteriormente, dichas cantidades siguen incrementándose hasta el fin de los estudios.

A continuación, la figura 30 resume los flujos transdérmicos de las diferentes condiciones ensayadas.

Todas las estrategias promotoras ensayadas, provocan un incremento del flujo transdérmico. Solo el R-(+)-limoneno no provocó un incremento estadísticamente significativo. Sí se observa aumento, y de manera muy significativa, en el caso de la aplicación de ambas densidades de corriente y con Azone[®]. No obstante, tras 8 horas de

aplicación de una densidad de corriente de 0.50 mA/cm^2 el flujo transdérmico de nadolol fue muy superior al del resto de condiciones ensayadas.

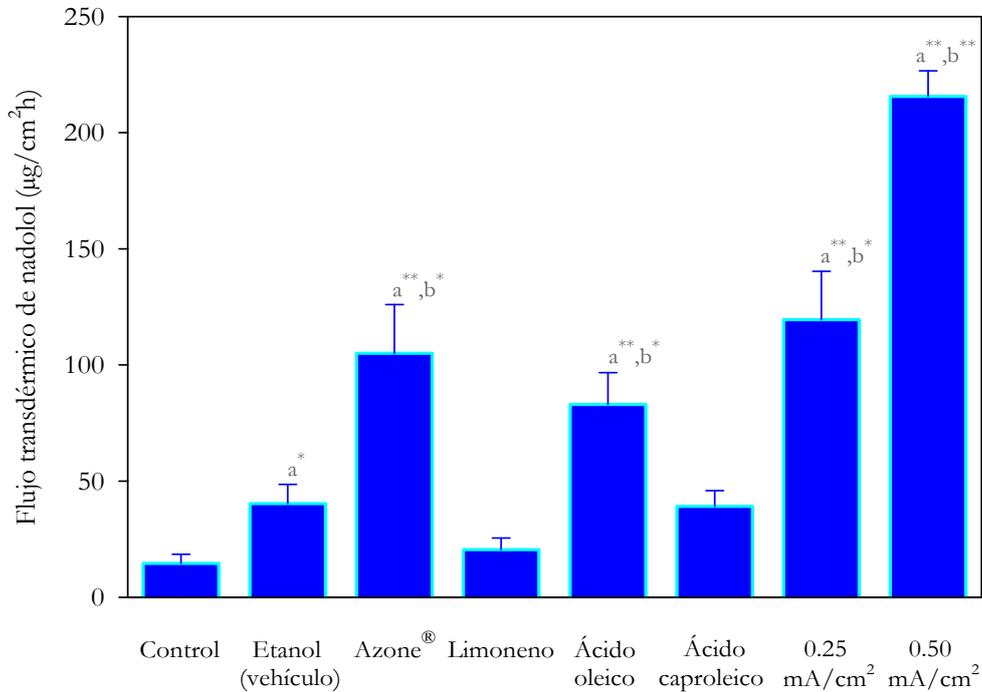


Figura 30. Flujos transdérmicos (J) de nadolol para las diferentes condiciones ensayadas (promotores químicos en su estado estacionario y las 8 primeras horas de aplicación de iontoforesis). Valor medio \pm D.E. [* ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$)].

^a diferencia estadísticamente significativa respecto al control (difusión pasiva).

^b diferencia estadísticamente significativa respecto al vehículo etanol.

En los casos en los que se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de flujo de nadolol observados con los promotores químicos y el método físico iontoforesis y sus controles, se calculó el efecto promotor de cada uno de las estrategias promotoras estudiadas tal como se detalla en el apartado 2.11 del actual capítulo (véase tabla 32).

Al finalizar cada experimento de difusión transdérmica, tal como se ha descrito con anterioridad, se extrajo la cantidad de nadolol retenida en la piel. Los resultados se muestran en la tabla 33. Previamente se determinó el rendimiento del proceso de extracción, que fue del $(96.4 \pm 2.6)\%$ (Media \pm D.E., $n=10$).

Efecto promotor		
Condición	EP respecto al control (Media \pm D.E.)	EP respecto al etanol (Media \pm D.E.)
Etanol	2.25 \pm 0.73	—
Azone [®]	7.18 \pm 2.39	2.61 \pm 0.74
R-(+)-limoneno	—	—
Ácido oleico	5.68 \pm 1.79	2.06 \pm 0.54
Ácido caproleico	2.68 \pm 0.86	—
Iontoforesis (0.25 mA/cm ²)	8.15 \pm 0.98	3.17 \pm 0.92
Iontoforesis (0.50 mA/cm ²)	14.8 \pm 1.3	5.72 \pm 0.14

Tabla 32. Efecto promotor (EP) de cada estrategia promotora estudiada en la absorción transdérmica del nadolol.

Nadolol retenido en piel	
Condición	Cantidad retenida en piel ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Media \pm D.E.)
Difusión pasiva (control)	147 \pm 54
Etanol (vehículo)	121 \pm 22
Azone [®]	239 \pm 24 ^{a,b}
R-(+)-limoneno	129 \pm 31
Ácido oleico	178 \pm 31
Ácido caproleico	169 \pm 46
Iontoforesis (0.25 mA/cm ²)	255 \pm 73 ^{a,b}
Iontoforesis (0.50 mA/cm ²)	217 \pm 29

Tabla 33. Cantidad de nadolol retenido en piel al fin de los experimentos. (Media \pm D.E.).

^a diferencia estadísticamente significativa respecto al control (difusión pasiva) ($p < 0.05$).

^b diferencia estadísticamente significativa respecto al vehículo etanol ($p < 0.05$).

Como se observa en la tabla 33, el pretratamiento con Azone[®] y la densidad de corriente de 0.25 mA/cm² incrementó significativamente (en 1.63 y 1.74 veces) la cantidad de fármaco retenida en la piel tras 30 horas de experimento. Asimismo la tercera estrategia que más retención produjo fue la aplicación de 0.50 mA/cm² que eleva en 1.47 veces esta cantidad.

3.2. Ensayos de difusión transdérmica del hidrocloreuro de propranolol

Las tablas 34 a 39 muestran los resultados obtenidos del hidrocloreuro de propranolol en los ensayos de difusión pasiva y con promotores químicos.

Control: DIFUSIÓN PASIVA [n=12]				
Cantidades acumuladas de hidrocloreuro de propranolol en el compartimento receptor				
Tiempo (horas)	Q _a ± D.E. (µg/cm ²)			
1	0.10 ± 0.02			
2	1.17 ± 2.27			
3	10.0 ± 7.1			
4	25.6 ± 13.3			
5	43.5 ± 23.8			
6	65.5 ± 30.6			
7	93.8 ± 33.4			
8	140 ± 25			
24	824 ± 114			
26	943 ± 138			
28	1070 ± 136			
30	1179 ± 166			
Parámetros de permeación				
KH x 10 ⁵ (cm)	D/H ² x 10 ⁵ (h ⁻¹)	K _p x 10 ⁵ (cm·h ⁻¹)	J (µg·cm ⁻² ·h ⁻¹)	t ₀ (h)
31329 ± 3212	2601 ± 203	815 ± 21	48.9 ± 1.3	6.41 ± 0.49
Criterios de calidad de los ajustados				
r >		AIC		
0.999		99.1		

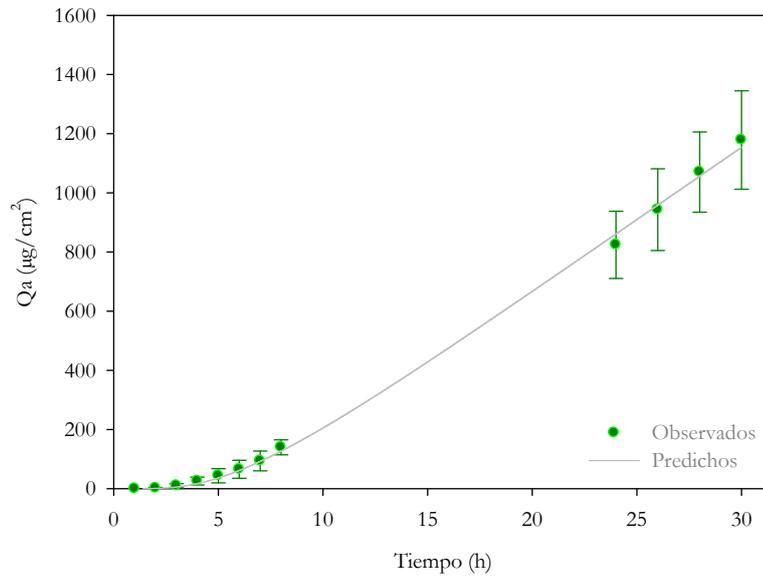


Tabla 34. Cantidades acumuladas medias (Q_a) de hidrocloreuro de propranolol en el compartimento receptor frente al tiempo para el grupo control (difusión pasiva sin promotor químico) (Media ± D.E.); parámetros de permeación: reparto (KH) y difusión (D/H²), coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo transdérmico (J) y tiempo de latencia (t₀) obtenidos del ajuste (Media ± E.E.); y en el recuadro inferior, parámetros estadísticos que definen la bondad de los ajustados, coeficiente de correlación (r) y criterio Akaike (AIC).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

La línea continua de la gráfica representa el ajustado de los valores observados según la ecuación de Scheuplein.

Promotor: ETANOL [n=10]				
Cantidades acumuladas de hidrocloreto de propranolol en el compartimento receptor				
Tiempo (horas)	Qa ± D.E. (µg/cm²)			
1	0.00 ± 0.00			
2	0.55 ± 1.09			
3	4.84 ± 5.00			
4	15.2 ± 12.5			
5	29.6 ± 23.8			
6	43.9 ± 30.4			
7	69.3 ± 38.7			
8	99.4 ± 53.9			
24	787 ± 208			
26	917 ± 240			
28	1017 ± 275			
30	1129 ± 273			
Parámetros de permeación				
KH x 10⁵ (cm)	D/H² x 10⁵ (h⁻¹)	K_p x 10⁵ (cm·h⁻¹)	J (µg·cm⁻²·h⁻¹)	t₀ (h)
41467 ± 3098	2049 ± 108	850 ± 19	51.0 ± 1.2	8.13 ± 0.43
Criterios de calidad de los ajustados				
r >			AIC	
0.999			87.4	

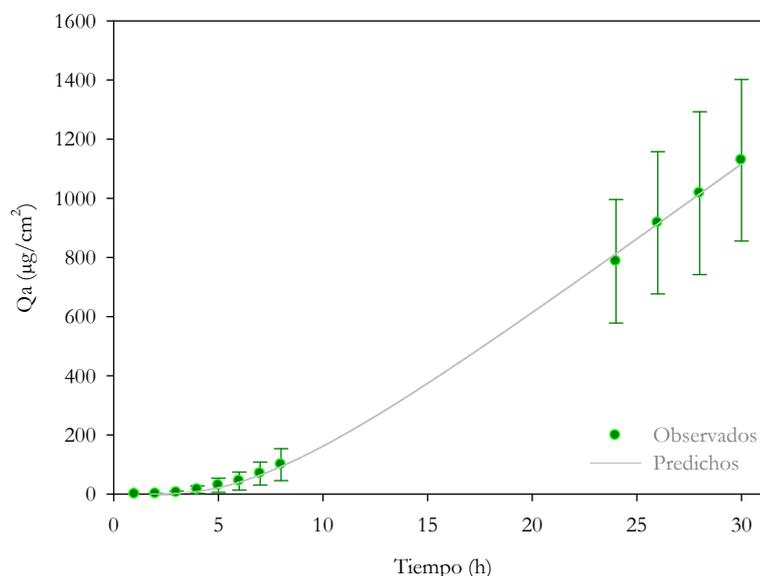


Tabla 35. Cantidades acumuladas medias (Qa) de **hidrocloreto de propranolol** en el compartimento receptor frente al tiempo para el grupo **control vehículo (etanol)** (Media ± D.E.); parámetros de permeación: reparto (KH) y difusión (D/H²), coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo transdérmico (J) y tiempo de latencia (t₀) obtenidos del ajuste (Media ± E.E.); y en el recuadro inferior, parámetros estadísticos que definen la bondad de los ajustados, coeficiente de correlación (r) y criterio Akaike (AIC).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

La línea continua de la gráfica representa el ajustado de los valores observados según la ecuación de Scheuplein.

Promotor: AZONE® [n=6]				
Cantidades acumuladas de hidrocloreuro de propranolol en el compartimento receptor				
Tiempo (horas)	Qa ± D.E. (µg/cm ²)			
1	1.75 ± 0.19			
2	14.2 ± 6.7			
3	49.3 ± 15.1			
4	103 ± 32			
5	160 ± 43			
6	224 ± 51			
7	290 ± 65			
8	357 ± 72			
24	1861 ± 216			
26	2086 ± 250			
28	2382 ± 243			
30	2590 ± 291			

Parámetros de permeación				
KH x 10 ⁵ (cm)	D/H ² x 10 ⁵ (h ⁻¹)	K _p x 10 ⁵ (cm·h ⁻¹)	J (µg·cm ⁻² ·h ⁻¹)	t ₀ (h)
45592 ± 4669	3644 ± 306	1662 ± 33	99.7 ± 2.0	4.57 ± 0.38

Criterios de calidad de los ajustados	
r >	AIC
0.999	120

Tabla 36. Cantidades acumuladas medias (Qa) de **hidrocloreuro de propranolol** en el compartimento receptor frente al tiempo para el grupo pretratado con **Azone®** (Media ± D.E.); parámetros de permeación: reparto (KH) y difusión (D/H²), coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo transdérmico (J) y tiempo de latencia (t₀) obtenidos del ajuste (Media ± E.E.); y en el recuadro inferior, parámetros estadísticos que definen la bondad de los ajustados, coeficiente de correlación (r) y criterio Akaike (AIC).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

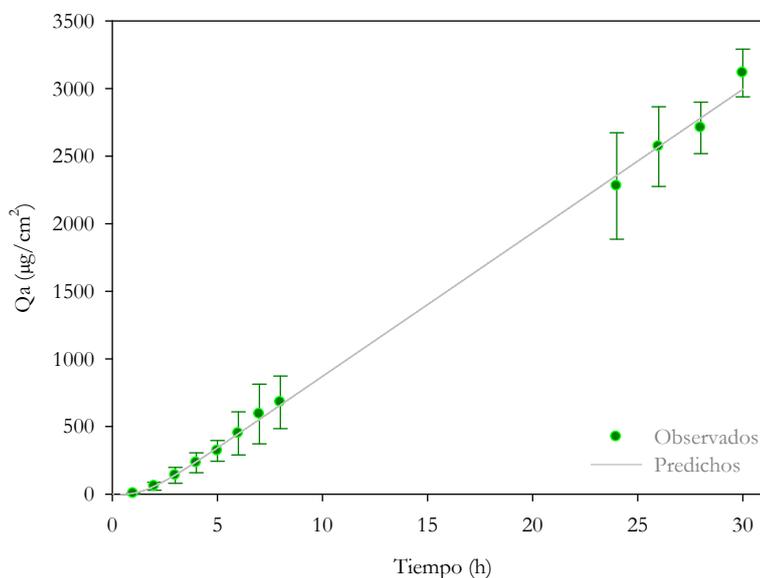
La línea continua de la gráfica representa el ajustado de los valores observados según la ecuación de Scheuplein.

Promotor: R-(+)-LIMONENO [n=6]

Cantidades acumuladas de hidrocloruro de propranolol en el compartimento receptor

Tiempo (horas) **Qa ± D.E. (µg/cm²)**

1	3.97 ± 1.43
2	58.5 ± 29.7
3	139 ± 59
4	232 ± 74
5	320 ± 77
6	449 ± 160
7	593 ± 221
8	679 ± 194
24	2279 ± 394
26	2570 ± 295
28	2709 ± 190
30	3115 ± 176



Parámetros de permeación

KH x 10⁵ (cm)	D/H² x 10⁵ (h⁻¹)	K_p x 10⁵ (cm·h⁻¹)	J (µg·cm⁻²·h⁻¹)	t₀ (h)
28062 ± 3066	9282 ± 1377	2097 ± 28	106 ± 2	1.80 ± 0.27

Criterios de calidad de los ajustados

r >	AIC
0.999	127

Tabla 37. Cantidades acumuladas medias (Qa) de **hidrocloruro de propranolol** en el compartimento receptor frente al tiempo para el grupo pretratado con **R-(+)-limoneno** (Media ± D.E.); parámetros de permeación: reparto (KH) y difusión (D/H²), coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo transdérmico (J) y tiempo de latencia (t₀) obtenidos del ajuste (Media ± E.E.); y en el recuadro inferior, parámetros estadísticos que definen la bondad de los ajustados, coeficiente de correlación (r) y criterio Akaike (AIC).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

La línea continua de la gráfica representa el ajustado de los valores observados según la ecuación de Scheuplein.

Promotor: ÁCIDO OLEICO [n=6]				
Cantidades acumuladas de hidrocloreuro de propranolol en el compartimento receptor				
Tiempo (horas)	Qa ± D.E. (µg/cm²)			
1	0.52 ± 0.53			
2	11.2 ± 9.5			
3	33.5 ± 17.2			
4	66.2 ± 27.9			
5	98.0 ± 37.7			
6	144 ± 49			
7	189 ± 59			
8	248 ± 74			
24	1415 ± 319			
26	1558 ± 365			
28	1825 ± 408			
30	2013 ± 475			
Parámetros de permeación				
KH x 10⁵ (cm)	D/H² x 10⁵ (h⁻¹)	K_p x 10⁵ (cm·h⁻¹)	J (µg·cm⁻²·h⁻¹)	t₀ (h)
44075 ± 6023	3011 ± 324	1327 ± 41	79.6 ± 2.4	5.54 ± 0.60
Criterios de calidad de los ajustados				
r >		AIC		
0.999		119		

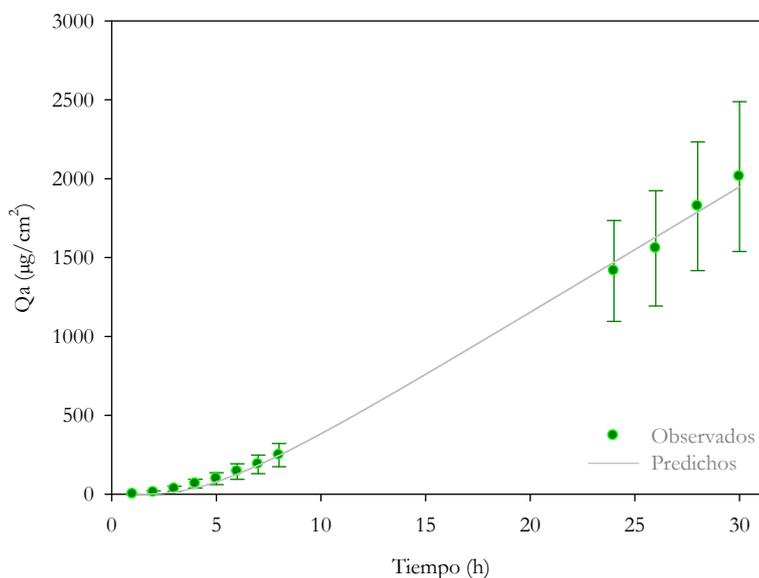


Tabla 38. Cantidades acumuladas medias (Qa) de **hidrocloreuro de propranolol** en el compartimento receptor frente al tiempo para el grupo pretratado con **ácido oleico** (Media ± D.E.); parámetros de permeación: reparto (KH) y difusión (D/H²), coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo transdérmico (J) y tiempo de latencia (t₀) obtenidos del ajuste (Media ± E.E.); y en el recuadro inferior, parámetros estadísticos que definen la bondad de los ajustados, coeficiente de correlación (r) y criterio Akaike (AIC).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

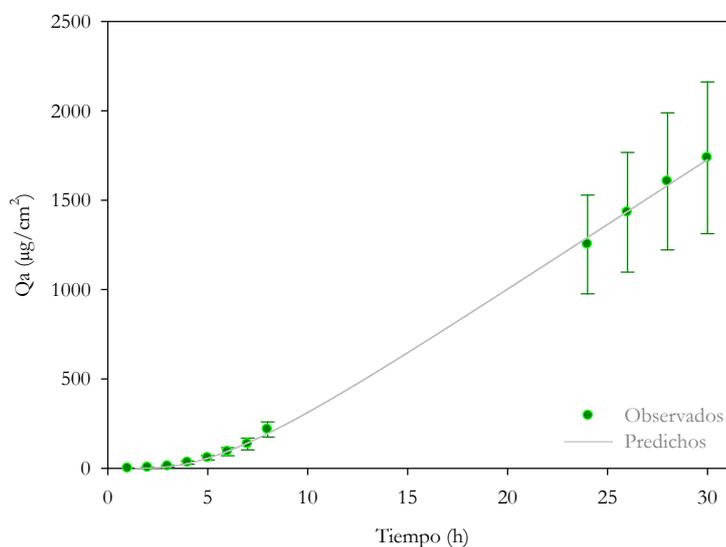
La línea continua de la gráfica representa el ajustado de los valores observados según la ecuación de Scheuplein.

Promotor: ÁCIDO CAPROLEICO [n=6]

Cantidades acumuladas de hidrocloreto de propranolol en el compartimento receptor

Tiempo (horas) **Qa ± D.E. (µg/cm²)**

1	0.20 ± 0.05
2	3.62 ± 1.55
3	11.8 ± 3.9
4	31.8 ± 8.9
5	58.5 ± 12.3
6	93.0 ± 22.6
7	136 ± 33
8	217 ± 42
24	1253 ± 276
26	1432 ± 335
28	1605 ± 384
30	1737 ± 425



Parámetros de permeación

KH x 10⁵ (cm)	D/H² x 10⁵ (h⁻¹)	K_p x 10⁵ (cm·h⁻¹)	J (µg·cm⁻²·h⁻¹)	t₀ (h)
45516 ± 3097	2664 ± 139	1212 ± 20	72.7 ± 1.2	6.26 ± 0.33

Criterios de calidad de los ajustados

r >	AIC
0.999	99.2

Tabla 39. Cantidades acumuladas medias (Qa) de **hidrocloreto de propranolol** en el compartimento receptor frente al tiempo para el grupo pretratado con **ácido caproleico** (Media ± D.E.); parámetros de permeación: reparto (KH) y difusión (D/H²), coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo transdérmico (J) y tiempo de latencia (t₀) obtenidos del ajuste (Media ± E.E.); y en el recuadro inferior, parámetros estadísticos que definen la bondad de los ajustados, coeficiente de correlación (r) y criterio Akaike (AIC).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

La línea continua de la gráfica representa el ajustado de los valores observados según la ecuación de Scheuplein.

Tal y como se puede observar, no todos los compuestos ensayados como promotores proporcionaron un aumento en la cantidad acumulada de fármaco en el compartimento receptor. Los promotores químicos (etanol y el ácido caproleico) no

mostraron un incremento importante, incluso el pretratamiento con el vehículo etanol proporcionó una menor permeación de fármaco (tabla 35) que el control (tabla 34).

Las tablas 40 y 41 muestran los datos obtenidos en los ensayos de iontoforesis.

IONTOFORESIS 0.25 mA/cm ² [n=5]	
Cantidades acumuladas de hidrocloreuro de propranolol en el compartimento receptor	
Tiempo (horas)	Q _a ± D.E. (µg/cm ²)
1	11.2 ± 1.3
2	45.9 ± 3.2
3	103 ± 3
4	149 ± 10
5	225 ± 24
6	295 ± 28
7	364 ± 35
8	433 ± 42
24	741 ± 82
26	741 ± 78
28	775 ± 86
30	796 ± 82

Parámetros de permeación	
J _{0-8h} (µg·cm ⁻² h ⁻¹)	J _{8-30h} (µg·cm ⁻² h ⁻¹)
61.6 ± 7.1	16.9 ± 1.9

Tabla 40. Cantidades acumuladas medias (Q_a) de **hidrocloreuro de propranolol** en el compartimento receptor frente al tiempo obtenidas con **iontoforesis 0.25 mA/cm²** (Media ± D.E.) y flujos transdérmicos medios (J) para las primeras 8 horas de aplicación de corriente eléctrica y tras su cese (flujo post-iontoforesis) (Media ± D.E.).

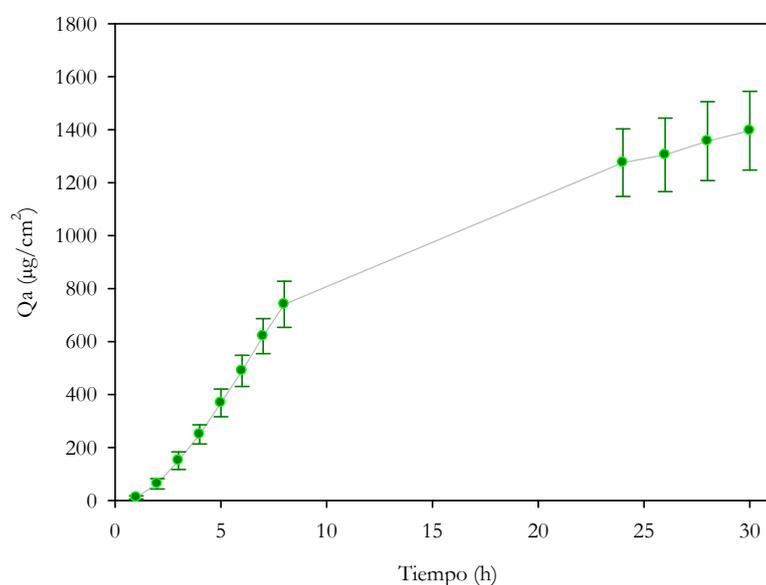
El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

IONTOFORESIS 0.50 mA/cm² [n=5]

Cantidades acumuladas de hidrocloreuro de propranolol en el compartimento receptor

Tiempo (horas) **Qa ± D.E. (µg/cm²)**

1	11.4 ± 5.9
2	63.0 ± 19.5
3	151 ± 33
4	250 ± 36
5	369 ± 52
6	490 ± 59
7	621 ± 66
8	741 ± 87
24	1276 ± 128
26	1305 ± 139
28	1357 ± 149
30	1396 ± 148



Parámetros de permeación

J_{0-8h} (µg·cm⁻²h⁻¹)

108 ± 10

J_{8-30h} (µg·cm⁻²h⁻¹)

30.5 ± 3.3

Tabla 41. Cantidades acumuladas medias (Qa) de **hidrocloreuro de propranolol** en el compartimento receptor frente al tiempo obtenidas con **iontoforesis 0.50 mA/cm²** y flujos transdérmicos medios (J) para las primeras 8 horas de aplicación de corriente eléctrica y tras su cese (flujo post-iontoforesis) (Media ± D.E.).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

Al igual que con su análogo beta-bloqueante nadolol, la aplicación de iontoforesis provocó un incremento importante de las cantidades acumuladas en el compartimento receptor y las cantidades acumuladas post-iontoforesis siguieron ascendiendo en cantidad hasta la finalización de los estudios a las 30 horas.

A continuación, en la figura 31 se muestran los valores de flujo transdérmico medio obtenidos a partir de cada una de las cinéticas individuales para cada condición analizada (Media ± D.E.).

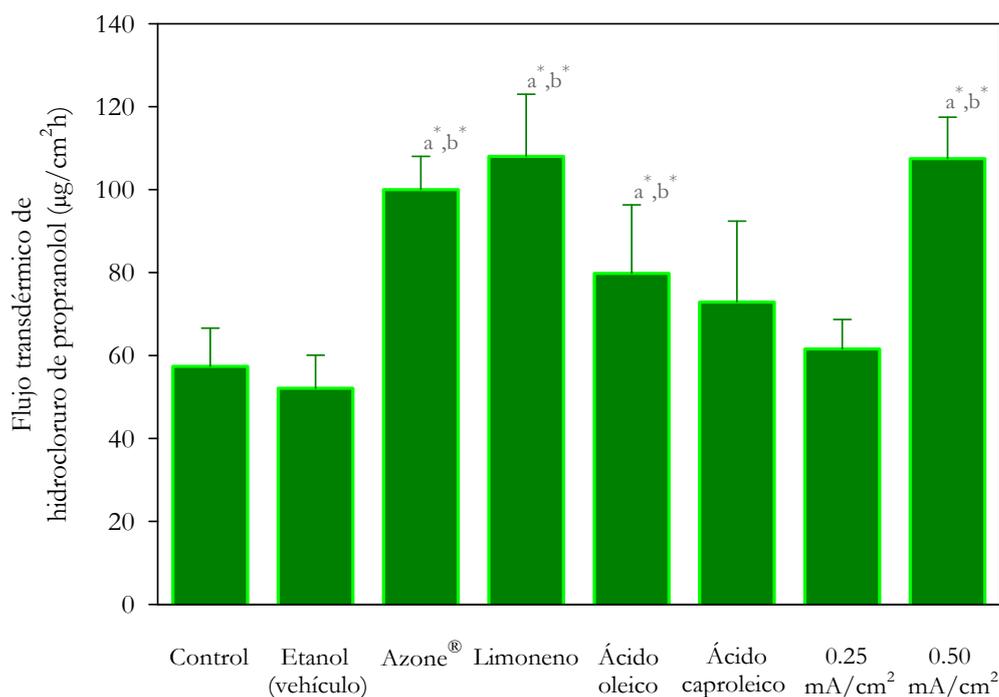


Figura 31. Flujos transdérmicos (J) de hidrocloreuro de propranolol para las diferentes condiciones ensayadas (promotores químicos en su estado estacionario y las 8 primeras horas de aplicación de iontoforesis). Valor medio \pm D.E. [$^* (p < 0.05)$].

^a diferencia estadísticamente significativa respecto al control (difusión pasiva).

^b diferencia estadísticamente significativa respecto al vehículo etanol.

En referencia a las diferentes estrategias ensayadas, el empleo de etanol no supone un efecto positivo en el incremento del flujo transdérmico de hidrocloreuro de propranolol respecto a la difusión pasiva (control). Asimismo, el ácido caproleico y la aplicación de iontoforesis (0.25 mA/cm²) no mostraron diferencias estadísticas con el control. En cambio, el pretratamiento de Azone®, R-(+)-limoneno y ácido oleico así como la densidad de corriente 0.50 mA/cm² ha demostrado desarrollar un efecto promotor en la absorción transdérmica del hidrocloreuro de propranolol, produciendo diferencias estadísticamente significativas en los valores de flujo transdérmico obtenidos respecto al control y etanol (vehículo).

Para las estrategias promotoras con las que se detectaron diferencias estadísticamente significativas se calculó el efecto promotor correspondiente (tabla 42).

Efecto promotor		
Condición	EP respecto al control (Media \pm D.E.)	EP respecto al etanol (Media \pm D.E.)
Azone [®]	1.74 \pm 0.70	1.91 \pm 0.32
R-(+)-limoneno	1.88 \pm 0.39	1.95 \pm 1.31
Ácido oleico	1.39 \pm 0.36	1.62 \pm 0.48
Ácido caproleico	—	—
Iontoforesis (0.25 mA/cm ²)	—	—
Iontoforesis (0.50 mA/cm ²)	1.88 \pm 0.79	1.99 \pm 0.29

Tabla 42. Efecto promotor (EP) de cada estrategia promotora estudiada en la absorción transdérmica del hidrocloreuro de propranolol.

Tras finalizar los diferentes ensayos de difusión, se extrajo la cantidad de hidrocloreuro de propranolol retenida en la piel. Los resultados se muestran en la tabla 43. Previamente se determinó el rendimiento del proceso de extracción, siendo del (94.7 \pm 4.4)% (Media \pm D.E., n=10).

Hidrocloreuro de propranolol retenido en piel	
Condición	Cantidad retenida en piel ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Media \pm D.E.)
Difusión pasiva (control)	302 \pm 81
Etanol (vehículo)	261 \pm 27
Azone [®]	275 \pm 19
R-(+)-limoneno	461 \pm 53
Ácido oleico	516 \pm 69
Ácido caproleico	333 \pm 97
Iontoforesis (0.25 mA/cm ²)	252 \pm 42
Iontoforesis (0.50 mA/cm ²)	262 \pm 28

Tabla 43. Cantidad de hidrocloreuro de propranolol retenido en piel al fin de los experimentos (Media \pm D.E.).

Como se observa en la tabla 43, en cualquier caso las cantidades retenidas en piel fueron más elevadas que las de nadolol. Ésto puede ser debido a la naturaleza lipófila que presenta el propranolol. La cantidad de hidrocloreuro de propranolol retenido en la piel tras los estudios transdérmicos de 30 horas en difusión pasiva fue de 302 \pm 81 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Los pretratamientos con R-(+)-limoneno y ácido oleico elevaron en 1.53 y 1.71 veces esta

cantidad. Ninguna de las estrategias ensayadas incrementó estadísticamente la cantidad retenida respecto a la obtenida en difusión pasiva.

3.3. Comparación de la permeabilidad de ambos beta-bloqueantes

Con el fin de comparar la absorción transdérmica, los ensayos realizados en piel de cerdo se reprodujeron bajo las mismas condiciones experimentales y se estudió la influencia de diversas estrategias que permitieran incrementar la permeabilidad de estos fármacos.

En la figura 32 se detalla una comparación del coeficiente de permeación (K_p) del nadolol e hidrocloreuro de propranolol, mientras que en las figuras 33 y 34 se representan las cinéticas de absorción transdérmica medias a través de piel de cerdo en todas las condiciones experimentales estudiadas con promotores químicos. Como se puede observar, según el beta-bloqueante, las sustancias químicas ensayadas incrementan en mayor o menor medida las cantidades de fármaco en el compartimento receptor respecto al control.

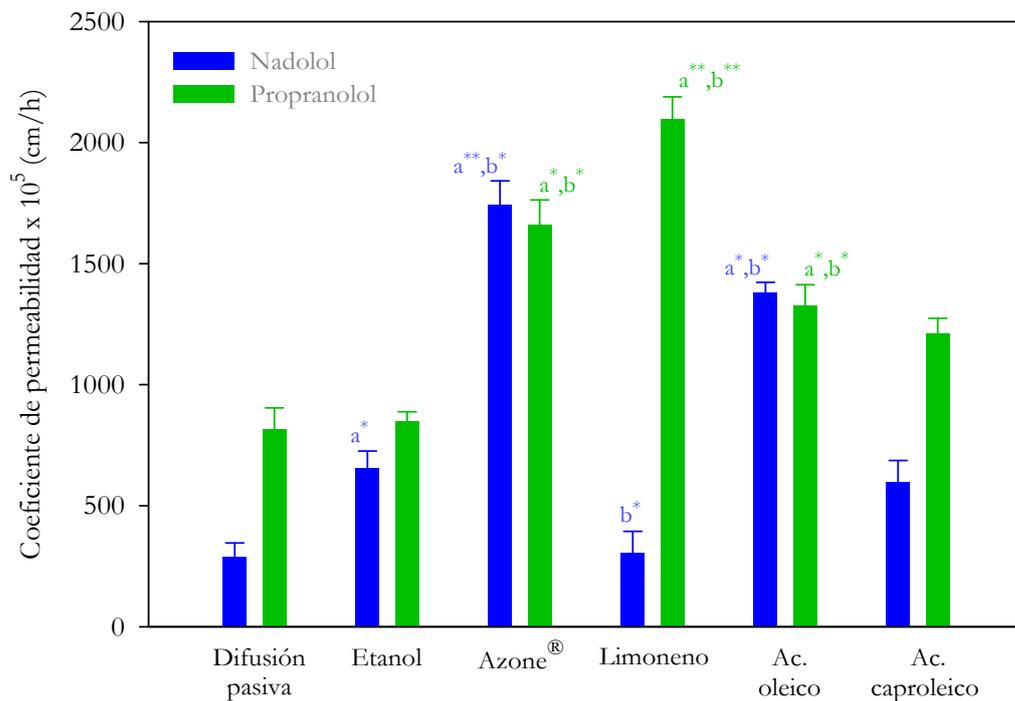


Figura 32. Comparación del coeficiente de permeabilidad, K_p (cm/h) obtenido del nadolol (azul) e hidrocloreuro de propranolol (verde) a través de piel de cerdo en los ensayos transdérmicos en las diferentes condiciones ensayadas. Valor medio \pm D.E. [* ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$)].

^a diferencia estadísticamente significativa respecto al control (difusión pasiva).

^b diferencia estadísticamente significativa respecto al vehículo etanol.

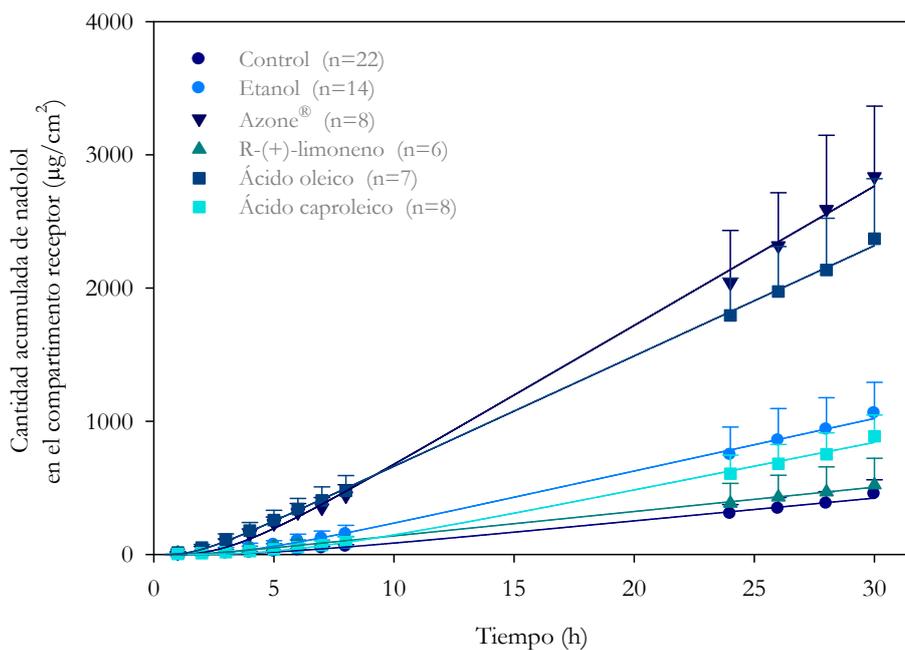


Figura 33. Cantidades de nadolol acumuladas en el compartimento receptor ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo (h) en las diferentes condiciones estudiadas en piel de cerdo. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

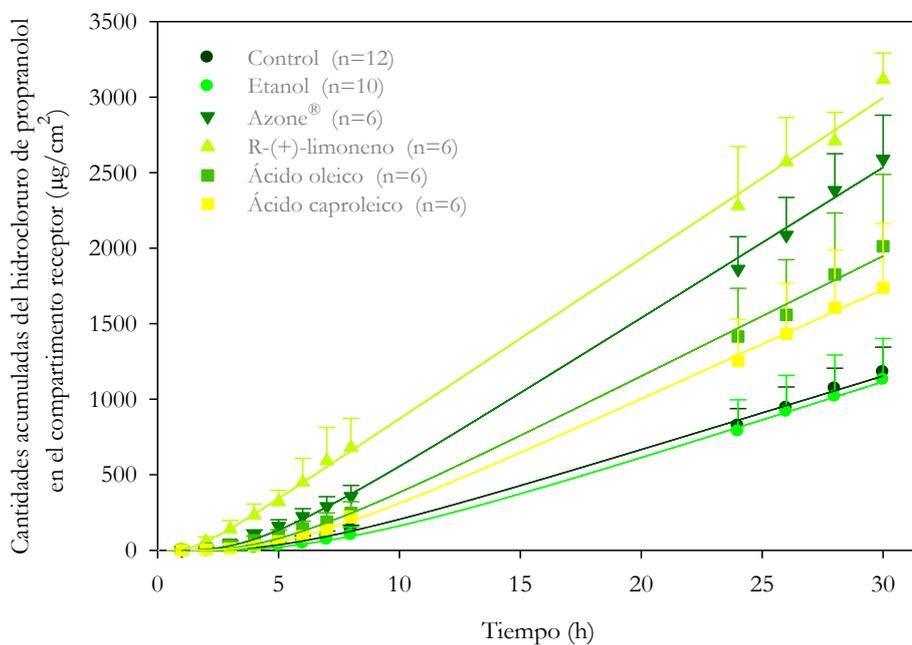


Figura 34. Cantidades de hidrocloreuro de propranolol acumuladas en el compartimento receptor ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo (h) en las diferentes condiciones estudiadas en piel de cerdo. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Aunque la concentración molar de ambos beta-bloqueantes no es idéntica, debido a que sí es muy similar y por imposibilidad de emplear la ecuación de la segunda ley de Fick para obtener el coeficiente de permeación, porque con iontoforesis desde el inicio del ensayo se estima que se ha alcanzado el estado estacionario, la figura 35 plasma una comparación de los flujos transdérmicos iontoforéticos de los dos fármacos.

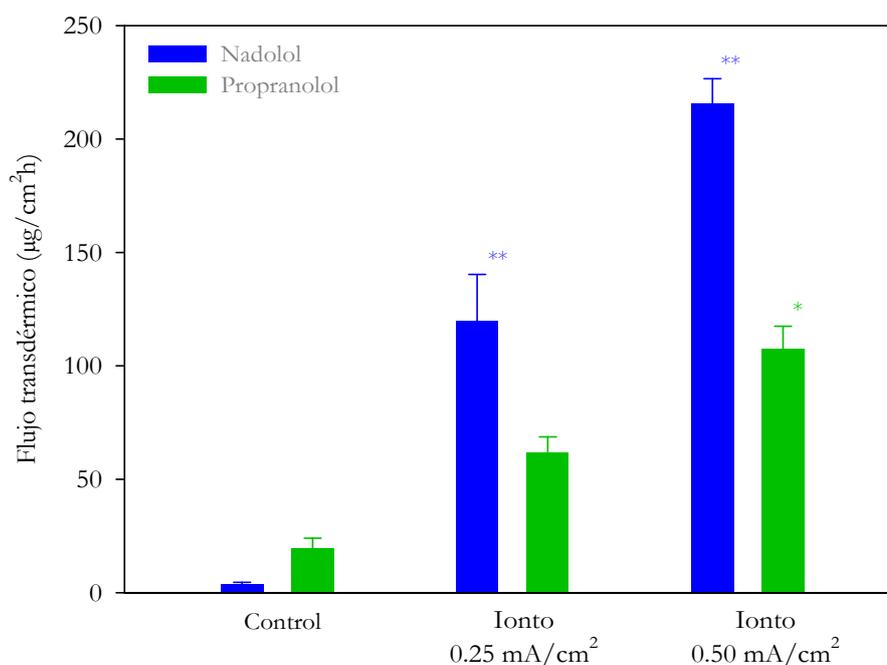


Figura 35. Comparación del flujo transdérmico iontoforético ($\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$) obtenido del nadolol (azul) e hidrocloreuro de propranolol (verde) a través de piel de cerdo. Valor medio \pm D.E. [* ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$). Diferencia estadísticamente significativa respecto al control (difusión pasiva)].

Al igual que en los ensayos con promotores químicos, con los resultados de los ensayos de difusión en las dos densidades de corriente estudiadas se construyeron cinéticas medias.

Como se puede observar en las figuras 36 (nadolol) y 37 (hidrocloreuro de propranolol), tras las 8 horas de aplicación de la iontoforesis, se confirma que ésta es una técnica que provoca un incremento importante de las cantidades acumuladas en el compartimento receptor respecto a la difusión pasiva determinada como control en los estudios.

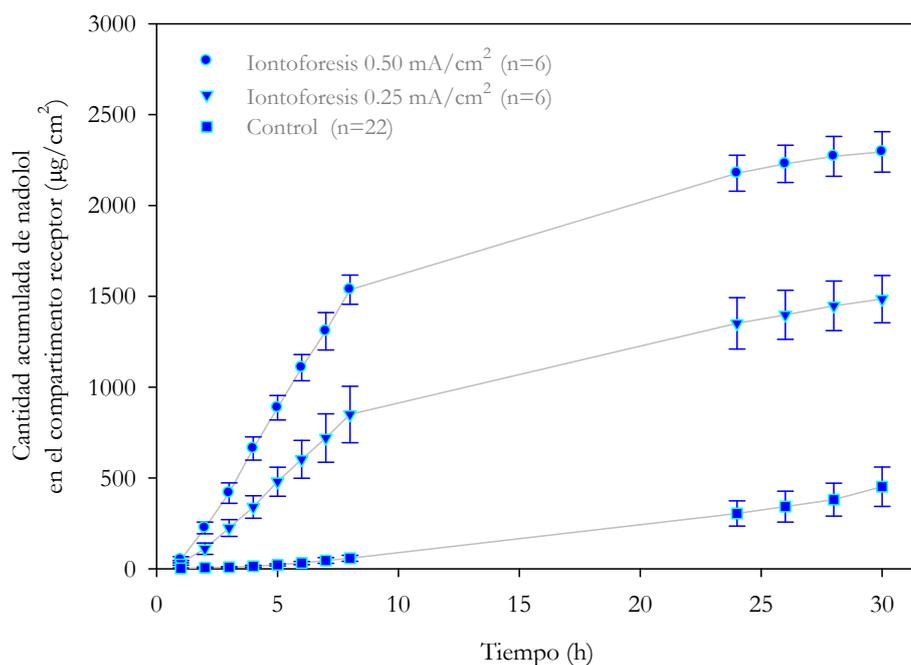


Figura 36. Cantidades acumuladas medias de nadolol en el compartimento receptor ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo (h) para las condiciones de iontoforesis ensayadas. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

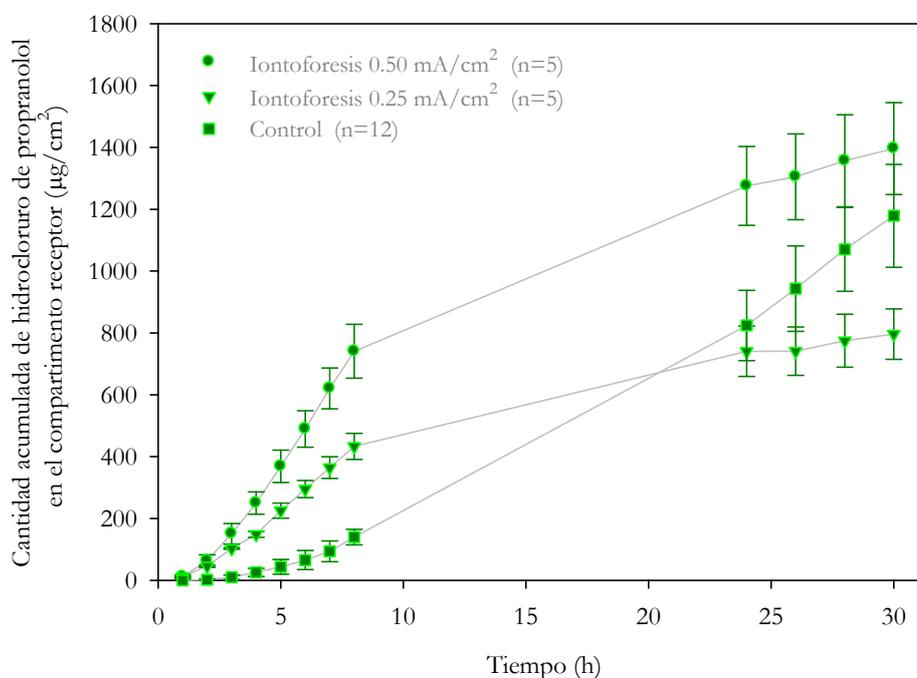


Figura 37. Cantidades acumuladas medias de hidrocloreuro de propranolol en el compartimento receptor ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo (h) para las condiciones de iontoforesis ensayadas. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Con el objetivo de comparar la permeación en las distintas condiciones ensayadas, la figura 38 muestra las cantidades de ambos beta-bloqueantes extraídas de la piel al finalizar los experimentos de difusión.

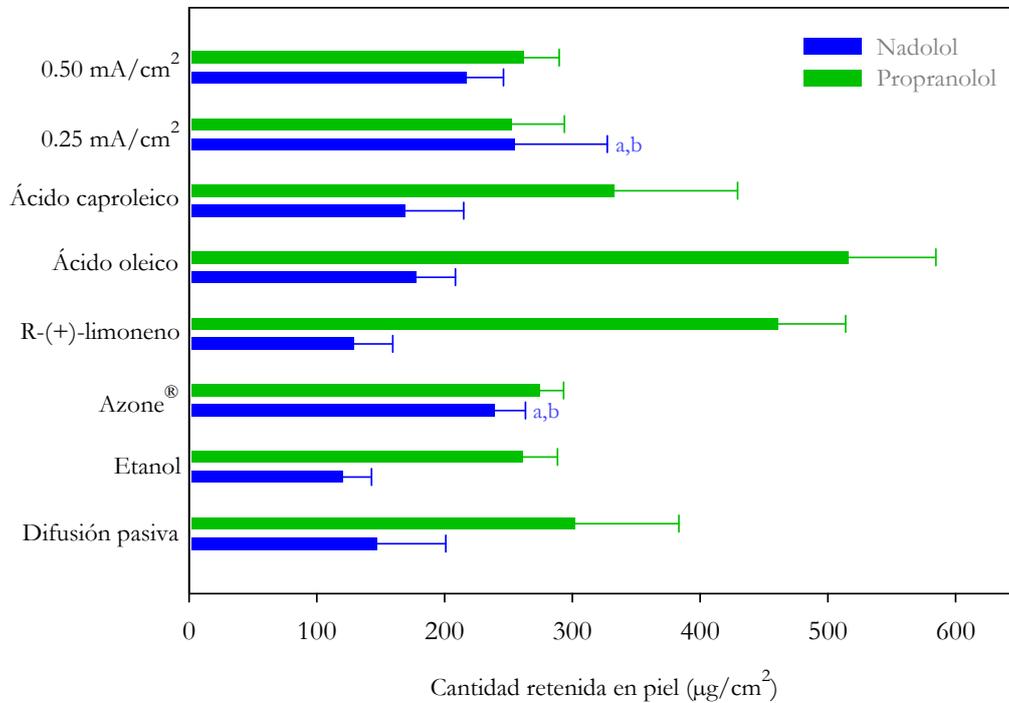


Figura 38. Comparación de las cantidades de nadolol e hidrocloreuro de propranolol retenida en piel de cerdo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) para las condiciones ensayadas. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Valor medio \pm D.E. ($p < 0.05$).

^a diferencia estadísticamente significativa respecto al control (difusión pasiva).

^b diferencia estadísticamente significativa respecto al vehículo etanol.

Diversos autores han estudiado la relación existente entre la lipofilia y peso molecular de estos fármacos beta-bloqueantes y su penetración percutánea. Schoenwald y Huang compararon la permeabilidad de 12 beta-bloqueantes agrupados en categorías según lipofilia a través de tejido corneal (Schoenwald y Huang, 1983). Posteriormente, otro estudio con cuatro beta-bloqueantes (bupranolol, propranolol, oxprenolol y acebutolol) efectuó determinaciones similares a través de mucosa bucal de cerdo (Le Brun y col., 1989). Existen numerosos análisis que investigan las diferencias en la permeabilidad de diversos beta-bloqueantes a través de piel de ratón sin pelo (Ghosh y col., 1993), intestino (Sasaki y col., 1994) y piel humana abdominal (Modamio y col., 2000). Todos ellos coinciden en mostrar que el propranolol es el beta-bloqueante que presenta mejor difusión pasiva, por su mayor lipofilia.

Tal como se plasma en la figura 32, por difusión pasiva el propranolol atraviesa la piel con mayor facilidad aunque como se observa en la figura 38 también se acumula en mayor cantidad en piel. El propranolol es más lipófilo ($\log P$ 3.03) y además presenta un peso molecular (295.8 g/mol) menor que el nadolol ($\log P$ 1.20; 309.4 g/mol) por lo que, como cabría esperar, atraviesa mejor la piel ya que su reparto es mayor entre los lípidos intercelulares del estrato córneo. Los resultados expuestos en este capítulo IV ponen de manifiesto que el propranolol presenta un parámetro de reparto (KH) aproximadamente 4 veces mayor que el nadolol en la condición experimental de difusión pasiva.

Como se puede observar en la figura 32, las sustancias estudiadas como promotores químicos producen efectos desiguales según el fármaco estudiado.

Por una parte, y a pesar de que ha sido descrito que el etanol a altas concentraciones puede reducir la absorción transdérmica de distintos compuestos debido a la capacidad que posee de deshidratar la piel (Thomas y Panchagnula, 2003), la escasa solubilidad del ácido oleico, ácido caproico, R-(+)-limoneno y el Azone[®], obligó a preparar las soluciones de los promotores ensayados en etanol absoluto en el que solubilizaban perfectamente. Por tanto, la concentración utilizada en las soluciones de tratamiento de los promotores de absorción transdérmica se fijó al 5%, considerando que la capacidad de promoción de los mismos depende de la concentración (Borrás-Blasco y col., 1997; López y col., 2000; Moghimi y col., 1998). Sin embargo, el efecto promotor no aumenta proporcionalmente con la concentración, sino que tiende a alcanzar un nivel máximo de promoción (Borrás-Blasco y col., 2004), o incluso, en algunos casos, se produce una reducción de la capacidad promotora del compuesto al incrementar la concentración del mismo. Además, cuando se utilizan este tipo de compuestos *in vivo*, concentraciones altas de promotor pueden causar problemas como irritación de la piel o toxicidad (Kanikkannan y Singh, 2002; Okabe y col., 1990).

En la figura 30 se observa como el vehículo utilizado, el etanol, incrementa aproximadamente 2.5 veces el flujo transdérmico del nadolol. Sin embargo, éste provocó una disminución del flujo del propranolol como puede observarse en la figura 31. Estudios previos muestran que altas concentraciones de etanol no mejoran un flujo transdérmico pasivo provocando perfiles en meseta (Borrás-Blasco y col., 2004), e incluso una reducción de las cantidades acumuladas en el compartimento receptor como sucede con el propranolol. Una posible explicación es la evaporación del etanol con la consecuente

pérdida de efectividad. Este hecho se describe en otros estudios como por ejemplo en un ensayo reciente en humanos con un corticosteroide (Ibrahim y Li, 2009).

Los resultados obtenidos confirman por una parte la capacidad que tiene el etanol para penetrar a través del estrato córneo (Berner y col., 1989; Berner y Liu, 1995) y difundirse uniformemente en él (Elkhyat y col., 2001), alterar la organización de los lípidos intercelulares incrementando la permeabilidad de la piel (Megrab y col., 1995) y además modificar las propiedades de solubilidad del fármaco en la piel.

De las sustancias estudiadas como promotores de absorción es el Azone[®] el que ha mostrado ser más eficaz para el nadolol, ya que provoca un aumento de flujo en piel de cerdo de 7.18 veces respecto al control y 2.61 veces respecto al etanol (vehículo). Éste también provocó incremento de flujo en el propranolol (1.74 y 1.91 respecto control y etanol, respectivamente) siendo el segundo promotor químico que más incrementó el paso a través de la piel de cerdo. Este compuesto fue diseñado para ejercer de promotor transdérmico y es eficaz para todo tipo de sustancias, hidrófilas y lipófilas (Sugibayashi y col., 1992) tales como esteroides, antibióticos, antivirales, péptidos como la insulina o vasopresina (Afouna y col., 2003, López-Cervantes y col., 2006), el antineoplásico 5-fluorouracilo (Williams, 2003), un antagonista no competitivo de receptores NMDA llamado memantina (del Rio Sancho y col., 2012), el antioxidante esculetina (del Rio Sancho y col., 2013) así como antidepresivos como el lorazepam y clonazepam (Puglia y col., 2001) y ansiolíticos como el alprazolam (Soler y col., 2012). Su mecanismo de acción se centra en su capacidad de alterar la estructura organizada de lípidos del estrato córneo y además incrementa el reparto de fármaco en la piel (López y col., 2000). Algunos autores establecen que el laurocapram al penetrar en los espacios intercelulares provoca la creación de puentes de hidrógeno con moléculas adyacentes creando nuevos espacios intercelulares (Kanikkannan y col., 2000; Hadgraft y col., 1996; Pilgram y col., 2001). Este hecho puede explicar por qué la cantidad de nadolol en piel al finalizar los experimentos es casi 2 veces superior a la obtenida sin pretratamiento ($p < 0.05$), como se observa en la tabla 33. El propranolol debido a su naturaleza lipófila se retiene por difusión pasiva casi el doble que el nadolol, no mostrando diferencias significativas en la cantidad retenida en piel tras el pretratamiento con Azone[®].

Respecto al efecto promotor del R-(+)-limoneno, no fue capaz de aumentar la absorción del nadolol (fármaco hidrófilo) respecto a la difusión pasiva, pero sí la del

propranolol (fármaco lipófilo) con casi el doble de flujo respecto a su control y el etanol (vehículo). Estos datos están en concordancia con resultados obtenidos en otros estudios realizados por el grupo de investigación en piel de cerdo. Así, se observó que el R-(+)-limoneno no produjo promoción en el paso de la esculetina (log P 1.2) [el flujo transdérmico por difusión pasiva fue $0.33 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ y con promotor $0.23 \pm 0.09 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$] (del Rio Sancho y col., 2013). Sin embargo, este promotor químico aumentó el flujo de la memantina (log P 3.3), fármaco de lipofilia similar al propranolol, casi 13 veces respecto a la difusión pasiva [$7.10 \pm 1.50 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (control) y $91.9 \pm 8.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ con promotor químico] (del Rio Sancho y col., 2012) e incrementó aproximadamente 3 veces el flujo transdérmico el pizotifeno malato (log P 5.2) [$1.63 \pm 0.76 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (control) y $4.73 \pm 1.31 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ con promotor] (datos aún no publicados). Algunos autores han descrito una cierta relación estructura-actividad fármaco-específica para los terpenos (Moghimi y col., 1998; Ota y col., 2003; Williams y Barry, 1991) y se establece que su mecanismo de acción se relaciona con la interrupción de la organización lipídica del estrato córneo (Sapra y col., 2008). De acuerdo con ella, se esperaría que un terpeno hidrocarbonado como es el R-(+)-limoneno proporcionara un efecto promotor mayor en el fármaco más lipófilo (El-Kattan y col., 2001; Godwin y Michniak, 1999; Hori y col., 1992; Okabe y col., 1989; Panchagnula y col., 2004). Estos resultados apoyan que existe una relación entre la lipofilia del fármaco a promover con el terpeno. Estudios previos con el propranolol muestran resultados similares a los obtenidos con el limoneno en el presente trabajo (Hori y col., 1992; Zhao y Singh, 1999).

El pretratamiento con R-(+)-limoneno no implica sin embargo una mayor acumulación de fármaco en piel en relación con el control ($p > 0.05$) (tablas 33 y 43). Por este motivo, podemos concluir que este compuesto incrementa la difusión del fármaco a través de la piel, pero no afecta al reparto del mismo en el tejido.

Los ácidos grasos han sido ampliamente estudiados como promotores químicos de la absorción transdérmica. Además, forman parte de los lípidos del estrato córneo. De todos ellos, se seleccionaron, para nuestros experimentos, dos compuestos monoinsaturados, uno con una estructura molecular grande, de 18 átomos de carbono, el ácido oleico (ácido 9-octadecenoico) y un compuesto con una estructura molecular más pequeña, de 10 carbonos, el ácido caproleico (ácido 9-decenoico). Algunos autores han descrito cierta correspondencia estructura-actividad fármaco-específica para los ácidos grasos (Andega y col., 2001; Kanikkannan y col., 2000; Klimentová y col., 2006; Mittal y col., 2009;

Zhang y col., 2010). Esta relación parece indicar que los ácidos grasos de cadena corta aumentan la permeación de las sustancias lipófilas por perturbación de la organización del estrato córneo, mientras que los de cadena larga incrementarían el paso de fármacos hidrófilos. La naturaleza del solvente y el tipo de cadena juegan un papel importante en la interacción del ácido graso con los lípidos intercelulares del estrato córneo (Wang y col., 2005^b). De acuerdo con esta hipótesis y en el caso del propranolol, el mayor efecto promotor esperado sería para el ácido caproico y en el caso del nadolol, el ácido oleico.

Tal como muestran la figuras 30, 31 y 32, el ácido caproico no incrementa significativamente la permeación de ambos beta-bloqueantes. No obstante, el ácido oleico incrementa significativamente el flujo del nadolol e hidrocloreuro de propranolol a través de la membrana de estudio, respecto al control y el vehículo, siendo el segundo promotor químico más eficaz para el nadolol y el tercero para el propranolol. El ácido oleico es capaz de incorporarse en los lípidos del estrato córneo alterando su estructura de empaquetamiento ordenado y las capas de hidratación, facilitando la entrada de fármacos. Asimismo se ha descrito que, a elevadas concentraciones, el ácido oleico puede existir como una fase separada entre las bicapas lipídicas (Ongpipattanakul y col., 1991; Tanojo y col., 1997), inrrumpiendo en los lípidos y disminuyendo la resistencia al paso de fármacos (Hoopes y col., 2011; Rowat y col., 2006). Otro modo de acción postulado es la generación de poros en la superficie de los corneocitos epidérmicos (Touitou y col., 2002). Los resultados conseguidos confirman que el ácido oleico puede ejercer un efecto promotor sinérgicamente junto con el etanol, tal como han propuesto otros autores (Aboofazeli y col., 2002). En las condiciones de trabajo, la interacción entre el ácido oleico y las estructuras de la piel se traduce también en un mayor reparto del nadolol e hidrocloreuro de propranolol en la piel, resultando en una cantidad de fármaco retenido tras los ensayos 1.21 y 1.71 veces la cantidad observada en el control del nadolol y propranolol respectivamente (véase tablas 33 y 43).

Por otra parte, la iontoforesis genera variaciones muy apreciables en el flujo transdérmico y las cantidades acumuladas en el compartimento receptor de ambos beta-bloqueantes (véase las figuras 35-37). Los estudios transdérmicos con aplicación de iontoforesis se han realizado utilizando un método para intentar eliminar al máximo la competición de iones. Para ello se ha utilizado un tercer compartimento ajeno al compartimento dador, unido a éste con puentes salinos. Ambos fármacos han sido estudiados a la misma concentración inicial (6 mg/mL). Sin embargo, esto no debe de ser

una variable importante a considerar ya que ha sido predicho el efecto prácticamente despreciable de la concentración de principio activo (Kasting y Keister, 1989) y con posterioridad ha sido confirmada experimentalmente (Padmanabhan y col., 1990). De este modo, según Kasting y Keister, los flujos por iontoforesis en ausencia de co-iones competidores dependen únicamente de la proporción entre la difusividad del contraión, es decir el ión que acompaña una especie iónica y mantiene la neutralidad eléctrica (en este caso, el ión cloruro que llega desde el otro lado de la piel) y el principio activo (Kasting y Keister, 1989). Resultados similares se han descrito para otros fármacos como la hidromorfina y la lidocaína (Marro y col., 2001^e).

Es importante recordar que esta competición por transportar la carga con los contraiones endógenos no puede ser eliminada en una situación *in vivo*. Así pues, existirá un número de transporte máximo para cada ión que deberá ser identificado de manera experimental en cada caso. Cabe esperar que este valor óptimo de número de transporte dependa de las propiedades físico-químicas específicas de cada ión. Así pues, un estudio realizado por Mudry y sus colaboradores concluye que el principal inconveniente en el transporte iontoforético a través de piel es la presencia de iones Cl⁻ endógenos aunque determina una máxima eficiencia del proceso entre el 60-80% para fármacos cargados positivamente (Mudry y col., 2006).

La influencia de la densidad de corriente sobre los flujos transdérmicos de los fármacos estudiados es clara, y asimismo ha sido observado por otros autores en diversos estudios transdérmicos (Delgado-Charro y col., 1995^b; Femenía-Font y col., 2005^a). De esta manera y a la vista de los resultados plasmados en la figura 39, se puede modular el flujo de un fármaco por iontoforesis manipulando la densidad de corriente.

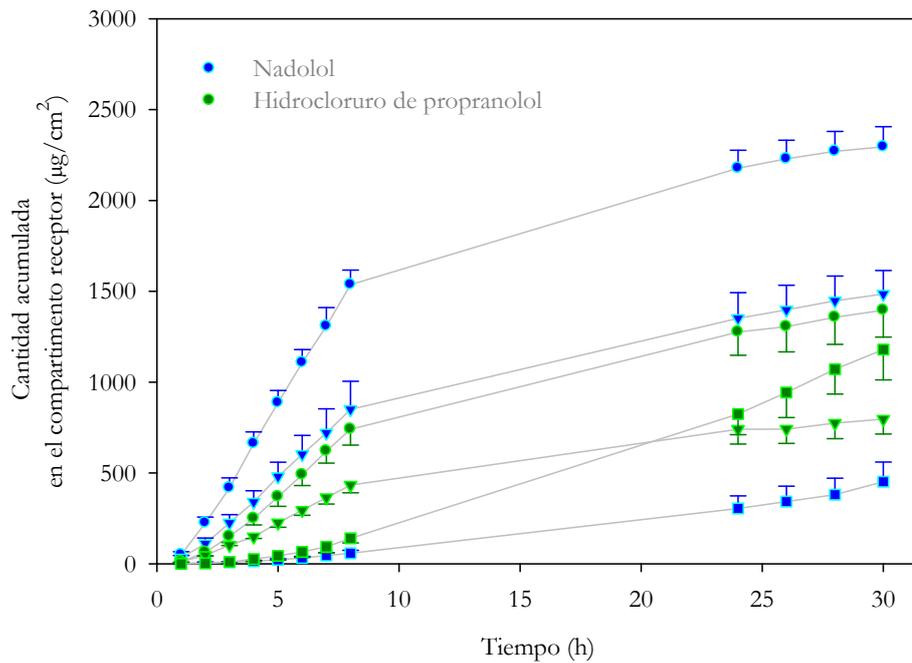


Figura 39. Cantidades acumuladas medias de nadolol e hidrocloreuro de propranolol en el compartimento receptor ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo (h) para las siguientes condiciones ensayadas: 0.50 mA/cm² (○), 0.25 mA/cm² (▽) y difusión pasiva (□). Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Las cantidades acumuladas de nadolol en el compartimento receptor aumentan considerablemente, existiendo diferencias estadísticas respecto al control ($p < 0.05$) en ambas densidades de corriente y con ello se incrementa su flujo transdérmico. En el caso del hidrocloreuro de propranolol, sucede un incremento importante respecto a su difusión pasiva en ambas densidades de corriente pero solo la densidad de corriente de 0.50 mA/cm² provoca diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Esto es debido a las características físicoquímicas de los fármacos, el propranolol es más lipófilo ($\log P$ 3.03) que el nadolol ($\log P$ 1.20) por lo que, como cabría esperar, difunde con mayor facilidad en los lípidos intercelulares del estrato córneo. Por ello se obtienen cantidades acumuladas en el compartimento receptor a lo largo del tiempo superiores en difusión pasiva al final de los experimentos iontoforéticos.

Posteriormente, al interrumpir la corriente eléctrica, los fármacos se absorbieron por difusión pasiva hasta las 30 horas, de ahí que se obtengan cinéticas aparentemente en meseta. No obstante, en el período post-iontoforesis existen diferencias estadísticamente significativas entre los flujos en el estado estacionario alcanzados por medio de difusión pasiva y los obtenidos en el tramo 8-30 h al aplicar iontoforesis, a cualquiera de las

densidades de corriente ensayadas para el nadolol (véase figuras 35 y 36). Este hecho puede atribuirse a la cantidad de fármaco que se queda acumulado en la piel y por tanto produce una especie de reservorio que mantiene una difusión pasiva constante hasta la finalización de los estudios (30 h) o al hecho que tras el cese de la corriente eléctrica en el compartimento dador hay presente todavía fármaco que puede difundir. Sin embargo, no sucede lo mismo con el propranolol donde la iontoforesis no produce cambios significativos que provoquen una difusión pasiva post-iontoforesis importante, hecho que podría ser relacionado a que la cantidad retenida en piel del hidrocloreto de propranolol es inferior al obtenido sin aplicación del método físico (véase tabla 43) ya que éste presenta una naturaleza mucho más lipófila que su análogo beta-bloqueante.

Cuando se aplica iontoforesis un punto de especial relevancia es el grado de ionización de la molécula. Con la pequeña diferencia que existe entre los valores de pK_a de los dos beta-bloqueantes, el propranolol presenta un valor (9.45) ligeramente inferior que el nadolol (9.67), y dado que se trabajó a pH fisiológico (7.4), en ambos casos el grado de ionización fue prácticamente de 100%. No obstante, aunque los pesos moleculares son similares, 309.4 g/mol en el caso del nadolol y 295.8 g/mol el hidrocloreto de propranolol, sí existe diferencia en la lipofilia. Previamente se ha presentado un modelo teórico (Kontturi y Murtomäki, 1996), que se podría utilizar para predecir la eficacia de la iontoforesis en el paso transdérmico de un fármaco en particular. El parámetro crucial en este modelo fue el coeficiente de reparto octanol/agua del fármaco y se propuso que existen dos vías que compiten en el estrato córneo: una vía acuosa utilizada por las moléculas hidrófilas y polares, y una vía lipídica para moléculas lipófilas y no polares. Posteriormente, Hirvonen y colaboradores verificaron dicho modelo empleando tres beta-bloqueantes de diferente lipofilia; sotalol, timolol y propranolol. Tras este estudio, se reforzaron las predicciones establecidas por el modelo teórico cuya esencia era el supuesto obvio de que solamente el flujo del fármaco más hidrófilo, el sotalol, que fluye a través de la vía acuosa puede mejorarse mediante iontoforesis debido a que la matriz lipídica inhibe la formación de iones móviles necesarios para la corriente eléctrica. Dicho trabajo determinó a la iontoforesis como la estrategia que incrementa más el flujo transdérmico del fármaco más hidrófilo, sotalol, y perjudica el paso a través de la piel del más lipófilo, el propranolol (Hirvonen y col., 1998).

El flujo por iontoforesis de un ión está relacionado con su número de transporte. Este viene dado por la relación entre la carga que transporta este ión y la carga total

transportada durante el proceso (Helfferich, 1995; Phipps y Gyory, 1992). En los experimentos descritos en este capítulo, los cationes nadolol e hidrocloreuro de propranolol compiten con los co-iones (iones sodio) presentes en pequeña proporción en la cámara anódica tanto como con los aniones endógenos (posiblemente Cl⁻, en el caso más simple) que llegan desde el otro lado de la membrana. El flujo de ambos beta-bloqueantes por iontoforesis viene dado por la ecuación 4 (Capítulo II).

Con el fin de explicar el resultado obtenido en la iontoforesis de ambos fármacos, se calculó el número de transporte de cada uno de los fármacos en cada condición. Para ello se consideraron los flujos transdérmicos individuales obtenidos para cada una de las células ensayadas. Los valores medios del número de transporte obtenidos en cada condición se muestran en la tabla 44.

Número de transporte del nadolol e hidrocloreuro de propranolol		
Fármaco	Condición	Número de transporte (%) (Media ± D.E.)
Nadolol	Iontoforesis 0.25 mA/cm ²	2.37 ± 0.42
	Iontoforesis 0.50 mA/cm ²	2.39 ± 0.10
Hidrocloreuro de propranolol	Iontoforesis 0.25 mA/cm ²	1.30 ± 0.16
	Iontoforesis 0.50 mA/cm ²	1.18 ± 0.10

Tabla 44. Número de transporte del nadolol e hidrocloreuro del propranolol (expresado en porcentaje) para la aplicación de iontoforesis en diferentes densidades de corriente eléctrica (0.25 y 0.50 mA/cm²) (Media ± D.E.).

Tal y como se detalla en la tabla 44, el número de transporte de ambos beta-bloqueantes es diferente siendo mucho más bajo el del hidrocloreuro de propranolol, es decir, a igual concentración de iones en la solución dadora, la fracción de carga eléctrica transportada por el nadolol es superior a la transportada por el hidrocloreuro de propranolol, de ahí que los flujos del propranolol sean menores. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos por otros autores (Lopez y col., 2003^b; Pikal, 1990; Pikal, 1990; Pikal, 1990; Santi y Guy, 1996^a; Santi y Guy, 1996^b).

Al finalizar cada experimento de difusión transdérmica con aplicación de 8 horas de iontoforesis, tal y como se ha descrito en el epígrafe 2.9 del presente capítulo, se extrajo la

cantidad de fármaco retenida en piel. Los resultados de cantidades retenidas en piel tras aplicación de las diferentes densidades de corriente ensayadas se detallan junto al resto de cantidades retenidas en las tablas 33 (nadolol) y 43 (hidrocloruro de propranolol).

La cantidad retenida en piel del nadolol en difusión pasiva es de $147 \pm 54 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Media \pm D.E., $n=22$). Tras las aplicaciones de densidades de corriente de 0.25 y 0.50 mA/cm², las cantidades retenidas se incrementaron respecto a la difusión pasiva 1.75 y 1.48 veces, respectivamente. Sin embargo, solo presentó diferencias estadísticas ($p<0.05$) la menor densidad de corriente.

Por otra parte, la difusión pasiva del hidrocloruro de propranolol provoca una retención en la piel de $302 \pm 81 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Media \pm D.E., $n=12$). En este caso y con la aplicación de iontoforesis, la cantidad retenida de propranolol en la piel fue menor, aproximadamente de $260 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de fármaco con ambas densidades de corriente.

El propranolol atraviesa la piel por difusión pasiva mejor que el nadolol por su naturaleza más lipófila con su consecuente acumulación en piel y la aplicación de iontoforesis provoca un incremento de las cantidades acumuladas en el compartimento receptor sólo en las primeras 8 horas que tras su cese se asemeja al pasivo. Asimismo, tras la iontoforesis las cantidades retenidas en piel no presentan diferencias estadísticas ($p>0.05$) respecto al control. Sin embargo, en el caso del nadolol, la iontoforesis incrementa 8.15 y 14.8 veces el paso de fármaco respecto a la difusión pasiva, siendo mayor su retención en piel. Una explicación posible es la creación de poros en los lípidos del estrato córneo cuando se aplica iontoforesis (Fatouros y col., 2006) hecho que provocaría la retención de fármaco en la piel. Ante un fármaco hidrófilo como el nadolol, la aplicación de corriente eléctrica incrementa su flujo por la creación de poros "camino" en la piel generando a su vez una mayor acumulación de nadolol en la piel de cerdo.

Así pues, aunque en el presente trabajo se manifiesta que el Azone[®] y ácido oleico son las sustancias químicas que mayor efecto promotor han desarrollado en el nadolol y, el R-(+)-limoneno con el hidrocloruro de propranolol, se corrobora que la iontoforesis es un método físico más eficaz para promover el paso de moléculas lipófilas e hidrófilas. No obstante, el hecho de aplicar esta estrategia física no produce el mismo efecto. La iontoforesis genera flujos transdérmicos en el propranolol inferiores [$61.6 \pm 7.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (0.25 mA/cm²) y $108 \pm 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (0.50 mA/cm²)] al nadolol [$120 \pm 21 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (0.25 mA/cm²) y $216 \pm 11 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (0.50 mA/cm²)], mostrando diferencias estadísticamente

significativas entre ambos fármacos ($p < 0.05$). Estos resultados expresan el gran efecto promotor que provoca la aplicación de corriente eléctrica durante 8 horas para el nadolol en la que existe una eficacia sobretodo con la densidad de corriente superior 0.50 mA/cm^2 .

Capítulo V

Dermatofarmacocinética del nadolol e hidrocloreuro de propranolol

1. Introducción

El estrato córneo se considera la principal barrera e incluso el factor limitante, en el caso de moléculas muy hidrófilas, que controla la velocidad de entrada de xenobióticos en la piel. Por lo tanto, durante las últimas décadas ha existido un enorme interés en el uso de técnicas que permitan caracterizar un comportamiento cinético en la administración de fármacos a través de esta capa y determinar la biodisponibilidad en el tejido diana (Alberti y col., 2001^a; FDA, 1998; Shah y col., 1998). La dermatofarmacocinética, es decir farmacocinética aplicada al estrato córneo, puede calcularse a través del *tape-stripping*, técnica mínimamente invasiva que consiste en la aplicación de tiras adhesivas y su retirada secuencial, para localizar el fármaco en el estrato córneo y determinar los parámetros cinéticos (Alberti y col., 2001^a; Bommannan y col., 1990; Lademann y col., 2009; Löffler y col., 2004; Lotte y col., 1993; Nicoli y col., 2009).

El trabajo que se describe en el presente capítulo pretende comparar perfiles de distribución *in vitro* del nadolol e hidrocloreuro de propranolol a través del estrato córneo, así como deducir los parámetros dermatofarmacocinéticos, tales como el reparto y la difusión, para completar la evaluación de la absorción transdérmica de ambos beta-

bloqueantes. Este trabajo se realizó en la University of Bath (Reino Unido) en el Department of Pharmacy & Pharmacology de la Faculty of Science de dicha Universidad.

Para ello se realizaron ensayos de difusión, similares a los expuestos en el capítulo anterior pero con una duración más corta en diferentes condiciones experimentales. Posteriormente, mediante la técnica del *tape-stripping* se cuantificó el nadolol e hidrocloreuro de propranolol en el estrato córneo. Debido a que las estrategias de promoción del paso de fármacos a través de la piel pueden comprometer la función barrera de la misma (Escobar-Chávez y col., 2008; Russell y col., 2008), se seleccionaron los promotores químicos de la absorción transdérmica: etanol, Azone[®], R-(+)-limoneno y el ácido oleico y el método físico iontoforesis, a las dos densidades de corriente (0.25 y 0.50 mA/cm²) que habían sido ensayadas previamente (capítulo IV). En todos los ensayos se utilizó piel de cerdo, membrana considerada como modelo animal razonable para la estimación *in vitro* de la absorción transdérmica en general (Marro y col., 2001^a; Meyer y col., 1978^a; Schmook y col., 2001) y la caracterización de la dermatofarmacocinética (Herkenne y col., 2006; Klang y col., 2012; Trebilcock y col., 1994).

2. Materiales y métodos

2.1. Fármacos ensayados

El nadolol y el hidrocloreuro de propranolol, de grado analítico y pureza del 99.0% (m/m) respectivamente, empleados en los diferentes estudios se obtuvieron de Sigma-Aldrich CO. (Gillingham, Dorset, Reino Unido).

2.2. Preparación de la piel

La piel de cerdo utilizada fue de origen dorsal y abdominal. La piel se lavó suavemente con agua fría después del sacrificio del animal en un matadero local. Posteriormente, se procedió a cortar la piel a 750 µm de grosor con ayuda de un dermatomo eléctrico, modelo Zimmer[™] Electric Dermatome suministrado por Zimmer Inc. (Dover, Ohio, Estados Unidos). El resultado de este proceso son porciones similares de

piel de espesor ($750\ \mu\text{m}$) y área ($\sim 9\ \text{cm}^2$). Estos fragmentos de piel se envasaron inmediatamente en sobres de Parafilm[®] M y fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

2.3. Células de difusión

Los células de difusión utilizadas en este trabajo, útiles tanto en los ensayos con promotores químicos como con iontoforesis, son una variante de células de flujo horizontal en las que los compartimentos dador y receptor están dispuestos uno al lado del otro y la piel se dispone en posición vertical (figura 40). El área útil de difusión de cada una de las células es de $3.801 \pm 0.053\ \text{cm}^2$ y sus compartimentos dador y receptor tienen unas capacidades aproximadas de 1.6 y 8 mL, respectivamente.

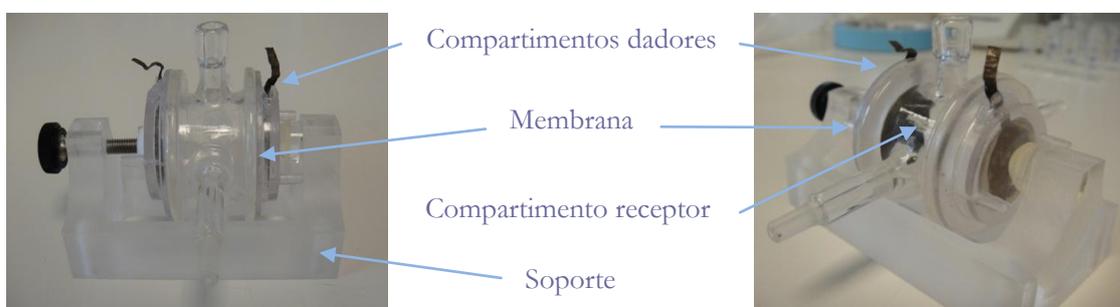


Figura 40. Célula de difusión con un área de permeación aproximada de $3.80\ \text{cm}^2$.

Estas células de difusión presentan dos compartimentos dadores con posibilidad de situar dos membranas de estudio comunicadas por una cámara central que es el compartimento receptor. Ambos compartimentos, dador y receptor, presentan forma cilíndrica. El receptor posee tres tubuladuras, dos laterales y otra superior, mientras que el dador tiene dos salidas. Ambas permiten la toma de muestras y la reposición del volumen muestreado en las diferentes fases. No obstante, para evitar pérdidas en los experimentos de difusión todas las conexiones al exterior permanecen cerradas con Parafilm[®] M o tubos de silicona sellados con pinzas.

Los 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 afuera, en contacto con el compartimento dador. El sistema completo se sitúa sobre un soporte de vidrio y se fija mediante un sistema de presión con un tornillo de dimensiones adecuadas.

2.4. Soluciones empleadas en los ensayos de difusión

La composición de las soluciones tamponadas empleadas para llenar el compartimento dador y receptor de las células de difusión, es similar al detallado en el Capítulo IV (tabla 22) aunque con alguna variación en las proporciones (NaCl:HEPES).

Composición de las fases			
	Fase dadora ⁽¹⁾ NaCl:HEPES (25:20 mM)	Fase dadora ⁽²⁾ NaCl:HEPES (50:20 mM)	Fase receptora NaCl:HEPES (150:20 mM)
Cloruro sódico (NaCl)	1.461 g	2.922 g	8.766 g
HEPES	4.766 g	4.766 g	4.766 g
Agua ultrapura c.s.p.	1000 mL	1000 mL	1000 mL

Tabla 45. Composición de las fases dadoras, ⁽¹⁾ en los ensayos de difusión pasiva y promotores químicos y ⁽²⁾ en los ensayos con iontoforesis y, receptoras utilizadas en los ensayos de permeación (pH 7.4).

Los componentes de las fases fueron suministrados por diferentes distribuidores: el cloruro sódico por Sigma-Aldrich CO. (Gillingham, Dorset, Reino Unido) y el HEPES (99.0% de pureza) por Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido).

Una vez preparadas las soluciones, se almacenaron en frascos topacio a 4°C hasta su utilización. Se comprobó su pH final, ajustándose en caso necesario a pH 7.4 con NaOH 1N (Fluka, Buchs, Suiza) o con HCl 1N (Acros, Geel, Bélgica).

Para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua ultrapura que se obtuvo a partir de un sistema Barnstead Nanopure Diamond™ de Barnstead International Inc. (Dubuque, Iowa, Estados Unidos) de una conductividad a 25°C de 18.2 MegaOhmios-cm.

2.5. Promotores químicos ensayados y sistema iontoforético

Las propiedades de los promotores químicos seleccionados se detallan en la tabla 23 del capítulo IV. El etanol, R-(+)-limoneno y ácido oleico fueron suministrados por Fluka (Buchs, Wendenberg, Suiza) mientras que el Azone® se obtuvo de Netqem (Durham, Carolina del Norte, Estados Unidos).

El sistema iontoforético consta de dos reservorios en los que se dispone un ánodo (+) y un cátodo (-). En los ensayos iontoforéticos con las celdas de difusión especificadas en el epígrafe 2.3 del presente capítulo, los compartimentos dadores actúan como electrodos ya que presentan depósitos de cloruro de plata (AgCl) y plata (Ag⁰). Este dispositivo se conecta a un generador de corriente eléctrica Kepco Power Supply, APH 1000 M (Kepco Inc.; Flushing, Nueva York, Estados Unidos) con el fin de cerrar el circuito.

2.6. Diseño de los ensayos de difusión transdérmica

Para determinar la cantidad de fármaco presente en el estrato córneo mediante la técnica *tape-stripping*, previamente se realizaron experimentos de absorción transdérmica, tanto del nadolol como hidrocloreuro de propranolol. En ambos casos se realizó:

1. Ensayos por difusión pasiva y con promotores químicos: etanol, Azone[®], R-(+)-limoneno y ácido oleico. Todos estos ensayos se realizaron en el interior de una habitación a temperatura controlada [32.2 ± 0.5 °C, n=5].
2. Ensayos con aplicación de iontoforesis a las densidades de corriente: 0.25 y 0.50 mA/cm². Éstos se realizaron a temperatura ambiente [24.0 ± 0.2 °C, n=10].

Puesto que el objetivo era realizar experimentos en las condiciones experimentales más similares a las descritos en el capítulo IV, el protocolo de preparación de los mismos fue muy similar.

Aproximadamente 30 minutos antes del inicio de los experimentos, se extrajeron del congelador de -20°C el número de porciones de piel necesarias para los mismos.

La piel descongelada, se situó, con el estrato córneo orientado hacia el compartimento dador entre este compartimento y el receptor. Si el ensayo tenía como finalidad estudiar la difusión pasiva o el efecto de los promotores químicos, una única porción de piel en uno de los extremos del compartimento receptor era suficiente. Sin embargo, en el caso de la iontoforesis, se requería de la presencia de dos porciones de piel con los estratos córneos hacia afuera en ambos extremos de la cámara receptora. Se introdujo un pequeño imán agitador en el compartimento receptor y a continuación se

procedió a la fijación de los compartimentos con ayuda del soporte y el sistema de presión de forma que quedasen ambos compartimentos alineados.

Cuando la finalidad fue estudiar el efecto de los promotores químicos, se procedió al pretratamiento de la piel con distintas soluciones en función del compuesto a evaluar. El protocolo seguido fue idéntico al descrito en el apartado 2.7 del capítulo IV.

Tras este tratamiento con promotores químicos, el siguiente paso fue idéntico en todos los ensayos. Se procedió al llenado de los compartimentos con fase receptora y un solo dador. El compartimento receptor de cada una de las células se completó con solución tamponada HEPES/NaCl (20/150 mM) a pH 7.4. En el compartimento dador se dispuso 1.6 mL de solución de nadolol o hidrocloreuro de propranolol con una concentración de 6 mg/mL (cantidad inicial en el dador ($Q_{i \text{ dador}}$) de 2526 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) preparada en la solución salina HEPES/NaCl (20/25 mM).

Las células se situaron sobre un multiagitador magnético (Variomag[®] Multipoint 6 Thermo H+P, Cole-Parmer, Reino Unido) tal y como se muestra en la figura 41a. Con el sistema en agitación constante, gracias al imán agitador que se colocó en el compartimento receptor, se logró la perfecta homogeneización de la fase receptora y se evitó la formación de capas estáticas de difusión en las proximidades de la membrana. A continuación, los compartimentos se sellaron con Parafilm[®] M evitando así cualquier pérdida posible por evaporación.

En los estudios con iontoforesis (figura 41b) se llenó el compartimento receptor con la solución tamponada HEPES/NaCl (20/150 mM) a pH 7.4 por una parte y los dos compartimentos dadores con diferentes soluciones. Considerando que ambos beta-bloqueantes son fármacos cargados positivamente, el compartimento dador que actúa como ánodo se llenó con 1.6 mL de solución tamponada HEPES/NaCl (20/50 mM) con el fármaco disuelto. El otro dador se rellenó con solución receptora para cerrar el circuito. La cantidad de NaCl necesario para que pase corriente durante el experimento depende de la intensidad de corriente que se aplique. Así pues, según la densidad de corriente aplicada, la cantidad de NaCl necesaria fue diferente: 6.22 mg (es decir, $1.06 \cdot 10^{-4}$ moles) de NaCl ($0.25 \text{ mA}/\text{cm}^2$) y 12.44 mg ($2.13 \cdot 10^{-4}$ moles) de NaCl ($0.50 \text{ mA}/\text{cm}^2$).

Los estudios de permeación se prolongaron 3 horas, trascurrido este tiempo se recogió la solución receptora y la piel se desmontó de la celda para después proceder a retirar el estrato córneo por *tape-stripping*.



Figura 41. (a) Células de difusión durante un ensayo de permeación pasiva. (b) Células en un experimento de iontoforesis. Todas ellas situadas sobre un multiagitador magnético que mantiene la fase receptora en agitación constante.

2.7. Técnica *tape-stripping*

Esta técnica consiste en eliminar sucesivamente las capas que forman el estrato córneo, capa más superficial de la piel. Tras finalizar cada ensayo de difusión, la piel fue retirada de la célula y se limpió con papel seco para intentar eliminar el exceso de solución dadora no absorbida y fase receptora. Posteriormente, mediante la ayuda de una plantilla circular (diámetro de 2.5 cm) se delimitó el área de piel a la cual se le aplicaría la técnica. Esta plantilla aseguró que todas las cintas adhesivas eliminasen estrato córneo en el mismo lugar.

Estudios previos han demostrado que las cintas adhesivas (Scotch Book Tape 845, 3M, St. Paul, Minnesota, Estados Unidos) empleadas en este trabajo no pierden masa tras la aplicación en la superficie de la piel, los fármacos se extraen fácilmente del estrato córneo adherido a la cinta, y los componentes adhesivos o de otro tipo no interfieren con el análisis químico del fármaco en la extracción del mismo (Nicoli y col., 2009; Wiedersberg y col., 2009^a; Wiedersberg y col., 2009^b). Además las cintas utilizadas poseen otras propiedades a considerar en dicha técnica como son su transparencia, que permite una cómoda detección visual del estrato córneo eliminado, flexibilidad, contienen adhesivo por una sola cara y son fáciles de manejar.

Cada cinta adhesiva, de 2.5 x 2.5 cm, fue aplicada en el mismo sitio de la piel, presionada uniformemente con la ayuda de un rodillo metálico (6 cm de ancho) para asegurar un buen contacto con la piel, y a continuación se retiró de la superficie de la piel con la ayuda de unas pinzas quirúrgicas (figura 42). Este procedimiento se realizó con 20 cintas adhesivas para cada porción de piel.

Para poder calcular el espesor del estrato córneo se determinó la masa de piel extraída en cada cinta adhesiva, por lo que éstas fueron pesadas antes y después de la retirada secuencial en una balanza de precisión con capacidad de lectura de 0.1 μg y rango de pesada de hasta 2.1 g (Sartorius SE2-F Ultra Micro balance, Epsom, Reino Unido). Así pues, conocida el área de difusión ($\sim 3.80 \text{ cm}^2$) y la masa del estrato córneo por diferencia de pesadas y, asumiendo que la densidad del estrato córneo tiene un valor de 1 g/cm^3 (Anderson y Cassidy, 1973; Kalia y col., 1996) fue posible calcular el espesor de estrato córneo extraído por cada tira adhesiva.



Figura 42. Fotografías ilustrativas de la aplicación y retirada de cada cinta adhesiva mediante la técnica *tape-stripping*.

Por otra parte, con el objetivo de garantizar y asegurar la integridad de la piel y su función barrera, tras la finalización de cada ensayo de difusión, se realizaron medidas de la pérdida transepidérmica de agua (TEWL) tras la retirada consecutiva de las cintas adhesivas. El intervalo de dichas medidas fue más espacioso al principio, cada 4-5 cintas y a partir de la décima cinta aproximadamente, las medidas se realizaron cada par de tiras retiradas ($n=9$).

Con el objetivo de poder determinar el espesor de estrato córneo eliminado (H , μm), se aprovecharon áreas de piel recién descongeladas de las mismas porciones de piel empleadas en los ensayos, en las que se retiró el estrato córneo por capas y se determinó TEWL ($n=20$). El equipo empleado para medir TEWL fue un evaporímetro AquaFlux

V4.7 (Biox Systems Ltd., Londres, Reino Unido) con un rango de medidas entre 0-100 g·m²h⁻¹ y una resolución ± 0.05 g·m²h⁻¹. Con el fin de obtener valores de pérdida transepidérmica de agua comparables y debido a la extrema sensibilidad de este equipo, se llevó a cabo un procedimiento estandarizado y se trabajó en condiciones de temperatura controlada (~22°C), las medidas se obtuvieron con una humedad relativa entre 45-65%, y evitándose corrientes de aire que pudieran alterar la medida. Para ello, se puso la sonda en contacto con la piel con precaución, evitando una presión excesiva de manera que la superficie cutánea estuviera siempre a la misma distancia de los sensores.

La pérdida de agua a través del estrato córneo se puede considerar que es debida a un proceso de difusión y por tanto se puede medir por medio de la primera ley de Fick de la difusión. A medida que el espesor de estrato córneo disminuye la pérdida de agua aumenta, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$TEWL = \frac{D \cdot K}{(H - x)} \Delta C \quad \text{Ec. 18}$$

donde **D** y **K** son respectivamente las constantes de difusión y reparto del agua en dos puntos fijos situados en la línea perpendicular a la superficie y en la zona de difusión respectivamente, **H** espesor del estrato córneo, **x** espesor de estrato córneo retirado con cada adhesivo y ΔC es el gradiente de concentración del agua. Asumiendo que la densidad del estrato córneo es ~1 g/cm³ (Anderson y Cassidy, 1973), se puede transformar la cantidad de estrato córneo eliminado en espesor del mismo (x).

El espesor del estrato córneo se puede obtener mediante la relación lineal existente entre la inversa de TEWL [(TEWL)⁻¹] y **x**, tal como se observa en la figura 43, ya que la intersección con el eje x permite obtener dicho valor (**H**) (Kalia y col., 1996).

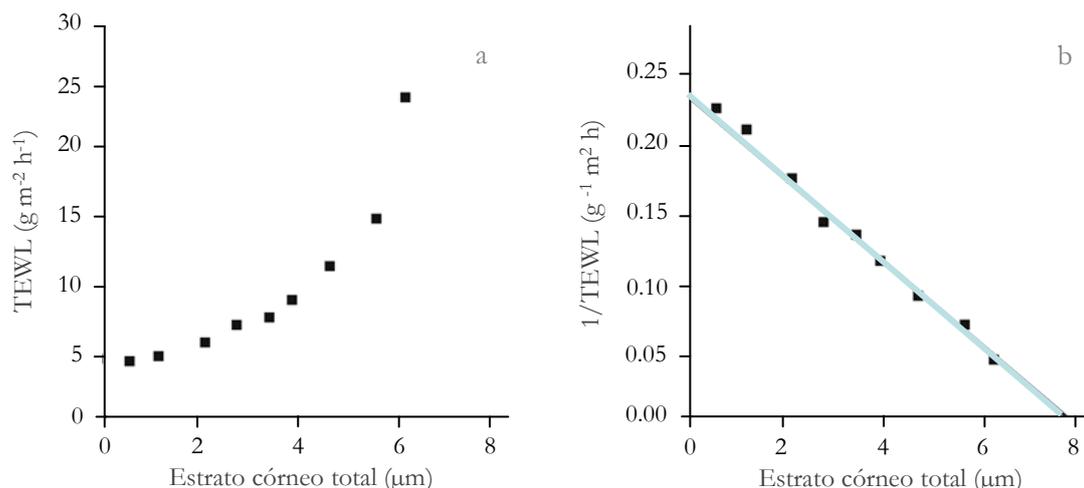


Figura 43. (a) Incremento progresivo de la pérdida transepidérmica de agua (TEWL) en función de la cantidad de estrato córneo eliminado (μm). (b) Relación lineal entre la inversa de TEWL y la cantidad de estrato córneo eliminado (μm). Figuras adaptadas (Herkenne y col., 2008^a).

No obstante, debido a la existencia ocasional de una meseta inicial en los datos TEWL que provoca errores en la exactitud de la linealidad, se empleó un modelo no lineal (Russell y col., 2008) en el que, (a) adapta los valores de TEWL *versus* espesor de estrato córneo eliminado, evitando los errores asociados de la inversa de TEWL, y (b) dispone de un parámetro adicional, base o B , para reflejar la meseta inicial de TEWL a pesar de la eliminación de las primeras capas de estrato córneo:

$$TEWL = B + \frac{D \cdot K}{(H - x)} \Delta C \quad \text{Ec. 19}$$

Por tanto, el estrato córneo eliminado con la técnica *tape-stripping* (H) fue calculado mediante el programa informático "GraphPad Prism 4.00" (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, Estados Unidos) a partir de las porciones de piel consideradas "control" sin contacto con fármaco. En todos los casos los parámetros estimados inicialmente fueron H y B (valor TEWL inicial sin la aplicación de la técnica *tape-stripping*).

A partir de esta información, todos los datos se pueden expresar de manera normalizada según la fracción de estrato córneo alcanzado (x/H), estrategia que permite comparar resultados de diferentes estudios e incluso sujetos [véase figura 44 (Kalia y col., 2000)].

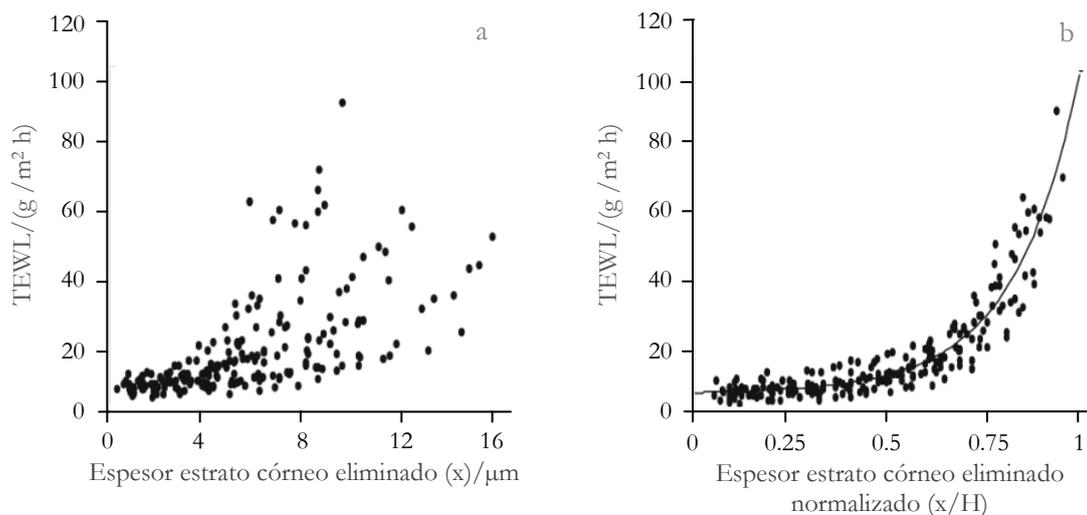


Figura 44. (a) Incremento de la pérdida transepidérmica de agua (TEWL) en función del espesor de estrato córneo eliminado (x) en la técnica *tape-stripping* ($n=20$). (b) Incremento de TEWL en función del estrato córneo eliminado (x) normalizado con el espesor de membrana (H) para cada porción de piel (desde 0 a 1). Figuras adaptadas (Herkenne y col., 2008^a).

Así pues, las concentraciones de fármaco pueden normalizarse para cada porción de piel y los perfiles de concentración del fármaco, obtenidos tras el análisis de las cintas adhesivas, pueden expresarse en función de una profundidad relativa de estrato córneo (desde 0 en la superficie de la piel hasta 1 que corresponde al límite más interior del estrato córneo) facilitando la comparación de los resultados.

2.8. Extracción y valoración de los fármacos desde las cintas adhesivas

Tras la realización del método descrito en el epígrafe 2.7 se procedió a la extracción de los beta-bloqueantes retenidos y a la cuantificación del estrato córneo presente en las cintas. Para ello, cada cinta adhesiva fue colocada en viales con 1 mL de solución orgánica ACN:H₂O de 75:25 (v/v) para el nadolol y 70:30 (v/v) para el hidrocloreuro de propranolol. Después de 16 h de agitación constante, el sobrenadante se pasó a través de un filtro Millipore® (Sigma-Aldrich CO., Dorset, Reino Unido) de 0.22 μm de diámetro de poro y después se procedió a su análisis en HPLC.

La validación del proceso de extracción consistió en escoger porciones de piel de cerdo de origen dorsal (750 μm) y practicar la técnica *tape-stripping* sin previo tratamiento con fármaco. Asimismo se cortaron cintas adhesivas cuyo objetivo era corroborar la no interferencia del adhesivo en el análisis de los beta-bloqueantes. En ciertas tiras adherentes,

con y sin piel, se dispusieron 50 μL de solución de nadolol (83.5 μM) e hidrocloreuro de propranolol (56.3 μM) que se dejaron secar al aire. La figura 45 esquematiza el proceso de validación. El rendimiento del proceso de extracción fue del $(90.2 \pm 4.1)\%$ para el nadolol y del $(85.4 \pm 1.5)\%$ para el hidrocloreuro de propranolol (Media \pm D.E., $n=5$).

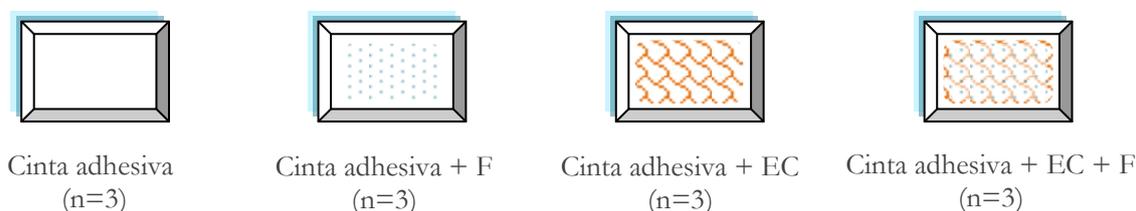


Figura 45. Proceso de validación de extracción del fármaco (F) desde la cinta adhesiva con y sin estrato córneo (EC).

Para el análisis de los fármacos de estudio se empleó un sistema Jasco de cromatografía líquido-líquido de alta eficacia (HPLC) constituido por una bomba isocrática de flujo para fase móvil Jasco PU-980 Intelligent, un autoinyector Jasco AS-1559 Intelligent Samples, un detector Jasco UV-975 Intelligent y un compartimento de columna con termostato a 25°C. La adquisición y procesado de los datos, así como la gestión de su instrumentación se realizó mediante el programa informático Chromeleon Software® (Dionex; Camberley, Reino Unido).

Las condiciones cromatográficas empleadas son las mismas que las descritas en el apartado 2.3.1 del capítulo III. Sin embargo, los componentes de las fases móviles fueron suministrados por diferentes proveedores. El amonio di-hidrógeno fosfato monobásico fue obtenido de Sigma-Aldrich CO. (Gillingham, Dorset, Reino Unido) y el acetonitrilo de grado analítico se obtuvo de Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido).

2.9. Análisis del perfil de distribución en el estrato córneo

A fin de estudiar la distribución en el estrato córneo de ambos beta-bloqueantes, tras la valoración cromatográfica de las muestras obtenidas, los perfiles de distribución del fármaco fueron expresados como concentración de fármaco en el estrato córneo C_x ($\mu\text{g}/\text{mg}$) donde μg es la cantidad de fármaco por mg de estrato córneo, en función de la profundidad relativa del mismo (x/H) en el que x es el espesor acumulado de estrato córneo y H el espesor absoluto expresado en μm .

Para el análisis se supone que el estrato córneo es una barrera homogénea y se asumen las siguientes condiciones del medio (figura 46):

1. Durante todo el ensayo, a $t > 0$ y $x = 0$ (superficie del estrato córneo): $C_F = K \cdot C_v$
2. El estrato córneo ($0 < x < H$) a tiempo cero ($t = 0$) no contiene fármaco ($C_F = 0$).
3. A $t > 0$ y $x = H$: $C_F = 0$.

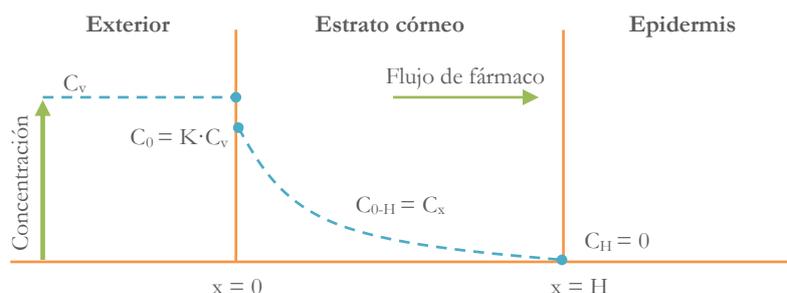


Figura 46. Perfil de concentración de fármaco (C_x) a través del estrato córneo cuando no se ha alcanzado el estado estacionario, asumiendo una concentración constante de fármaco en el vehículo, y unas condiciones "sink" en la capa más interna, la epidermis viable ($C_H = 0$). C_0 es la concentración de fármaco en la superficie más externa del estrato córneo, y K es el coeficiente de reparto vehículo/estrato córneo del fármaco.

Cuando los ensayos eran de difusión pasiva y con pretratamiento con promotores químicos, el perfil de concentración de los fármacos se ajustó a la solución apropiada de la segunda ley de difusión de Fick para el caso de transporte en un plano (Crank, 1975):

$$C_x = K C_v \left[1 - \frac{x}{H} - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \sin \left(n\pi \frac{x}{H} \right) \exp \left(-\frac{D}{H^2} n^2 \pi^2 t \right) \right] \quad \text{Ec. 20}$$

donde C_v es la concentración de fármaco en el vehículo, es decir en la fase dadora, K es el coeficiente de reparto del fármaco entre el estrato córneo y vehículo empleado, y D es el coeficiente de difusión en el estrato córneo, de espesor total H .

El cálculo de los parámetros de permeación se efectuó mediante el programa informático "GraphPad Prism 4.00" que permitió estimar K y D/H^2 (tiempo⁻¹). Este último es el parámetro de difusión considerado como la velocidad con que el fármaco atraviesa la piel. En términos dermatofarmacocinéticos, el parámetro reparto K refleja la afinidad relativa de la molécula entre el vehículo en el que se encuentra y el estrato córneo y se relaciona con el grado de absorción. Por tanto, estos parámetros deducidos de la ecuación

20 son relevantes para el estudio dermatofarmacocinético ya que estiman la tasa de absorción de los fármacos en la capa más superficial de la piel. No obstante, en el caso de los estudios con iontoforesis, los cálculos indicados no se han aplicado porque se alcanza el estado estacionario desde los primeros momentos de ensayo.

Por otra parte, mediante el método de los trapecios se calcularon las áreas totales bajo la curva (AUC) de las concentraciones del fármaco en función del espesor de estrato córneo normalizado. Dado que se asume que la densidad del estrato córneo es 1 g/cm^3 las unidades de AUC son de cantidad/volumen, representando la cantidad total de fármaco en el estrato córneo al final del ensayo de difusión.

Además, es interesante evaluar la cantidad total (A) de ambos beta-bloqueantes en estrato córneo en unidades de cantidad por unidad de superficie. Ésta se puede calcular con la siguiente ecuación:

$$A = AUC \cdot H \quad \text{Ec. 21}$$

Los parámetros K , D/H^2 , AUC y A permiten comparar la evolución en el estrato córneo de los fármacos nadolol e hidrocloreuro de propranolol en las diferentes condiciones ensayadas.

Los resultados se compararon mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Para determinar entre qué grupos existían diferencias estadísticamente significativas se realizó el test de comparaciones múltiples Bonferroni's.

3. Resultados y discusión

En un principio se estudió la duración a la cual se llevarían a cabo todos los estudios de absorción transdérmica *in vitro* del nadolol e hidrocloreuro de propranolol a través de piel de cerdo. Para ello, se consideraron relevantes los periodos de latencia obtenidos previamente en los ensayos de difusión pasiva que se muestran en las tablas 24 (nadolol) y 34 (propranolol) presentes en el capítulo IV.

Cuando el objetivo de un ensayo de permeación es determinar la cantidad de fármaco en el estrato córneo y su perfil de distribución en el mismo, la duración de dicho experimento no debe alcanzar el estado estacionario considerado casi tres veces el periodo de latencia ($\sim 2.7 t_0$) (Roberts y col., 1999). Así pues, de acuerdo con los tiempos de latencia se evaluó un rango entre 2 y 4 horas. Posteriormente, tras la observación de que las duraciones más prolongadas establecían perfiles más lineales por su cercanía a la condición de estado estacionario y que las más cortas (2 y 2.5 horas) presentaban concentraciones muy bajas con delicada y compleja cuantificación para la metodología empleada, así como perfiles de distribución no adecuados para el ajuste de la ecuación de Fick, se seleccionó la duración de 3 horas de exposición como tiempo idóneo para el cálculo de los parámetros dermatofarmacocinéticos.

Para obtener los perfiles de distribución en el estrato córneo se empleó piel de cerdo de espesor de 750 μm . Las características de la piel de cerdo hacen que sea un modelo animal válido para estimar *in vitro* la difusión transdérmica de fármacos en piel humana y aplicar la técnica descrita (Klang y col., 2012; Marro y col., 2001^a; Meyer y col., 1978^a; Schmoock y col., 2001; Trebilcock y col., 1994).

Debido a la existencia de numerosos factores que pueden influir en la cantidad de estrato córneo retirado en cada cinta adhesiva, tales como la hidratación de la piel, la composición del vehículo-fase dadora, la cohesión entre los corneocitos, y las diferencias interindividuales entre las porciones de piel, se normalizó el espesor para facilitar la comparación entre las distintas condiciones ensayadas. Por ello, con el objetivo de representar los perfiles de distribución de manera normalizada, se estimó el espesor total de estrato córneo ajustando la ecuación 19 a los datos de TEWL observado en función de la cantidad de estrato córneo retirado. No se pudo emplear para el cálculo el modelo lineal ya

que considera las propiedades "barrera" del estrato córneo como homogéneas, y no reflejó con exactitud los resultados experimentales.

Las figuras 47 y 48 muestran las mediciones TEWL consideradas "control" para la estimación del espesor del estrato córneo en dos ensayos, uno del nadolol y otro del hidrocloreuro de propanolol, obtenidos tras cada retirada de cinta adhesiva (n=20). Debido a que este tipo de gráficas empleadas para la obtención del espesor de estrato córneo eliminado (H) pueden considerarse ejemplos generalizables a todas las medidas TEWL "control" realizadas en este trabajo, no se mostrarán más dado que no aportan información relevante.

Como se observa en las gráficas que representan la inversa de TEWL (47b y 48b), existe una meseta inicial que se aleja de linealidad, por ello se ha utilizado un ajustado no lineal. Tal como se indica en diversos estudios, puede considerarse que la presencia de una meseta inicial seguida por una línea recta en declive es debido a la eliminación inicial de la capa más externa de estrato córneo que no proporciona una contribución significativa a la pérdida de agua (Choi y col., 2005; Corcuff y col., 2001) aunque sí representa un cambio significativo en masa.

En los casos representados en las figuras 47 y 48, el espesor de estrato córneo estimado (H) tras el ajuste de la ecuación 19 (figura c) fue $9.87 \pm 0.24 \mu\text{m}$, para un estudio con nadolol y $8.69 \pm 0.62 \mu\text{m}$ en otro con propanolol. Estos valores se han empleado para normalizar las concentraciones en el estrato córneo con el fin de poder comparar las diferentes condiciones ensayadas y obtener a su vez la cantidad total de fármaco en el estrato córneo ($A; \mu\text{g}/\text{cm}^2$) para cada ensayo según el espesor eliminado (H).

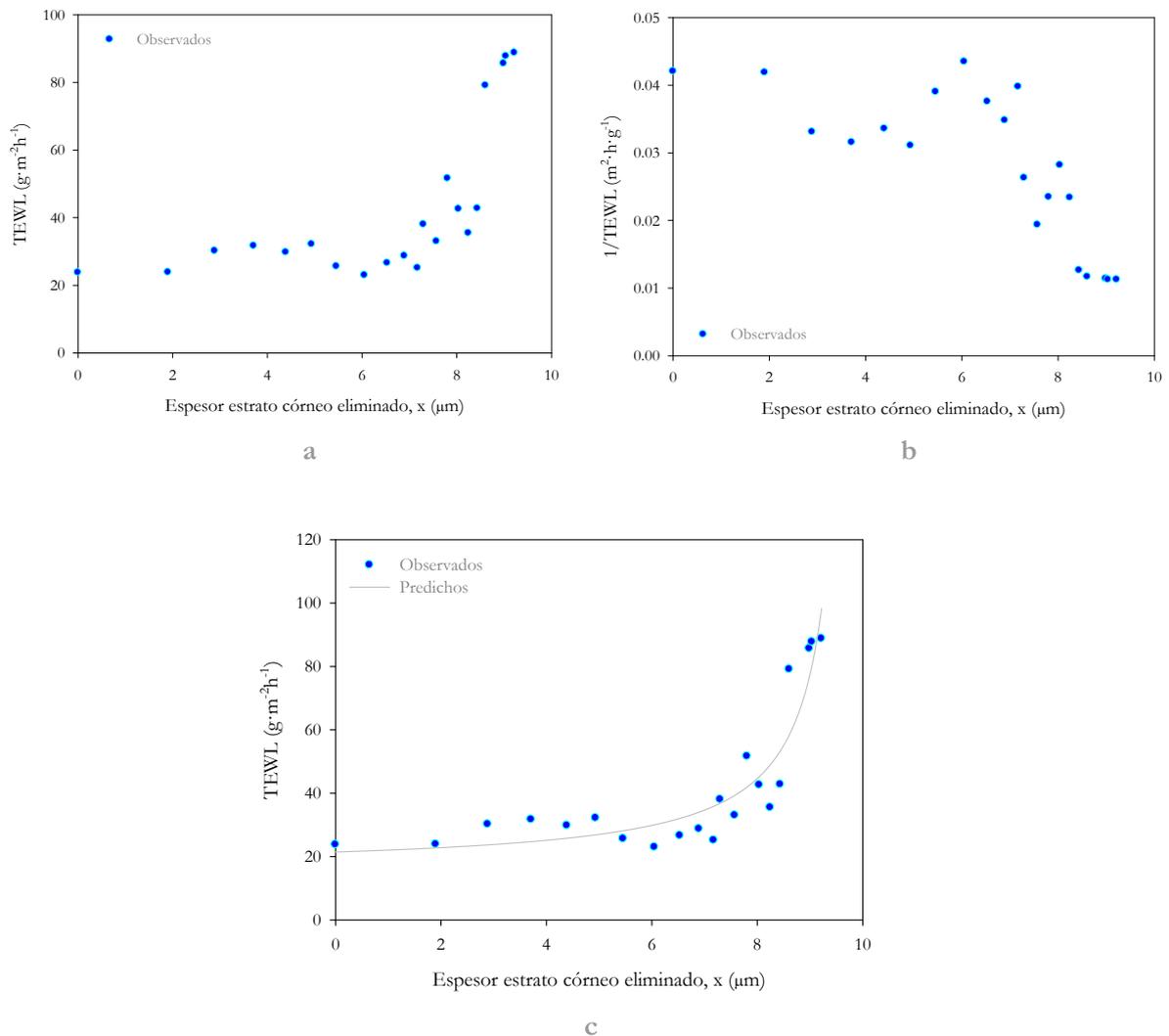


Figura 47. Estimación del espesor de estrato córneo eliminado. (a) Valores de la pérdida transepidérmica de agua (TEWL) en función del espesor de estrato córneo eliminado (x) con la técnica *tape-stripping* ($n=20$) realizado en la porción de piel empleada en los ensayos de difusión pasiva del nadolol. (b) Estimación del espesor de estrato córneo (H) por el método lineal ($1/\text{TEWL}$). (c) Estimación de H mediante la técnica no lineal. La línea corresponde al ajustado de los valores observados según la ecuación 20.

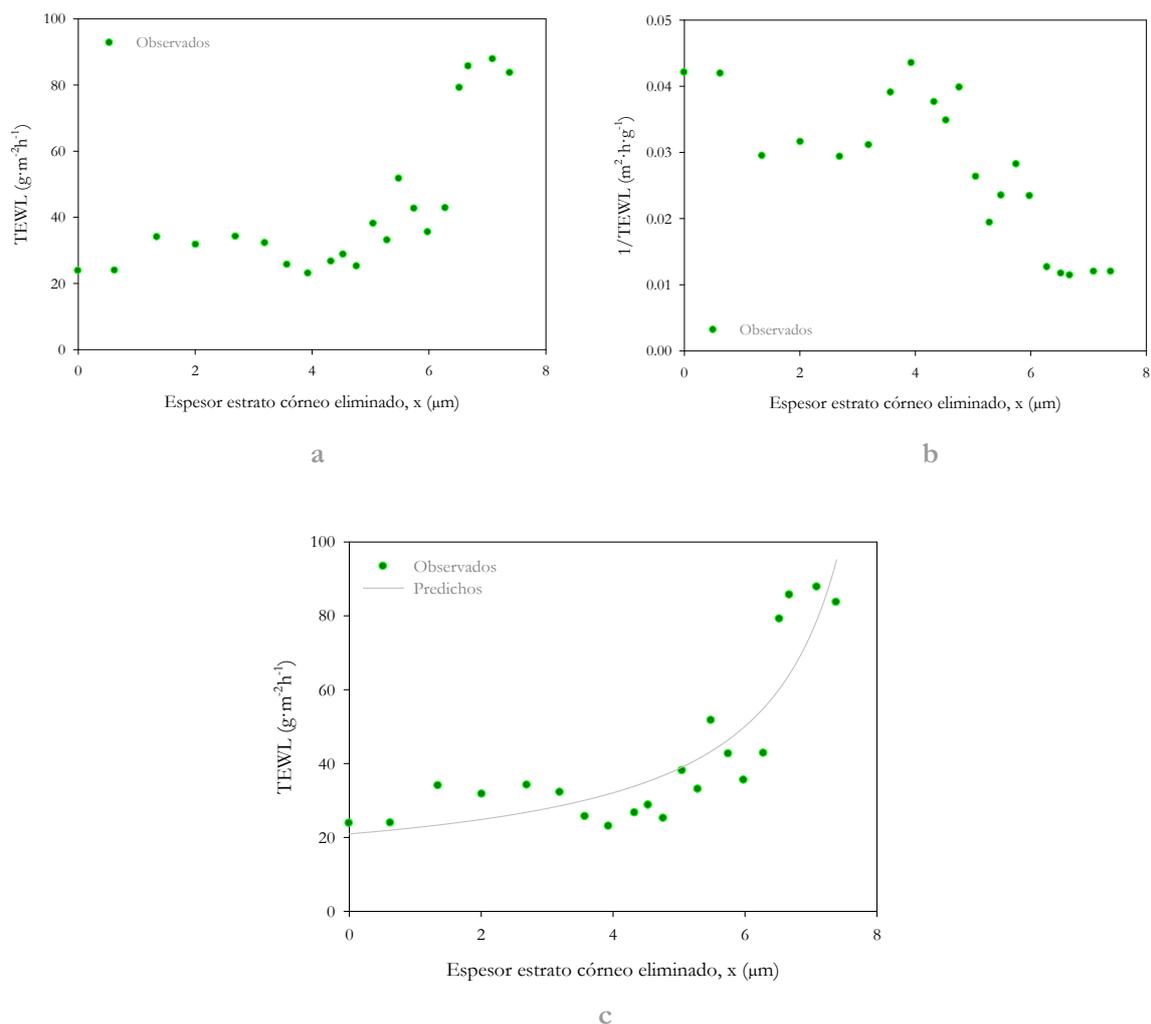


Figura 48. Estimación del espesor de estrato córneo eliminado. (a) Valores de la pérdida transepidérmica de agua (TEWL) en función del espesor de estrato córneo eliminado (x) con la técnica *tape-stripping* ($n=20$) realizado en la porción de piel empleada en los ensayos de difusión pasiva del hidrocloreto de propranolol. (b) Estimación del espesor de estrato córneo (H) por el método lineal ($1/TEWL$). (c) Estimación de H mediante la técnica no lineal. La línea corresponde al ajustado de los valores observados según la ecuación 20.

El espesor medio de estrato córneo retirado, calculado mediante la técnica *tape-stripping*, fue de $9.41 \pm 0.26 \mu\text{m}$ (media \pm D.E., $n=63$). Como previamente se ha comentado, la variabilidad observada puede atribuirse a las distintas porciones de piel utilizadas, la presión realizada previa a la retirada de cada cinta adhesiva, el tiempo de exposición de la piel en el ensayo así como el efecto del vehículo en esta capa (Alberti y col., 2001^a; Dreher, 2007; Tsai y col., 1991^a). Todos estos factores, junto al proceso de pesada de las tiras adhesivas antes y después de la técnica y el ajuste a la ecuación 19

correspondiente a la estimación del espesor retirado con los valores TEWL medidos, pueden ser condicionantes del valor estimado de espesor de estrato córneo.

Una vez calculado H de cada fragmento de piel empleado se procedió a normalizar todos los datos según la fracción de estrato córneo determinada (x/H) para poder comparar resultados de distintas condiciones ensayadas (Kalia y col., 2000).

Los resultados de los estudios dermatofarmacocinéticos después de 3 horas de absorción transdérmica de nadolol e hidrocloreuro de propranolol (6 mg/mL) en las distintas condiciones ensayadas: difusión pasiva; pretratamiento al 5% (p/p) con Azone®, R-(+)-limoneno, ácido oleico en etanol así como etanol absoluto (grupo control de vehículo) y la aplicación de iontoforesis a dos densidades de corriente (0.25 y 0.50 mA/cm²), se recogen en las figuras de la 49 a la 62. Dichas figuras expresan en función de la profundidad relativa del estrato córneo (x/H): (a) medidas TEWL (g·m⁻²h⁻¹) obtenidas tras la retirada no secuencial de 9 cintas adhesivas, con el fin de examinar y valorar los posibles daños provocados por las diferentes estrategias promotoras y, (b) las concentraciones de fármaco obtenidas en esta capa de la piel ($\mu\text{g}/\text{mg}$) donde μg es la cantidad de fármaco por mg de estrato córneo, para determinar los perfiles de distribución.

En todas las figuras se recoge el valor de área bajo la curva (AUC, mg/cm³), la cantidad total de nadolol e hidrocloreuro de propranolol recogido desde las tiras adhesivas (A , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), así como la cantidad final de beta-bloqueante presente en el compartimento dador ($Q_{f \text{ dador}}$, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Del mismo modo, las figuras correspondientes a los ensayos en difusión pasiva y estudio del efecto de los promotores químicos recogen los parámetros de reparto (K) y difusión (D/H^2 , h⁻¹), obtenidos tras el ajuste de la ecuación correspondiente de la segunda ley de Fick (ecuación 20).

Tal como se indica en el capítulo anterior y siguiendo el mismo formato, se ha representado el nadolol en tonos azules y en verde el hidrocloreuro de propranolol.

Las figuras 49 a 53 representan los incrementos de TEWL en función del estrato córneo eliminado, así como los perfiles de distribución del nadolol en esta capa tras los ensayos de difusión pasiva y con pretratamiento de diferentes promotores químicos.

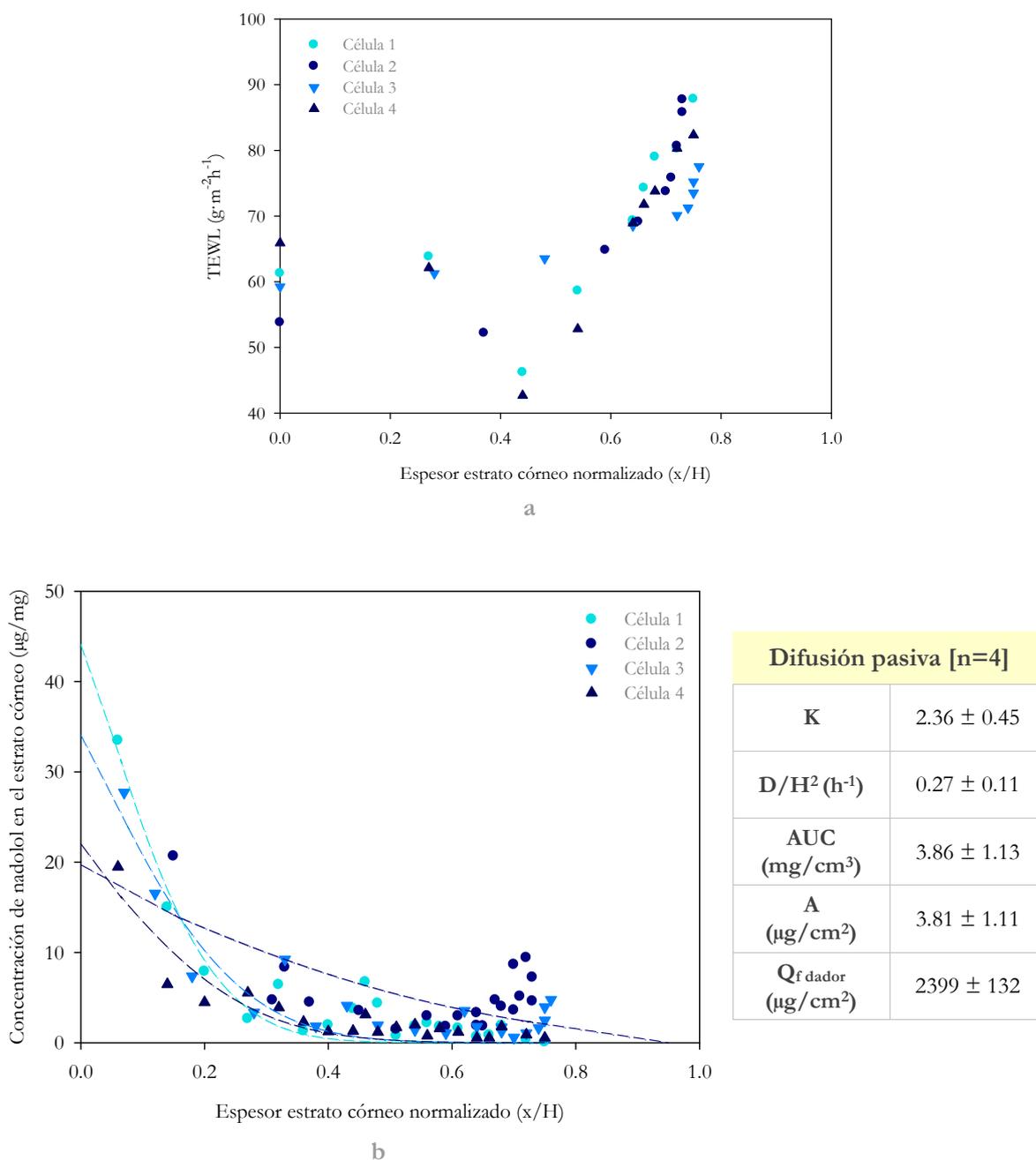


Figura 49. Ensayo de absorción transdérmica *in vitro* del **nadolol** por **difusión pasiva**. (a) Incremento en TEWL en función del espesor de estrato córneo eliminado normalizado (x/H) tras los ensayos de absorción transdérmica. (b) Concentración de nadolol frente al espesor normalizado de estrato córneo tras 3 horas de aplicación. Las líneas corresponden a los ajustados de la ecuación de Fick. En el cuadro lateral se muestran los parámetros de permeación derivados del ajuste (Media \pm D.E.): partición entre estrato córneo/vehículo (K) y difusión (D/H^2), así como el área bajo la curva (AUC), la cantidad total de nadolol en el estrato córneo (A) y la cantidad final de fármaco en el compartimento dador ($Q_{f\text{dador}}$).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

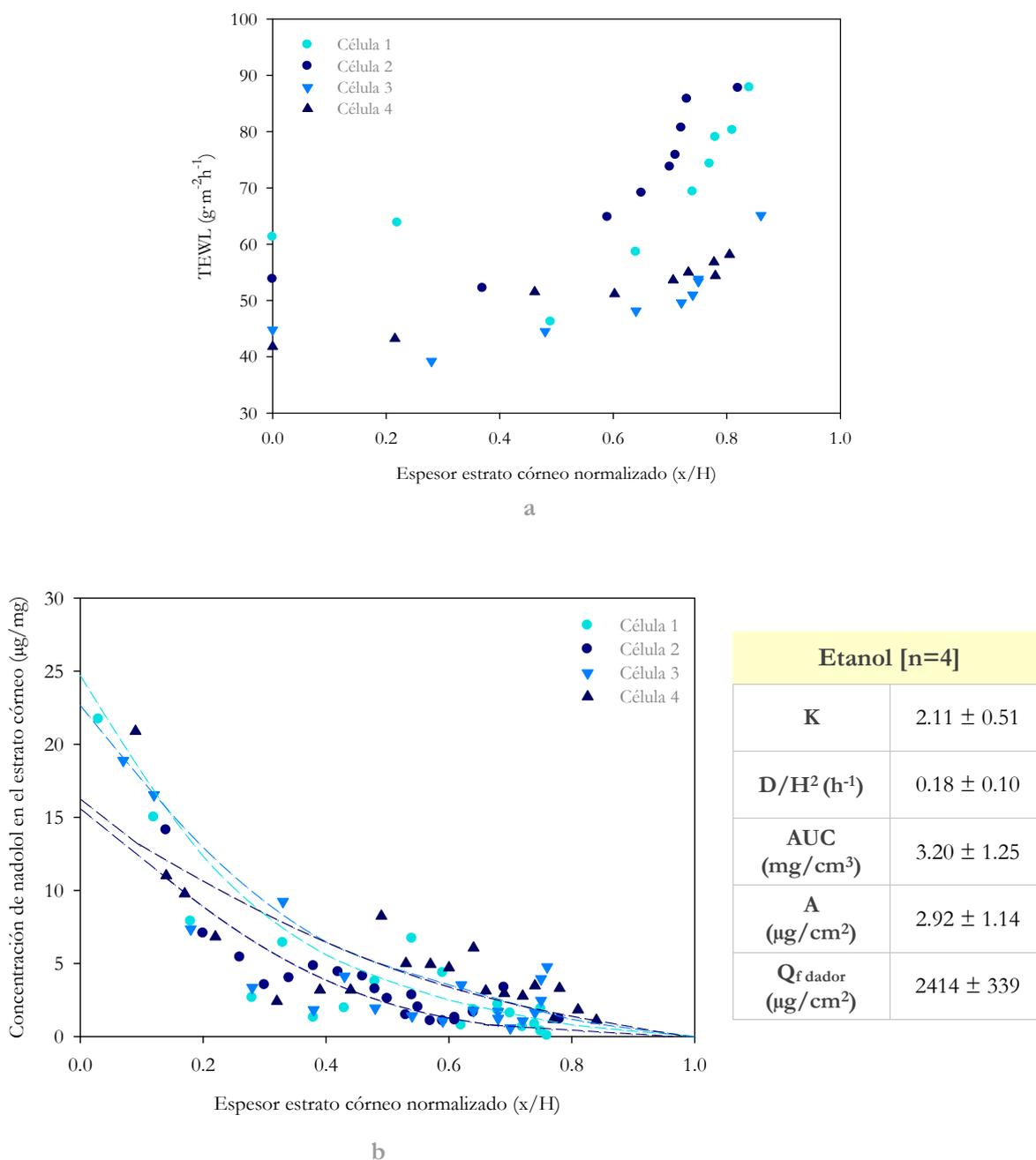


Figura 50. Ensayo de absorción transdérmica *in vitro* del **nadolol** con pretratamiento de **etanol**. (a) Incremento en TEWL en función del espesor de estrato córneo eliminado normalizado (x/H) tras los ensayos de absorción transdérmica. (b) Concentración de nadolol frente al espesor normalizado de estrato córneo tras 3 horas de aplicación. Las líneas corresponden a los ajustados de la ecuación de Fick. En el cuadro lateral se muestran los parámetros de permeación derivados del ajuste (Media ± D.E.): partición entre estrato córneo/vehículo (K) y difusión (D/H^2), así como el área bajo la curva (AUC), la cantidad total de nadolol en el estrato córneo (A) y la cantidad final de fármaco en el compartimento dador ($Q_{f\text{ dador}}$).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

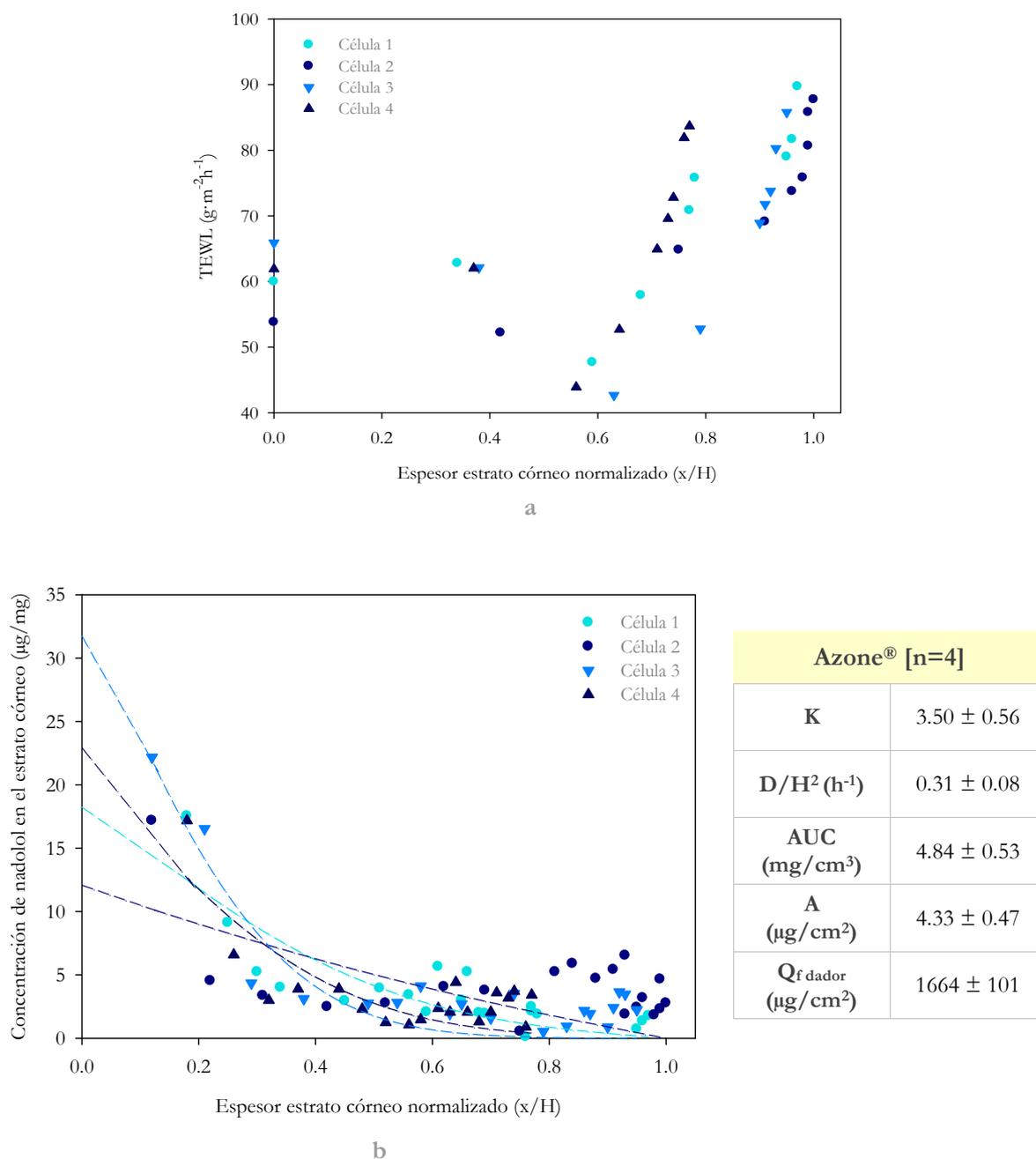


Figura 51. Ensayo de absorción transdérmica *in vitro* del **nadolol** con pretratamiento de **Azone®**. (a) Incremento en TEWL en función del espesor de estrato córneo eliminado normalizado (x/H) tras los ensayos de absorción transdérmica. (b) Concentración de nadolol frente al espesor normalizado de estrato córneo tras 3 horas de aplicación. Las líneas corresponden a los ajustados de la ecuación de Fick. En el cuadro lateral se muestran los parámetros de permeación derivados del ajuste (Media \pm D.E.): partición entre estrato córneo/vehículo (K) y difusión (D/H^2), así como el área bajo la curva (AUC), la cantidad total de nadolol en el estrato córneo (A) y la cantidad final de fármaco en el compartimento dador ($Q_{f \text{ dador}}$).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

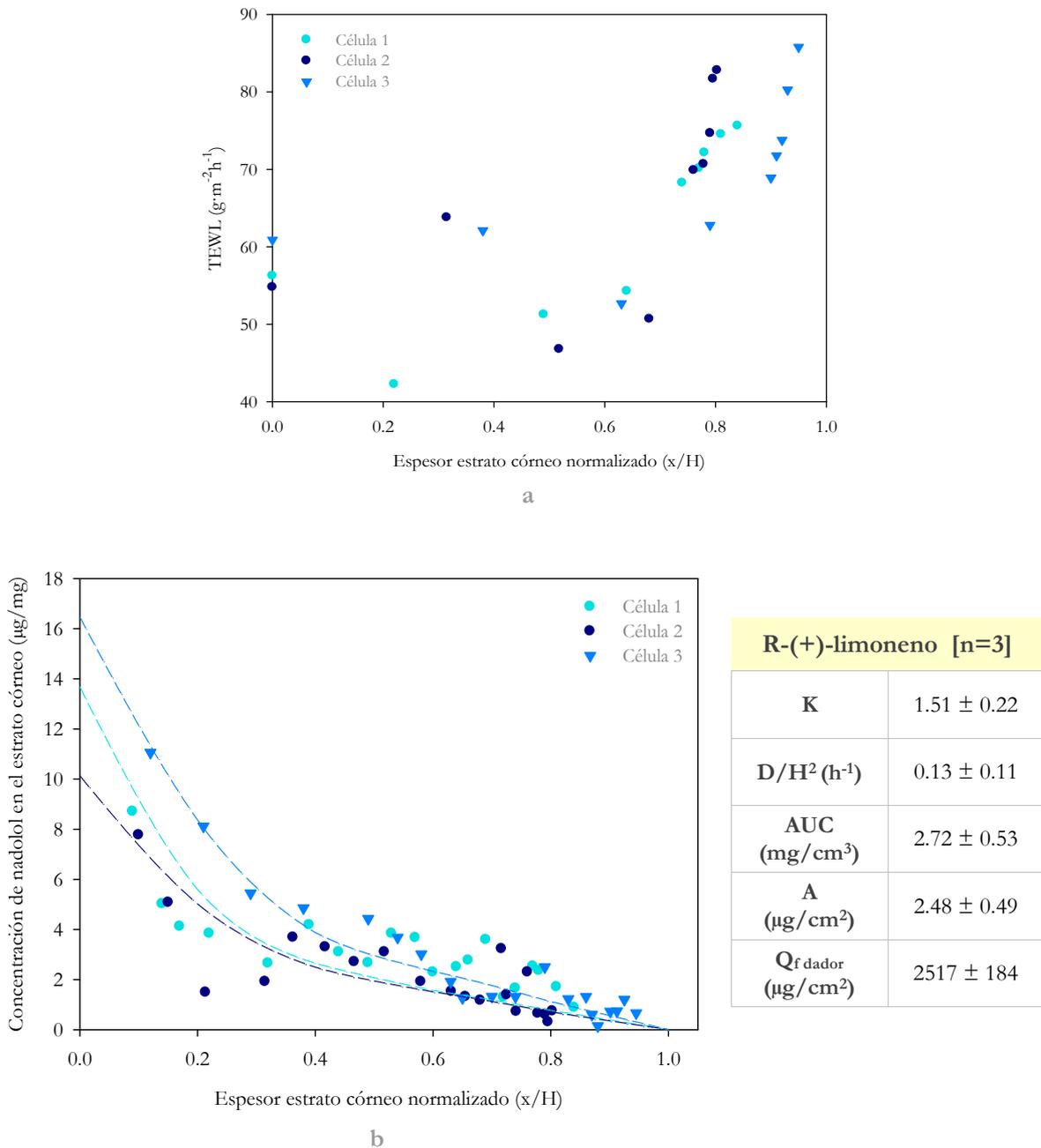


Figura 52. Ensayo de absorción transdérmica *in vitro* del **nadolol** con pretratamiento de **R-(+)-limoneno**. (a) Incremento en TEWL en función del espesor de estrato córneo eliminado normalizado (x/H) tras los ensayos de absorción transdérmica. (b) Concentración de nadolol frente al espesor normalizado de estrato córneo tras 3 horas de aplicación. Las líneas corresponden a los ajustados de la ecuación de Fick. En el cuadro lateral se muestran los parámetros de permeación derivados del ajuste (Media \pm D.E.): partición entre estrato córneo/vehículo (K) y difusión (D/H^2), así como el área bajo la curva (AUC), la cantidad total de nadolol en el estrato córneo (A) y la cantidad final de fármaco en el compartimento dador ($Q_{f \text{ dador}}$).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

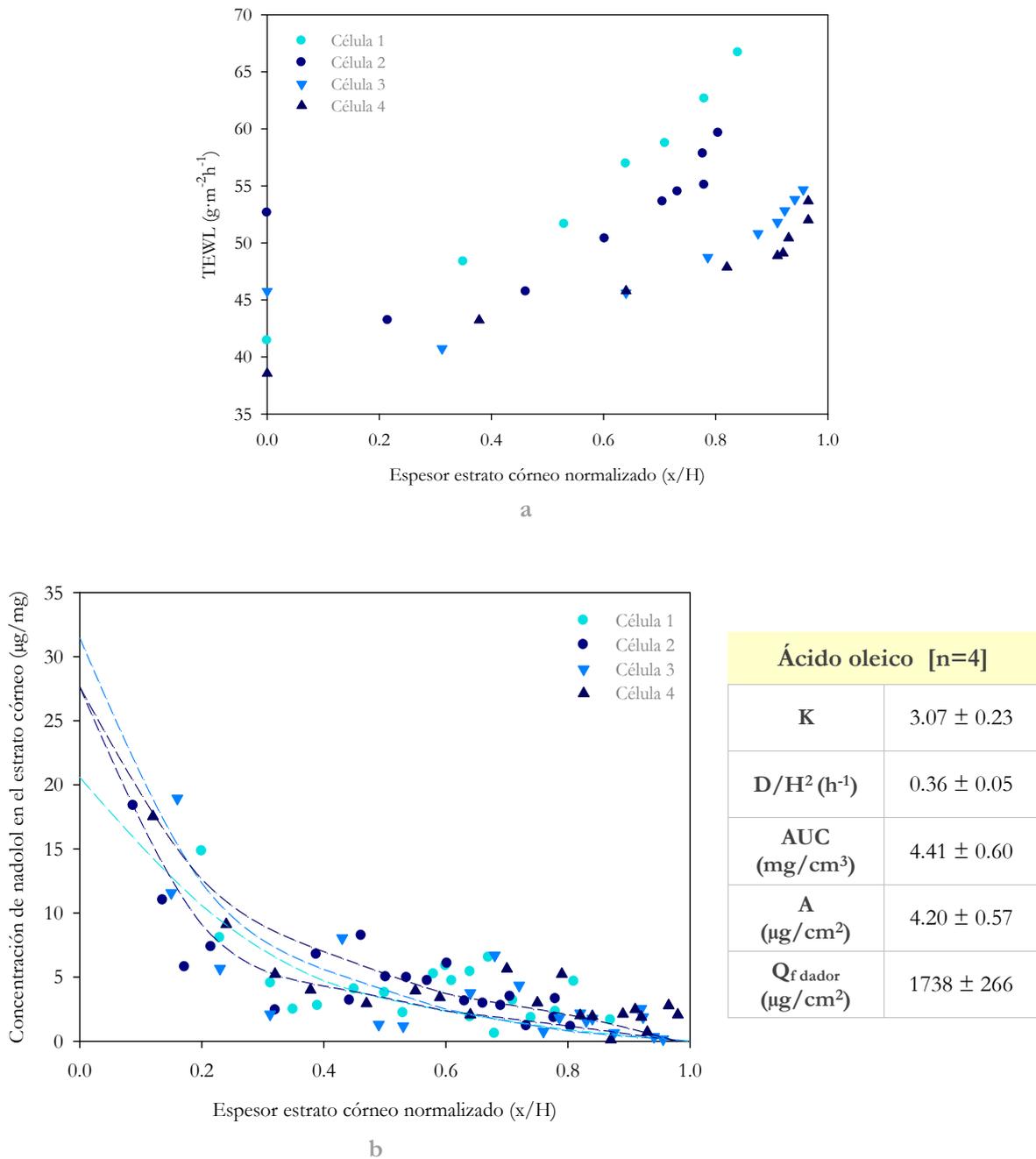


Figura 53. Ensayo de absorción transdérmica *in vitro* del **nadolol** con pretratamiento de **ácido oleico**. (a) Incremento en TEWL en función del espesor de estrato córneo eliminado normalizado (x/H) tras los ensayos de absorción transdérmica. (b) Concentración de nadolol frente al espesor normalizado de estrato córneo tras 3 horas de aplicación. Las líneas corresponden a los ajustados de la ecuación de Fick. En el cuadro lateral se muestran los parámetros de permeación derivados del ajuste (Media \pm D.E.): partición entre estrato córneo/vehículo (K) y difusión (D/H^2), así como el área bajo la curva (AUC), la cantidad total de nadolol en el estrato córneo (A) y la cantidad final de fármaco en el compartimento dador ($Q_{f \text{ dador}}$).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

Asimismo, los perfiles de distribución del nadolol tras la aplicación de iontoforesis se muestran a continuación. La figura 54 plasma los resultados tras la aplicación de una

densidad de corriente menor: 0.25 mA/cm^2 cuya intensidad es de 0.95 mA y la figura 55 corresponde al doble, 0.50 mA/cm^2 (1.90 mA). El voltaje se mantuvo constante durante las 3 horas de aplicación de corriente eléctrica con un valor próximo a 0.11 V y 0.19 V , respectivamente.

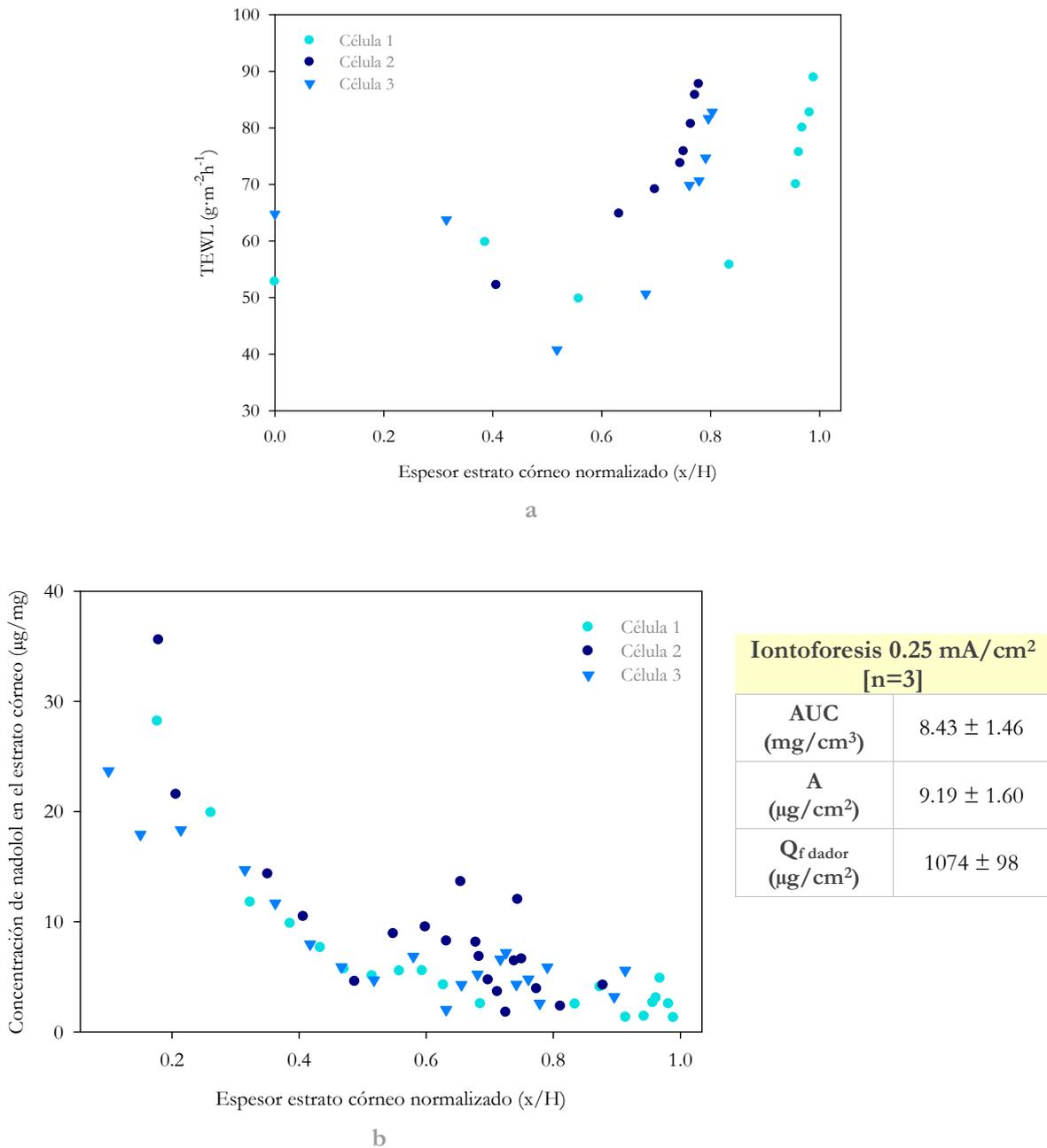


Figura 54. Ensayo de absorción transdérmica *in vitro* del **nadolol** con **iontophoresis 0.25 mA/cm^2** . (a) Incremento en TEWL en función del espesor de estrato córneo eliminado normalizado (x/H) tras los ensayos de absorción transdérmica. (b) Concentración de nadolol frente al espesor normalizado de estrato córneo tras 3 horas de aplicación de iontophoresis [n=3]. En el cuadro lateral se muestran el área bajo la curva (AUC), la cantidad total de nadolol en el estrato córneo (A) y la cantidad final de fármaco en el compartimento dador (Q_f dador).

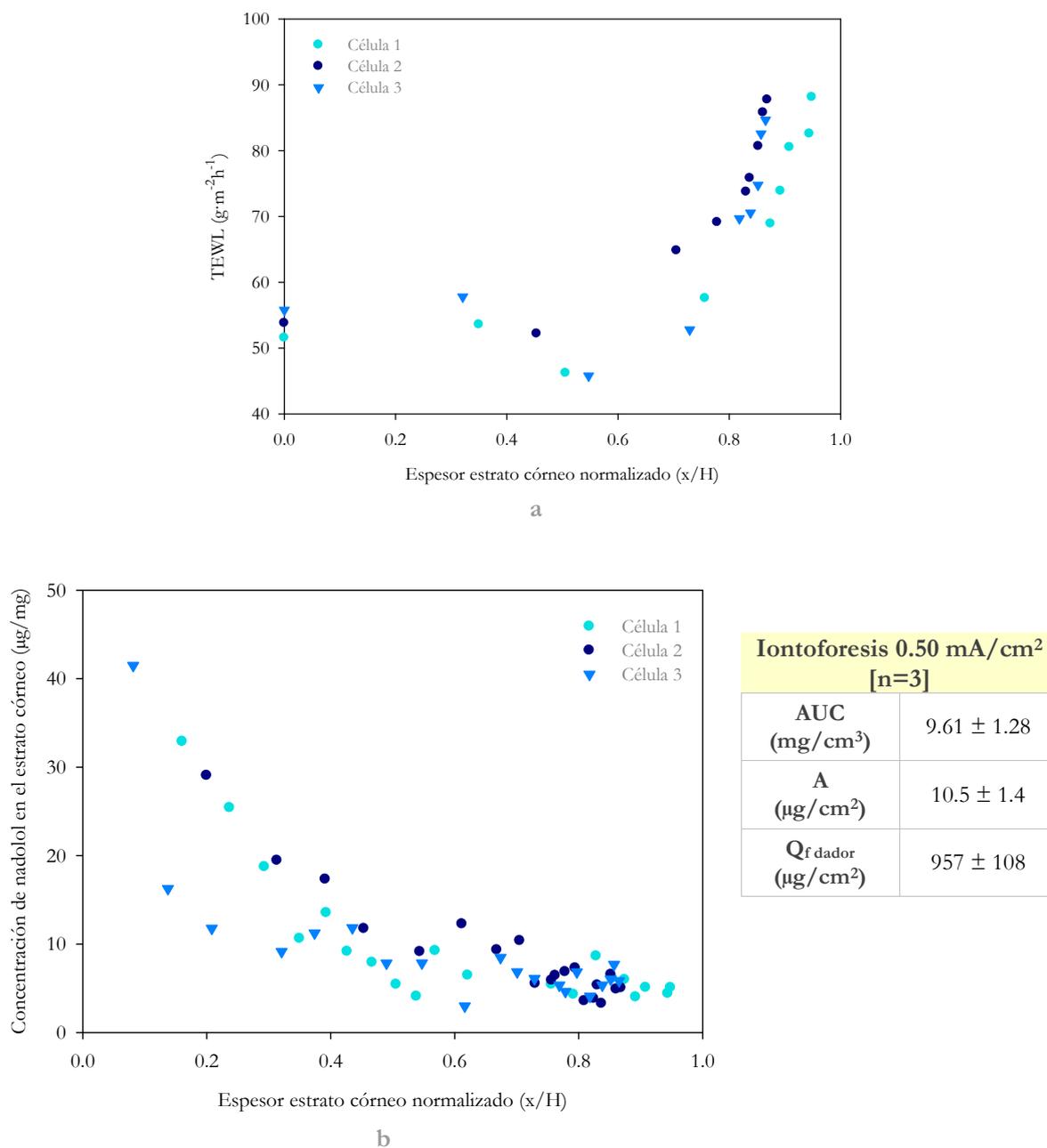


Figura 55. Ensayo de absorción transdérmica *in vitro* del **nadolol** con **iontophoresis 0.50 mA/cm²**. (a) Incremento en TEWL en función del espesor de estrato córneo eliminado normalizado (x/H) tras los ensayos de absorción transdérmica. (b) Concentración de nadolol frente al espesor normalizado de estrato córneo tras 3 horas de aplicación de iontophoresis [$n=3$]. En el cuadro lateral se muestran el área bajo la curva (AUC), la cantidad total de nadolol en el estrato córneo (A) y la cantidad final de fármaco en el compartimento dador ($Q_{f \text{ dador}}$).

Por otra parte, los resultados del hidrocloreuro de propranolol tras la técnica *tape-stripping* se muestran a continuación.

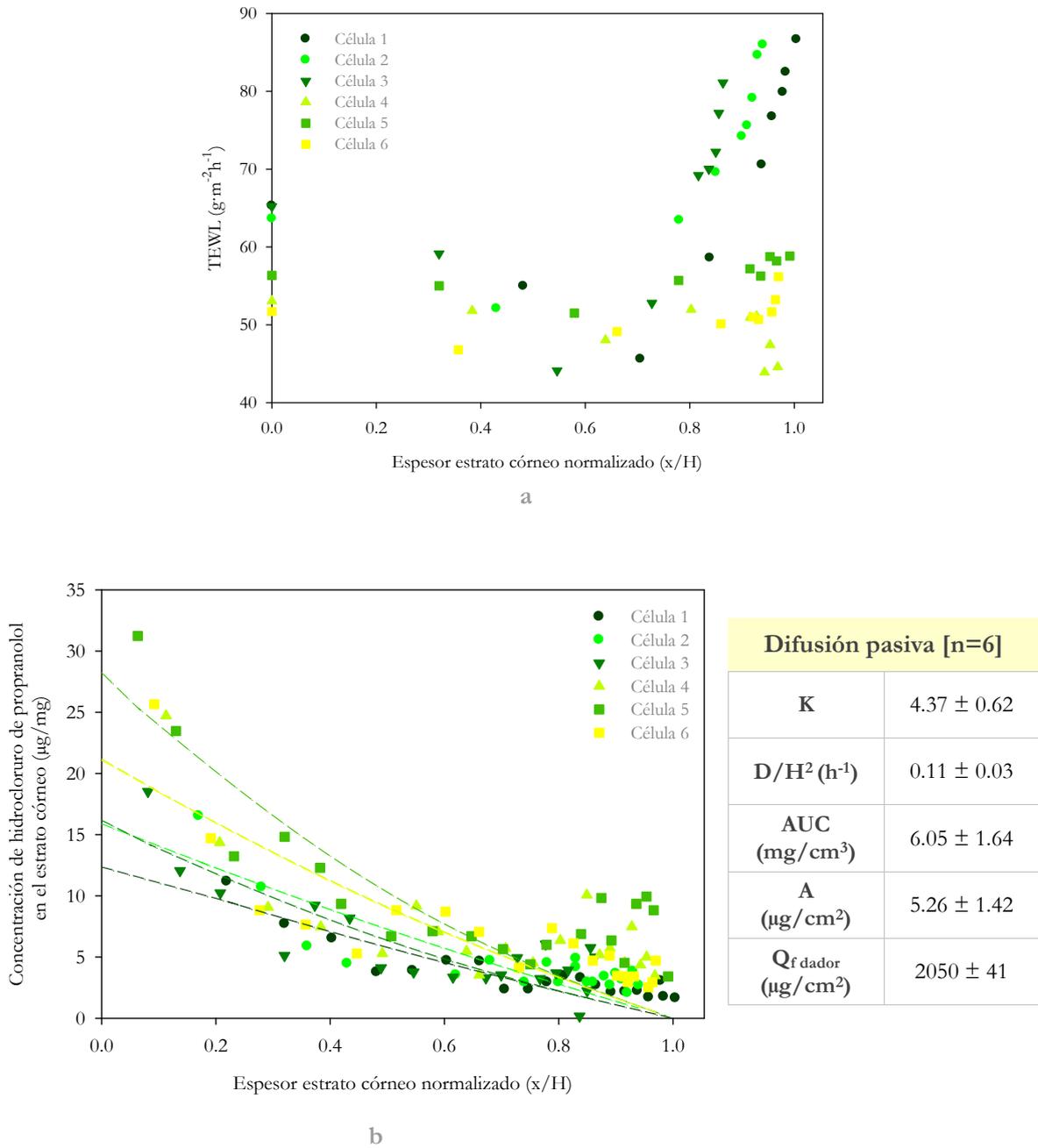


Figura 56. Ensayo de absorción transdérmica *in vitro* del **hidroclocloruro de propranolol** por **difusión pasiva**. (a) Incremento en TEWL en función del espesor de estrato córneo eliminado normalizado (x/H) tras los ensayos de absorción transdérmica. (b) Concentración de hidroclocloruro de propranolol frente al espesor normalizado de estrato córneo tras 3 horas de aplicación. Las líneas corresponden a los ajustados de la ecuación de Fick. En el cuadro lateral se muestran los parámetros de permeación derivados del ajuste (Media \pm D.E.): partición entre estrato córneo/vehículo (K) y difusión (D/H^2), así como el área bajo la curva (AUC), la cantidad total de nadolol en el estrato córneo (A) y la cantidad final de fármaco en el compartimento dador (Q_f dador).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

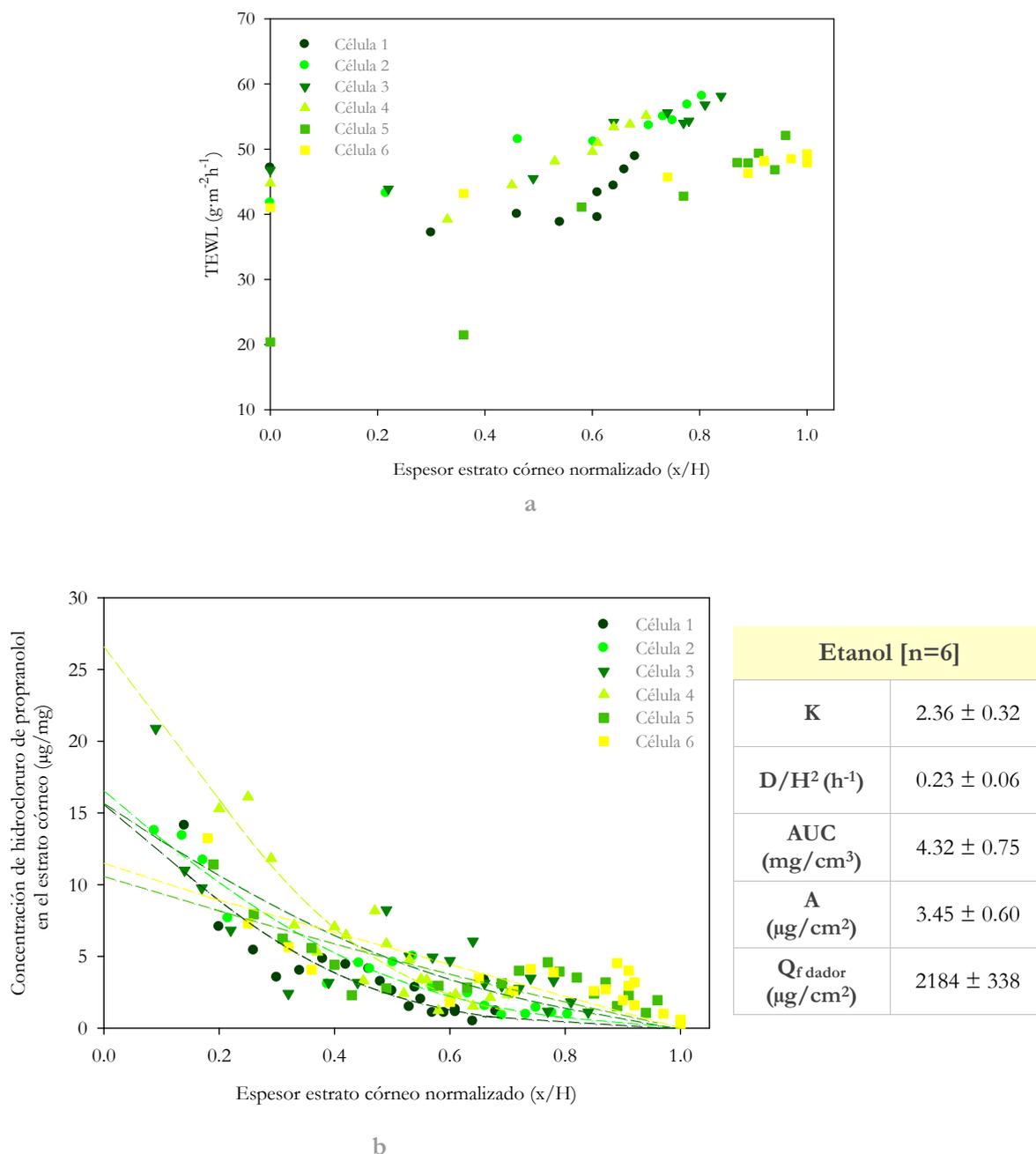


Figura 57. Ensayo de absorción transdérmica *in vitro* del **hidrocloruro de propranolol** con pretratamiento de **etanol**. (a) Incremento en TEWL en función del espesor de estrato córneo eliminado normalizado (x/H) tras los ensayos de absorción transdérmica. (b) Concentración de hidrocloruro de propranolol frente al espesor normalizado de estrato córneo tras 3 horas de aplicación. Las líneas corresponden a los ajustados de la ecuación de Fick. En el cuadro lateral se muestran los parámetros de permeación derivados del ajuste (Media \pm D.E.): partición entre estrato córneo/vehículo (K) y difusión (D/H^2), así como el área bajo la curva (AUC), la cantidad total de nadolol en el estrato córneo (A) y la cantidad final de fármaco en el compartimento dador ($Q_{f \text{ dador}}$).

El valor $[n]$ representa el número de ensayos realizados.

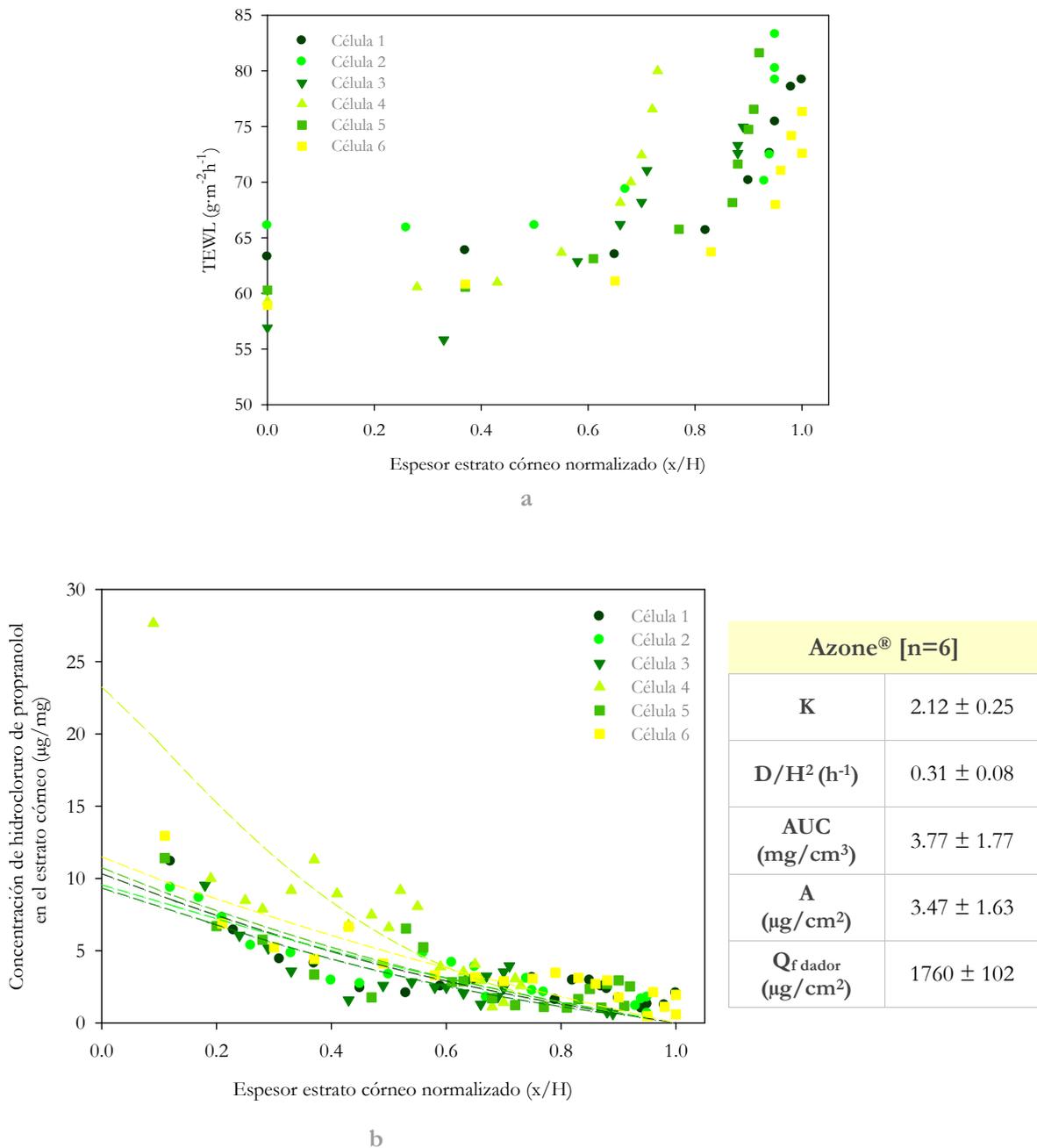


Figura 58. Ensayo de absorción transdérmica *in vitro* del **hidrocloreto de propranolol** con pretratamiento de **Azone®**. (a) Incremento en TEWL en función del espesor de estrato córneo eliminado normalizado (x/H) tras los ensayos de absorción transdérmica. (b) Concentración de hidrocloreto de propranolol frente al espesor normalizado de estrato córneo tras 3 horas de aplicación. Las líneas corresponden a los ajustados de la ecuación de Fick. En el cuadro lateral se muestran los parámetros de permeación derivados del ajuste (Media ± D.E.): partición entre estrato córneo/vehículo (K) y difusión (D/H²), así como el área bajo la curva (AUC), la cantidad total de nadolol en el estrato córneo (A) y la cantidad final de fármaco en el compartimento dador (Q_f dador). El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

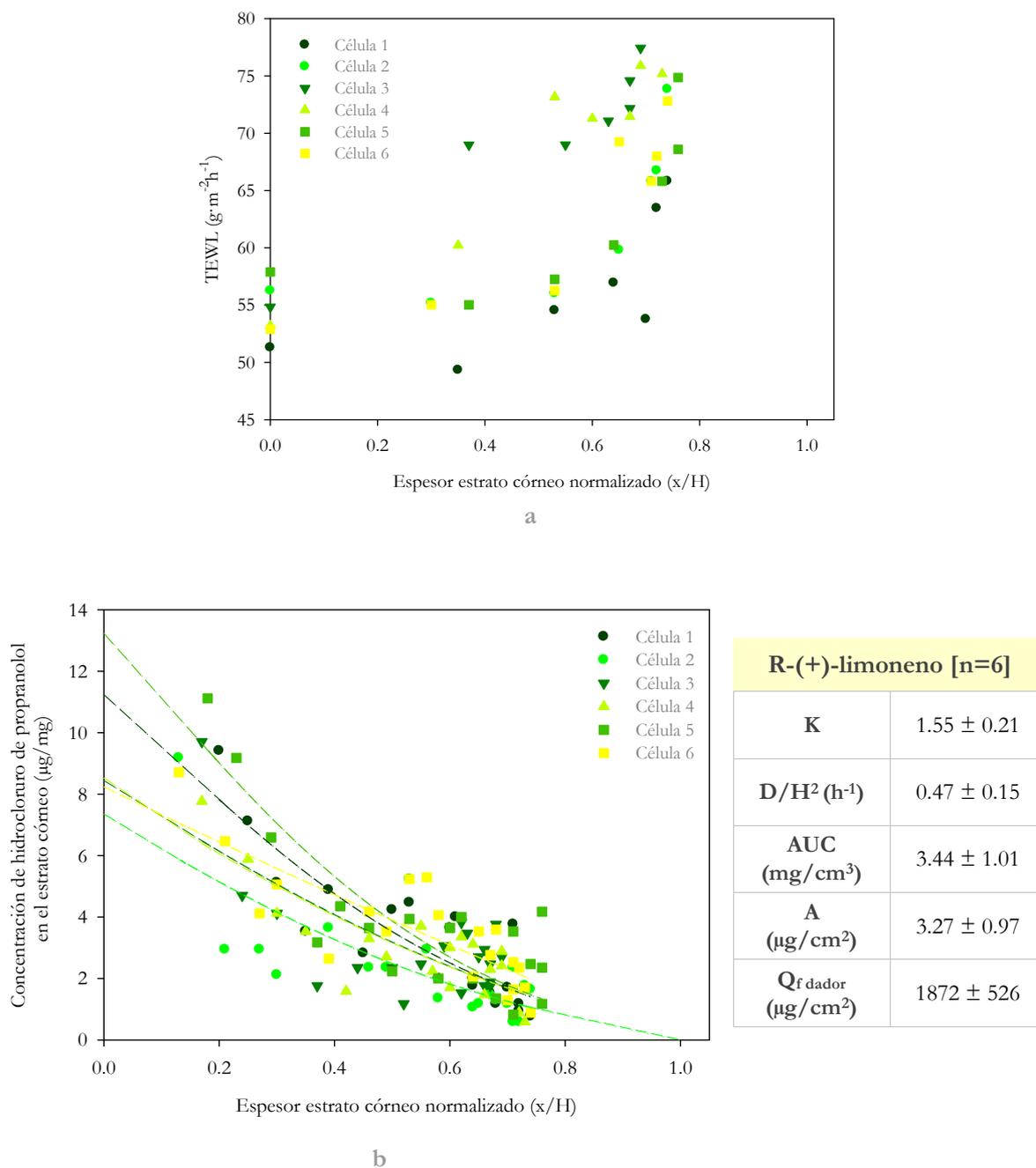


Figura 59. Ensayo de absorción transdérmica *in vitro* del **hidrocloruro de propranolol** con pretratamiento de **R-(+)-limoneno**. (a) Incremento en TEWL en función del espesor de estrato córneo eliminado normalizado (x/H) tras los ensayos de absorción transdérmica. (b) Concentración de hidrocloruro de propranolol frente al espesor normalizado de estrato córneo tras 3 horas de aplicación. Las líneas corresponden a los ajustados de la ecuación de Fick. En el cuadro lateral se muestran los parámetros de permeación derivados del ajuste (Media ± D.E.): partición entre estrato córneo/vehículo (K) y difusión (D/H^2), así como el área bajo la curva (AUC), la cantidad total de nadolol en el estrato córneo (A) y la cantidad final de fármaco en el compartimento dador ($Q_{f \text{ dador}}$).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

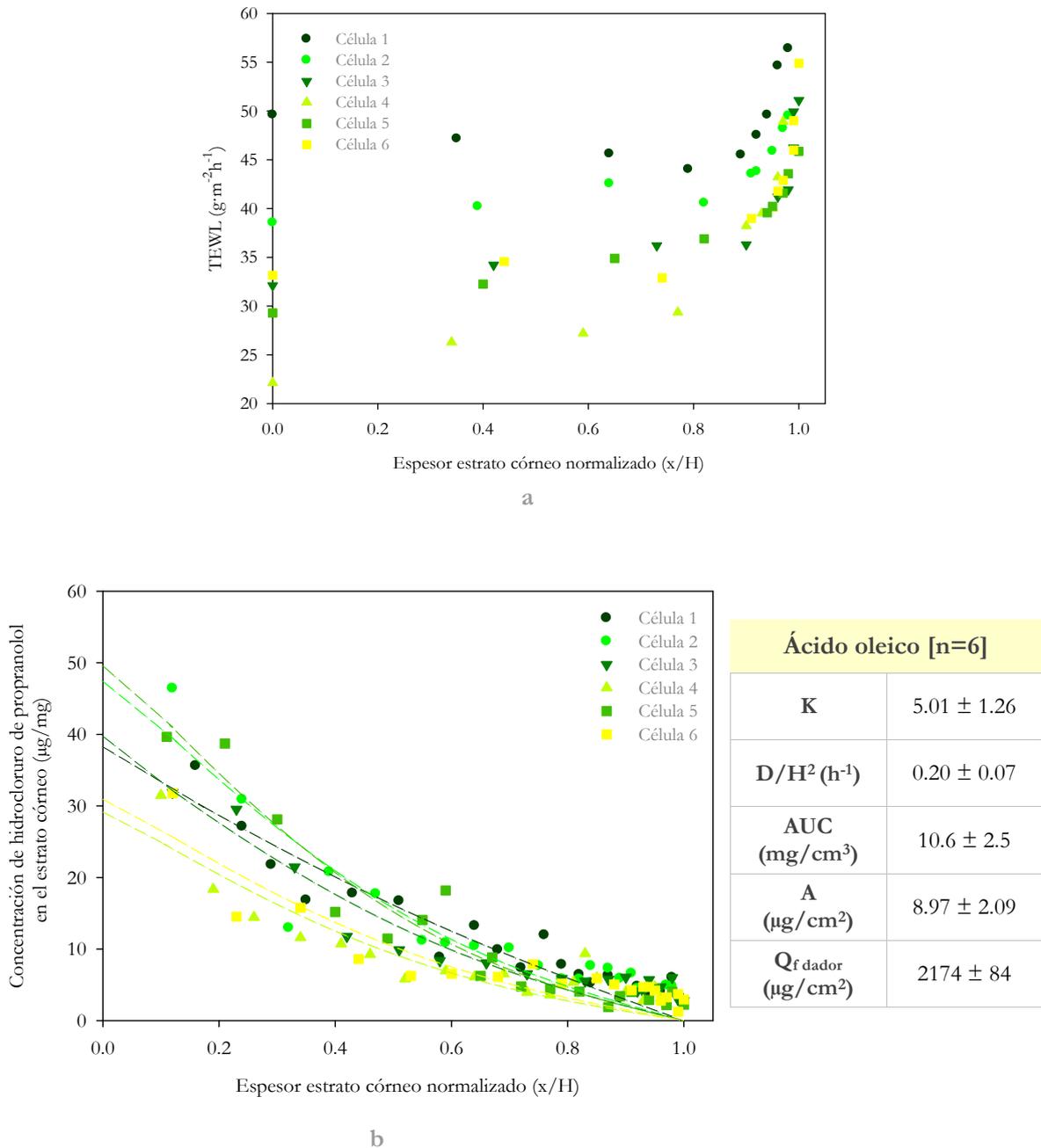


Figura 60. Ensayo de absorción transdérmica *in vitro* del **hidroclocluro de propranolol** con pretratamiento de **ácido oleico**. (a) Incremento en TEWL en función del espesor de estrato córneo eliminado normalizado (x/H) tras los ensayos de absorción transdérmica. (b) Concentración de hidroclocluro de propranolol frente al espesor normalizado de estrato córneo tras 3 horas de aplicación. Las líneas corresponden a los ajustados de la ecuación de Fick. En el cuadro lateral se muestran los parámetros de permeación derivados del ajuste (Media ± D.E.): partición entre estrato córneo/vehículo (K) y difusión (D/H^2), así como el área bajo la curva (AUC), la cantidad total de nadolol en el estrato córneo (A) y la cantidad final de fármaco en el compartimento dador ($Q_{f \text{ dador}}$).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

Las figuras 61 y 62 muestran el incremento en TEWL y la concentración de hidrocóloro de propranolol en el estrato córneo tras la aplicación de 0.25 y 0.50 mA/cm², respectivamente. El voltaje registrado fue similar al obtenido con el nadolol.

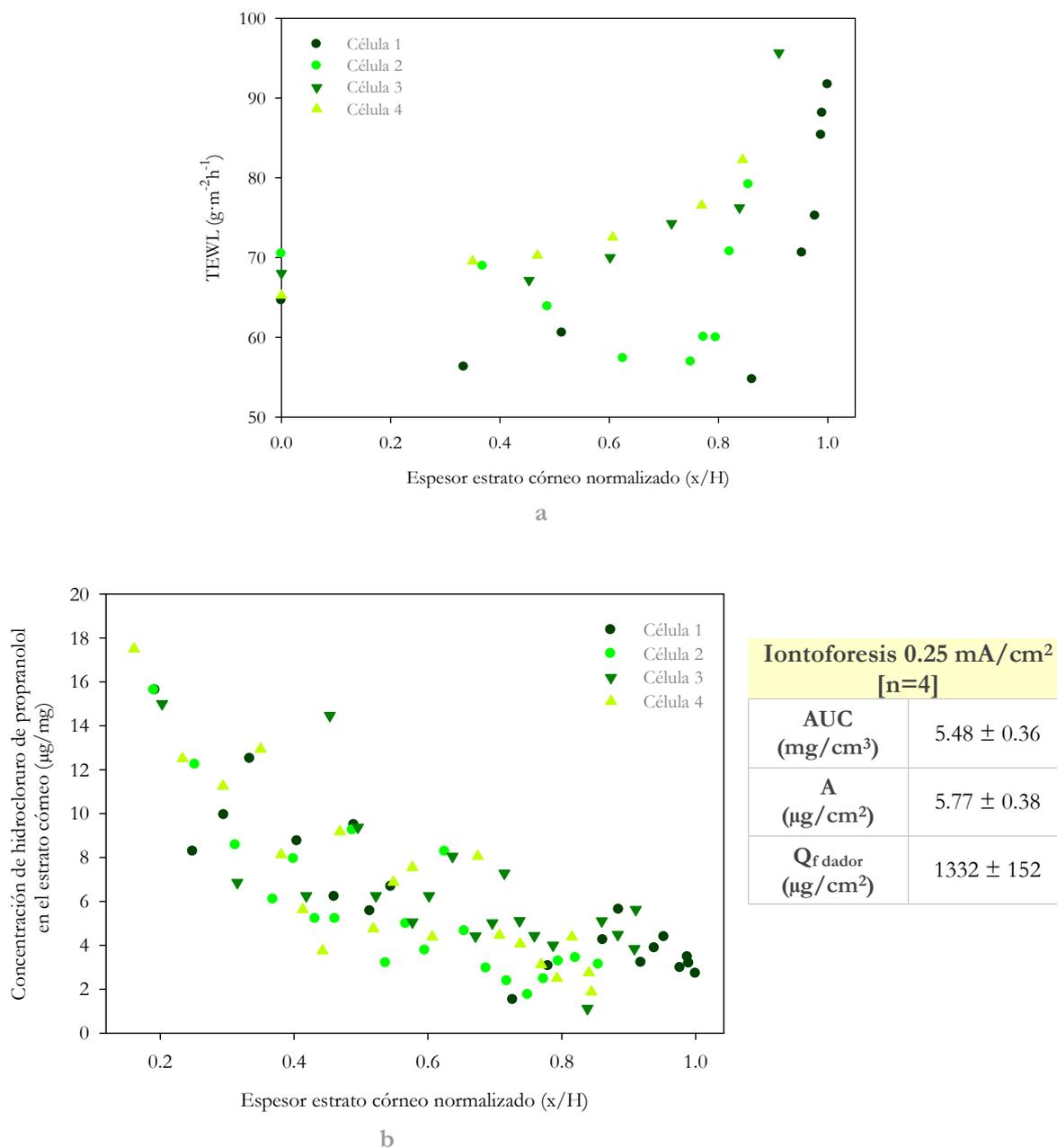


Figura 61. Ensayo de absorción transdérmica *in vitro* del **hidrocóloro de propranolol** con **iontoforesis 0.25 mA/cm²**. (a) Incremento en TEWL en función del espesor de estrato córneo eliminado normalizado (x/H) tras los ensayos de absorción transdérmica. (b) Concentración de hidrocóloro de propranolol frente al espesor normalizado de estrato córneo tras 3 horas de aplicación de iontoforesis [n=4]. En el cuadro lateral se muestran el área bajo la curva (AUC), la cantidad total de nadolol en el estrato córneo (A) y la cantidad final de fármaco en el compartimento dador (Q_fdador).

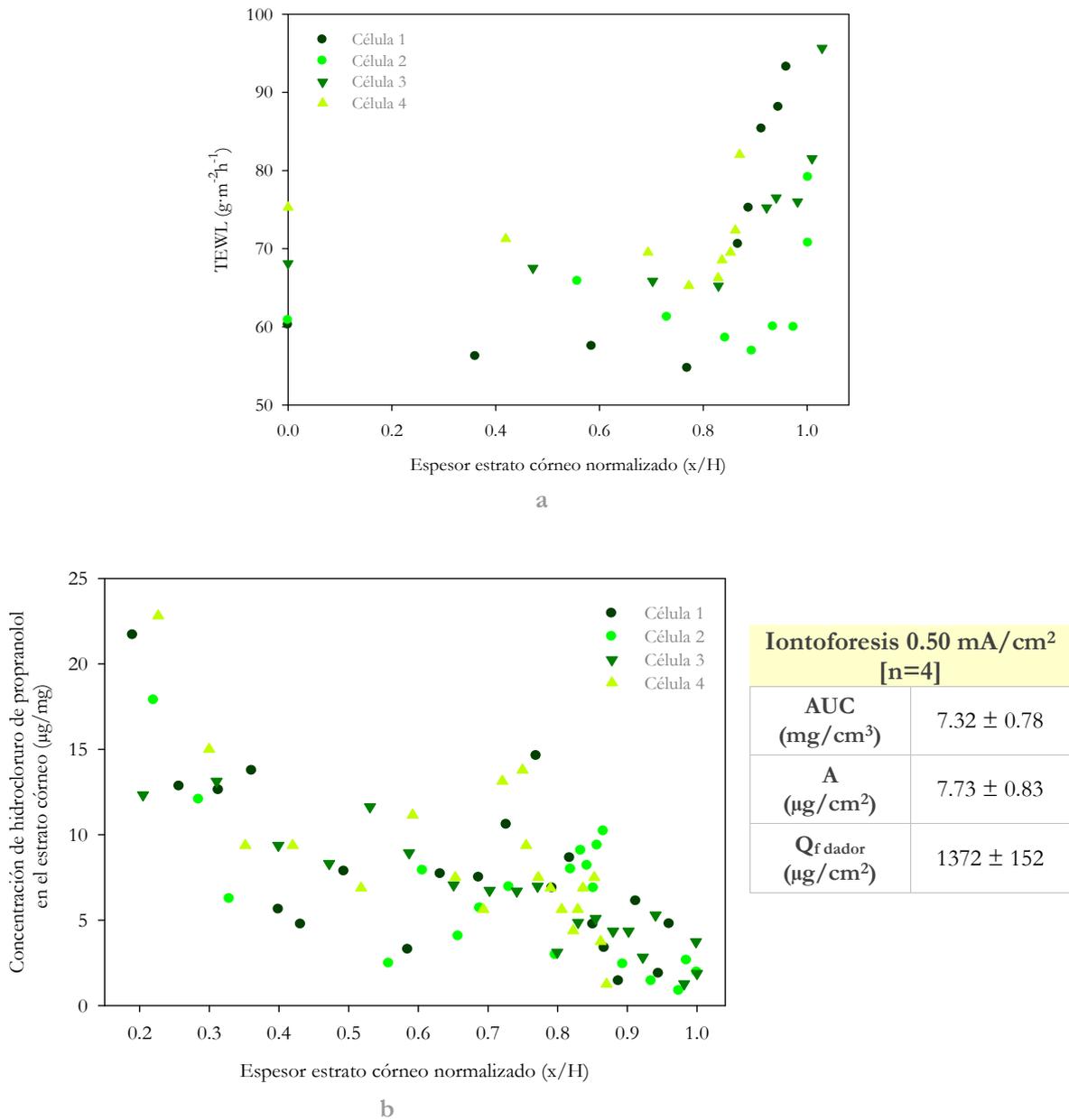


Figura 62. Ensayo de absorción transdérmica *in vitro* del hidroclocluro de propranolol con iontoforesis 0.50 mA/cm². (a) Incremento en TEWL en función del espesor de estrato córneo eliminado normalizado (x/H) tras los ensayos de absorción transdérmica. (b) Concentración de hidroclocluro de propranolol frente al espesor normalizado de estrato córneo tras 3 horas de aplicación de iontoforesis [n=4]. En el cuadro lateral se muestran el área bajo la curva (AUC), la cantidad total de nadolol en el estrato córneo (A) y la cantidad final de fármaco en el compartimento dador (Q_f dador).

En todos los ensayos realizados se determinó la pérdida de agua transepidermica siguiendo el método anteriormente descrito. Previa a la realización de la técnica *tape-stripping*, la medida TEWL fue aproximadamente de $54.8 \pm 5.7 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ en el caso del nadolol y $54.6 \pm 12.7 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ para el propranolol, incrementándose de manera progresiva hasta la retirada de la última tira donde se alcanzaron medidas de $79.8 \pm 10.3 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ (nadolol) y $71.6 \pm 14.8 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ (hidrocloruro de propranolol). Este incremento no se apreció en los primeros micrómetros de estrato córneo, pero aumentó drásticamente en todos los ensayos después de retirar entre 6 y 8 μm de esta capa.

Como se ha indicado, la piel es una membrana que limita el transporte bidireccional de agua, iones y en general todo tipo de compuestos. Esta función barrera reside en el estrato córneo, concretamente en los lípidos intercelulares del mismo. Un incremento transitorio del TEWL puede tener origen en una intensa hidratación debida al propio ensayo de absorción transdérmica, a los promotores químicos o a la misma iontoforesis. Sin embargo, un aumento sostenido o irreversible de dicho valor, indica una alteración en la organización y/o composición de los lípidos de estrato córneo y/o proceso irritativo, no considerado este último en este trabajo porque las condiciones experimentales son *in vitro*. Por ello, en el presente trabajo, y al igual que otros autores (Kalia y col., 1996; Kalia y col., 2000; Lo y col., 1990; Pirot y col., 1998; Russell y col., 2008), se ha estimado que el incremento de TEWL es debido a la eliminación de la barrera.

Con el fin de explicar el efecto de los promotores químicos sobre la absorción transdérmica de ambos fármacos se calcularon los parámetros K y D/H^2 mediante el ajuste a los datos experimentales obtenidos de la ecuación correspondiente a la segunda ley de difusión de Fick. Estos parámetros obtenidos junto con el área bajo la curva y la cantidad de fármaco en el estrato córneo se muestran en las tablas junto a cada figura (b) y se resumen en la tabla que se muestra a continuación. Asimismo, cuando el ensayo fue con iontoforesis, se calculó la cantidad total de fármaco en el estrato córneo para poder comparar dicha cantidad con el resto de condiciones en la capa más superficial de la piel (véase tabla 46).

Parámetros dermatofarmacocinéticos				
Nadolol				
Condición (n)	K	D/H ² (h ⁻¹)	AUC (mg/cm ³)	A (µg/cm ²)
Difusión pasiva (4)	2.36 ± 0.45	0.27 ± 0.11	3.86 ± 1.13	3.81 ± 1.11
Etanol (4)	2.11 ± 0.51	0.18 ± 0.10	3.20 ± 1.25	2.92 ± 1.14
Azone [®] (4)	3.50 ± 0.56 ^a	0.31 ± 0.08 ^a	4.84 ± 0.53 ^a	4.33 ± 0.47 ^a
R-(+)-limoneno (3)	1.51 ± 0.22	0.13 ± 0.11	2.72 ± 0.53	2.48 ± 0.49
Ácido oleico (4)	3.07 ± 0.23 ^a	0.36 ± 0.05 ^a	4.41 ± 0.60 ^a	4.20 ± 0.57 ^a
Iontoforesis 0.25 mA/cm ² (3)	-	-	8.43 ± 1.46 ^b	9.19 ± 1.60 ^b
Iontoforesis 0.50 mA/cm ² (3)	-	-	9.61 ± 1.28 ^b	10.5 ± 1.4 ^b
Hidrocloreuro de propranolol				
Difusión pasiva (6)	4.37 ± 0.62 ^a	0.11 ± 0.03	6.05 ± 1.64	5.26 ± 1.42
Etanol (6)	2.36 ± 0.32	0.23 ± 0.06	4.32 ± 0.75	3.45 ± 0.60
Azone [®] (6)	2.12 ± 0.25	0.31 ± 0.08	3.77 ± 1.77	3.47 ± 1.63
R-(+)-limoneno (6)	1.55 ± 0.21	0.47 ± 0.15 ^a	3.44 ± 1.01	3.27 ± 0.97
Ácido oleico (6)	5.73 ± 1.26 ^a	0.29 ± 0.07	10.6 ± 2.5 ^b	8.97 ± 2.09 ^b
Iontoforesis 0.25 mA/cm ² (4)	-	-	5.48 ± 0.36	5.77 ± 0.38
Iontoforesis 0.50 mA/cm ² (4)	-	-	7.32 ± 0.78 ^b	7.73 ± 0.83 ^b

Tabla 46. Parámetros dermatofarmacocinéticos [coeficiente de reparto entre estrato córneo y vehículo empleado (K), difusión (D/H²), área bajo la curva (AUC) y la cantidad total de fármaco en el estrato córneo (A)] del nadolol e hidrocloreuro de propranolol obtenidos por la técnica *tape-stripping* tras 3 horas de absorción transdérmica *in vitro* en las diferentes condiciones de pretratamiento con promotores y la aplicación de iontoforesis en piel de cerdo. Valor medio ± D.E. (p<0.05).

^a diferencia estadísticamente significativa respecto al resto de promotores químicos.

^b diferencia estadísticamente significativa respecto al resto de estrategias.

Se puede observar que los parámetros K y D/H² son distintos según el ensayo, obteniendo valores aproximados entre 1 a 5 para el reparto y 0.10 a 0.50 en el caso de la difusión a través del estrato córneo. Por tanto, se deduce la dependencia del vehículo para alterar la solubilidad y por consiguiente el paso de fármaco a través del estrato córneo. Un comportamiento similar se ha observado previamente con el Azone[®] (Harrison y col., 1996), Transcutol[®] (Harrison y col., 1996; Mura y col., 2000) y otros cosolventes como el propilenglicol (Bendas y col., 1995; Herkenne y col., 2008^b). Cabe destacar que los valores derivados de K en estos experimentos son próximos a la unidad, llegando a alcanzar el valor K de 2.99 en un estudio dermatofarmacocinético de ibuprofeno en una solución de propilenglicol/agua 75:25 (v/v) (Nicoli y col., 2009).

En el caso del nadolol, el pretratamiento con Azone[®] y ácido oleico son los que provocan un K mayor, siendo estadísticamente diferentes respecto al resto de condiciones ($p < 0.05$). Por otra parte, el hidrocloreuro de propranolol, por su naturaleza lipófila, presenta por difusión pasiva un parámetro de reparto elevado (4.37 ± 0.62) aunque es en presencia de ácido oleico cuando se alcanza un mayor valor de K. El resto de condiciones en el caso del hidrocloreuro de propranolol son iguales entre sí estadísticamente ($p > 0.05$). Por ello, tal como se indica en un estudio reciente, se puede estimar un posible reparto en la capa más externa del estrato córneo entre dos fases bastante similares según el promotor estudiado, proporcionando un valor de K diferente según el fármaco (Wiedersberg y col., 2009^b).

Por otra parte, si se analiza la difusión de los beta-bloqueantes, expresada mediante D/H^2 , su valor se incrementó con el Azone[®] y aumentó estadísticamente por la adición de ácido oleico en el caso del nadolol, mientras que para el hidrocloreuro de propranolol, el promotor químico que más afectó a la difusión fue el R-(+)-limoneno ($p < 0.05$). No obstante, no se evidencian diferencias estadísticas en el parámetro de difusión en difusión pasiva ($p > 0.05$) entre ambos beta-bloqueantes, nadolol e hidrocloreuro de propranolol, con pesos moleculares próximos a 300 g/mol. Este hecho ya ha sido observado al comparar los parámetros dermatofarmacocinéticos de un antiinflamatorio no esteroideo, el ibuprofeno [peso molecular (206.3 g/mol)] y un glucocorticoide, la betametasona [peso molecular (392.5 g/mol)] (Wiedersberg y col., 2009^b) o al experimentar la absorción transdérmica de un antimicótico de amplio espectro, la terbinafina, a través del estrato córneo (Alberti y col., 2001^a).

Como puede observarse en las figuras 54, 55, 61 y 62 que muestran las concentraciones de los fármacos en el estrato córneo cuando se aplica iontoforesis, el perfil de distribución del fármaco es más lineal que en el resto de ensayos. Ésto es debido a que con la iontoforesis rápidamente se alcanza el estado estacionario. Si se analiza la difusión se observan perfiles con mayor concentración de fármaco desde las primeras capas de piel.

En esta condición se calculó el área bajo la curva (AUC) y la cantidad total de ambos beta-bloqueantes en el estrato córneo (A) tal como se ha comentado previamente. Se observa que las cantidades de nadolol presentes en el estrato córneo son superiores estadísticamente a las obtenidas con el propranolol ($p < 0.05$). No obstante, el nadolol no mostró diferencias estadísticas entre ambas densidades de corriente ($p > 0.05$) aunque sí se observó dicha diferencia con su análogo propranolol, determinándose una mayor cantidad

en el estrato córneo tras 3 horas cuando la condición ensayada fue la aplicación de 0.50 mA/cm². Si además se examinan las cantidades restantes en el compartimento dador determinado tras los ensayos, se observan que son menores con el nadolol. Se puede concluir que esa acumulación en el estrato córneo es debido al paso de beta-bloqueante al utilizar iontoforesis. Como cabría esperar, la corriente eléctrica provoca una mayor cantidad acumulada en estrato córneo en el caso del nadolol, siendo estadísticamente superior ($p < 0.05$) al resto de condiciones estudiadas, ya que difunde con facilidad en los lípidos intercelulares y por ello se obtienen cantidades superiores en el estrato córneo.

Así pues, a partir de los resultados obtenidos en el capítulo previo acerca de la administración transdérmica del nadolol e hidrocloreuro de propranolol, se pueden destacar diversos aspectos. Para el hidrocloreuro de propranolol, las estrategias promotoras más efectivas son el R-(+)-limoneno, Azone[®] y la aplicación de corriente a 0.50 mA/cm². No obstante, el terpeno proporciona una gran acumulación de propranolol en piel completa no promoviendo un paso excesivo a su través ya que se mantiene una cantidad elevada de propranolol acumulado en el compartimento dador tras las 3 horas de experimento. Sin embargo, el nadolol es el fármaco beta-bloqueante estudiado que presenta mayor flujo transdérmico y su acumulación en piel es menor. De todos los promotores químicos ensayados, el Azone[®] es el que ha producido un efecto promotor superior. Sin embargo, es la iontoforesis la estrategia más eficaz de las evaluadas, siendo la densidad de corriente superior (0.50 mA/cm²) la que produce un flujo iontoforético más elevado ($216 \pm 11 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$) después de 8 horas de aplicación de corriente. Además, la iontoforesis, en estas condiciones, no produce una acumulación excesiva de nadolol en piel completa y proporciona una cantidad en el estrato córneo estadísticamente superior al resto de condiciones, debido al paso de fármaco a través de la capa más superficial puesto que la cantidad final de nadolol en el compartimento dador fue inferior al resto de condiciones.

Como se ha mencionado con anterioridad, todas las estructuras de la piel son importantes, sin embargo, es la capa más superficial de la piel aquella en que se centra la mayor parte de la acción protectora (Wertz y Dowling, 1989). El estrato córneo constituye la parte más externa de la epidermis y está considerado como la capa protectora natural de la piel frente a factores exógenos. Las principales características del estrato córneo son su elevada resistencia ante los factores físicos y químicos del entorno, así como su alta elasticidad y plasticidad, característica que le permite plegarse y moverse sobre el tejido cutáneo.

Si se consideran las distintas capas de la piel como un conjunto de resistencias situadas en serie, que la molécula ha de atravesar hasta llegar a la circulación sanguínea, a partir de los resultados obtenidos en los distintos estudios de difusión realizados (piel completa y estrato córneo) se puede estimar el valor del coeficiente de permeabilidad en epidermis viva. Estos valores se muestran en la tabla 47. Al comparar los coeficientes de permeabilidad obtenidos en piel completa y estrato córneo y la permeabilidad calculada en epidermis viva, se comprueba que la permeabilidad que caracteriza al estrato córneo es mucho menor (K_p epidermis viva \gg K_p estrato córneo). Este hecho confirma que el estrato córneo presenta un índice de resistencia elevado, una capacidad aislante muy importante y con un alto grado de selectividad.

Comparación coeficientes de permeabilidad			
Nadolol			
Condición	Piel completa $K_p \times 10^5$ (cm \cdot h $^{-1}$)	Estrato córneo $K_p \times 10^5$ (cm \cdot h $^{-1}$)	Epidermis viva $K_p \times 10^5$ (cm \cdot h $^{-1}$)
Difusión pasiva	286 \pm 12	62.7 \pm 1.2	223 \pm 25
Etanol	658 \pm 15	34.7 \pm 2.2	623 \pm 11
Azone [®]	1744 \pm 34	97.0 \pm 4.5	1645 \pm 49
R-(+)-limoneno	305 \pm 6	17.9 \pm 1.0	287 \pm 4
Ácido oleico	1381 \pm 12	105 \pm 8	1276 \pm 23
Hidrocloruro de propranolol			
Difusión pasiva	815 \pm 21	41.8 \pm 3.0	773 \pm 32
Etanol	850 \pm 19	43.3 \pm 5.2	806 \pm 35
Azone [®]	1662 \pm 3	61.0 \pm 3.1	1601 \pm 22
R-(+)-limoneno	2097 \pm 28	69.1 \pm 1.0	2028 \pm 41
Ácido oleico	1327 \pm 41	140 \pm 11	1186 \pm 27

Tabla 47. Comparación de los coeficientes de permeabilidad (K_p) obtenidos *in vitro* en piel completa, estrato córneo y epidermis viva en las diferentes condiciones de pretratamiento con promotores. Valor medio \pm D.E.

Los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización de la cinética de paso a través del estrato córneo, de una duración no muy prolongada en el tiempo, son suficientes para evaluar parámetros como el reparto y la difusión de una sustancia, así como para evaluar el perfil de distribución de un fármaco en el estrato córneo y estimar el efecto producido por diferentes estrategias promotoras tales como los promotores químicos y la

iontoforesis. Todo ello indica que la técnica *tape-stripping* se puede utilizar para comparar la permeación percutánea de fármacos desde formulaciones tópicas.

Finalmente, es esencial examinar la posibilidad de administrar dosis terapéuticas del nadolol para su incorporación en un STAT. Como se ha mencionado anteriormente, los pacientes que sufren dos o más cefaleas migrañosas por mes y que se alivian sólo parcialmente con el tratamiento agudo pueden tratarse con nadolol a unas dosis diarias de 40-60 mg en diferentes tomas (Sweeney, 1992). En el capítulo IV aparecen recogidas las cantidades acumuladas en el compartimento receptor para el nadolol durante las 8 horas de ensayo iontoforético hasta su fin (30 horas). Como se observa, a las 8 horas la cantidad de nadolol que había accedido al compartimento receptor era de $1536 \pm 80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y tras el cese de iontoforesis, mediante paso pasivo, casi el doble, $2295 \pm 111 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Por tanto, considerando el aclaramiento plasmático (Cl_p) del nadolol ($\sim 16.8 \text{ L/h}$) y una concentración plasmática máxima de 69 ng/mL , valor que se obtiene tras la administración oral de 80 mg (Krukemyer y col., 1990) establecida como *concentración plasmática objetivo* (C_p) en estado estacionario, para lograr el efecto terapéutico, se puede aproximar la velocidad de entrada (V_{entrada}) necesaria del fármaco al organismo para mantenerla, por medio de la siguiente expresión:

$$C_p = \frac{V_{\text{entrada}}}{Cl_p} \quad \text{Ec. 22}$$

De tal manera que se requeriría una velocidad de entrada de 1.16 mg/h para alcanzar dicha concentración plasmática. Si se tiene en cuenta el flujo transdérmico de fármaco obtenido *in vitro* con iontoforesis a $0.50 \text{ mA}/\text{cm}^2$ sería necesario un sistema transdérmico con una superficie próxima a 5.40 cm^2 , lo cual resulta viable para la aplicación. Por último, si se menciona que el nadolol presenta una biodisponibilidad oral aproximada del 30% debido a una incompleta absorción digestiva y que ésta se reduce aún más en presencia de alimentos (Flórez, 2008), la administración transdérmica permitiría un mejor aprovechamiento de las dosis administradas, aspecto que también resulta relevante al considerar la viabilidad de la administración de nadolol a través de la piel.

Por todo ello, este estudio preliminar de la absorción transdérmica *in vitro* a través de piel de cerdo distingue a la iontoforesis respecto al resto de condiciones ensayadas como

la estrategia que podría permitir obtener una nueva forma farmacéutica que incluyera nadolol como principio activo para prevenir las crisis migrañosas.

Capítulo VI

Aplicación de iontoforesis en la absorción transdérmica *in vitro* de malato de almotriptán

1. Introducción

Actualmente, se utilizan varios tipos de fármacos en el tratamiento agudo de la migraña. Continuamente se ensayan nuevos principios activos que probada su eficacia, salen al mercado ampliando el arsenal terapéutico disponible para el tratamiento de esta enfermedad neurológica. Como ejemplo, se encuentran en estudio los gepantes, antagonistas del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (Hoffmann y Goadsby, 2012). A pesar de ello, los triptanes administrados vía oral continúan siendo uno de los tratamientos de elección (Lainez-Andres y col., 2013; Muzina y col., 2011; Tepper y Spears, 2009; Tfelt-Hansen, 2011), particularmente el almotriptán, fármaco con un perfil de seguridad, tolerancia y eficacia demostrada respecto a otros triptanes (Allais y col., 2010; Bussone y col., 2011; Díaz-Insa y col., 2011). Asimismo, el almotriptán se considera de primera elección en adolescentes (11-17 años de edad) (Linder y col., 2008) y cuando el paciente no acepta otro triptán (Diener y col., 2005; Lipton y col., 2005; Tfelt-Hansen, 2004).

De acuerdo con lo expuesto en epígrafes anteriores, este trabajo contempla la potencial administración de un principio activo de acción sistémica mediante iontoforesis

transdérmica. Basándonos en los prometedores resultados de los estudios transdérmicos *in vitro* realizados por nuestro grupo de investigación con el sumatriptán (Femenía-Font y col., 2005^a), se decidió llevar a cabo la investigación de una administración transdérmica *in vitro* con iontoforesis de almotriptán.

El malato de almotriptán se seleccionó por diversos motivos: presenta baja biodisponibilidad oral, no requiere dosis muy elevadas y posee características físico-químicas como masa molecular baja (469.5 g/mol) y carga positiva que hacen que pueda ser un buen candidato para ser administrado por vía transdérmica mediante la ayuda de la iontoforesis (Delgado-Charro y col., 1995^b; Lopez y col., 2003^b; Phipps y Gyory, 1992).

En este contexto, el trabajo que se detalla en el presente capítulo pretende caracterizar el transporte transdérmico del malato de almotriptán mediante iontoforesis e investigar el efecto de la densidad de corriente sobre dicho transporte. Para ello, se han llevado a cabo una serie de experimentos *in vitro* utilizando piel de oreja de cerdo.

2. Materiales y métodos

2.1. Malato de almotriptán

El fármaco empleado en los estudios de iontoforesis, malato de almotriptán (Código ATC N02C C05), fue generosamente suministrado por los Laboratorios Almirall (Barcelona, España) con una pureza del 98.9 % (m/m). El malato de almotriptán posee un valor de pKa de 8.77 a $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$. Las características del fármaco de estudio se muestran en la tabla 48.

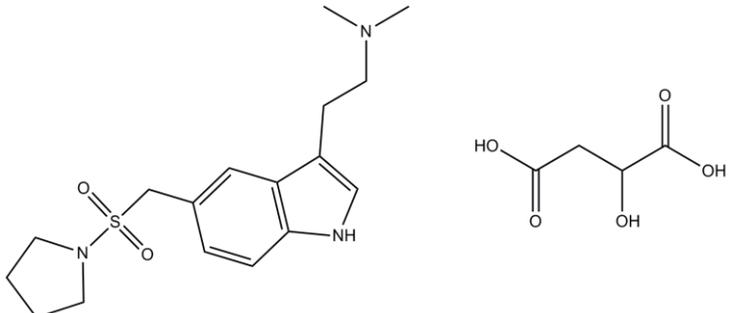
Malato de almotriptán	
Nombre químico	Malato de 1-[[[3-[2-(dimetilamino)etil]indol-5-il]metil]sulfonil]pirrolidina
Estructura química	
Fórmula empírica	$C_{17}H_{25}N_3O_2S \cdot C_4H_6O_5$
Peso molecular	469.56 g/mol
Lipofilia (pH 7.4)	$\log P = 1.87$
Solubilidad	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Agua y metanol: soluble ✓ Etanol y cloruro de metileno: poco soluble ✓ Agua a 20°C; 121 mg/mL
pKa	8.77
Punto fusión	~170°C
Forma física	Polvo cristalino blanquecino amarillento

Tabla 48. Características del malato de almotriptán.

2.2. Preparación de la piel

En los experimentos para la caracterización y estudio de la absorción transdérmica de almotriptán bajo la influencia de la iontoforesis se ha utilizado como membrana, al igual que en el capítulo IV, la piel de oreja de cerdo de 600 μm de espesor. Se ha elegido este modelo animal por sus características, de entre las que destaca el tener un punto isoelectrico muy semejante al de la piel humana, que la hace idónea para el estudio de la aplicación de iontoforesis (Marro y col., 2001^a; Sekkat y col., 2004).

El procedimiento seguido para la obtención y preparación de la piel de oreja de cerdo fue idéntico al descrito en el capítulo IV (apartado 2.2).

2.3. Células de difusión

Para llevar a cabo los experimentos se emplearon las mismas células de difusión que las descritas en el capítulo IV (apartado 2.3). Éstas son una variante del modelo de célula de Franz de flujo vertical. La piel se fija sobre el compartimento receptor con el estrato córneo hacia arriba, donde se coloca el compartimento dador. Los compartimentos se fijan con una pinza de acero de dimensiones adecuadas. El área útil de difusión de cada una de las células es de $0.567 \pm 0.008 \text{ cm}^2$ y su compartimento receptor tiene una capacidad aproximada de 4.2 mL (figura 21).

2.4. Solución tamponada de pH 7.4

La composición de las soluciones empleadas para llenar el compartimento dador y receptor, se detalla a continuación:

Composición de las fases		
	Fase dadora NaCl:HEPES (10:20 mM)	Fase receptora NaCl:HEPES (150:20 mM)
Cloruro sódico (NaCl)	0.584 g	8.766 g
HEPES	4.766 g	4.766 g
Agua ultrapura c.s.p.	1000 mL	1000 mL

Tabla 49. Composición de las fases dadoras y receptoras utilizadas en los ensayos de permeación (pH 7.4).

El cloruro sódico fue suministrado por Análisis Vínicos S.L (Tomelloso, Castilla la Mancha, España) y el HEPES de grado analítico por Sigma-Aldrich Química S.A. (Tres Cantos, Madrid, España). Una vez preparadas las soluciones, se almacenaron en frascos topacio a 4°C hasta su utilización. Antes de su uso se comprobó el pH final tal como se comenta en el epígrafe 2.4 del capítulo IV.

2.5. Preparación del sistema iontoforético: electrodos y puentes salinos

Para la realización de los experimentos de iontoforesis se utilizó el par reversible de electrodos de Ag/AgCl. Asimismo, a fin de evitar la competencia entre los iones sodio (Na^+) y el fármaco cuando se aplica la corriente eléctrica, se elaboraron puentes salinos con una concentración 0.1 M NaCl. De este modo el electrodo de Ag^0 se introduce en un tercer compartimento con una solución de NaCl. Éste se conecta con la solución dadora (malato de almotriptán disuelto en una solución de NaCl:HEPES de 10:20 mM) por medio del puente salino (Cázares-Delgadillo y col., 2007; Shao y Feldman, 2007).

La fabricación de los electrodos y los puentes salinos se ejecutó de acuerdo a la metódica descrita en el epígrafe 2.6.1 (Capítulo IV).

2.6. Ensayos de difusión transdérmica

Todos los ensayos de difusión transdérmica se realizaron a temperatura controlada [37.0 ± 0.1 °C; n=39].

Puesto que en los ensayos que se pretendía realizar se iba a estudiar en un primer momento la difusión pasiva del almotriptán y luego el efecto de la aplicación de iontoforesis a diferentes densidades de corriente eléctrica (0.25 y 0.50 mA/cm²), se seleccionaron unas células de difusión que permitieran la realización de los ensayos en las mismas condiciones. Por este motivo, para el presente estudio se utilizaron las mismas células que las descritas en el capítulo IV (apartado 2.3).

El protocolo seguido para situar la piel en las células de difusión fue idéntico al descrito para los experimentos de los beta-bloqueantes estudiados con anterioridad, nadolol e hidrocloreuro de propranolol (Capítulo IV).

Tanto para el estudio de difusión pasiva como con iontoforesis se dispuso en el compartimento dador 1 mL de una solución de malato de almotriptán (14.5 mM) preparada con una solución amortiguadora de pH de menor fuerza iónica (NaCl 10 mM-HEPES 20 mM) que la empleada en la solución receptora (NaCl 150 mM-HEPES 20 mM) previamente filtradas.

Las células se situaron dentro de un baño a temperatura constante sobre un multiagitador magnético, tal y como se describe en el apartado 2.7 y muestra la figura 26 del capítulo IV. Cuando se estudia la difusión pasiva, ambos compartimentos se sellan con Parafilm® M evitando así cualquier pérdida posible por evaporación. No obstante, si el estudio se centra en la iontoforesis, el dispositivo iontoforético consta de los puentes salinos, cuyos extremos se sumergen por un lado en los compartimentos dadores de las células de difusión y por otra parte a unos departamentos anexos de las mismas (solución de NaCl), que hacen posible la conexión de los electrodos de Ag/AgCl y éstos a su vez son conectados a un generador de corriente y sumergidos, de forma idéntica para los experimentos de iontoforesis descritos en el apartado 2.7, figuras 27 y 28, así como se muestra en la siguiente figura.

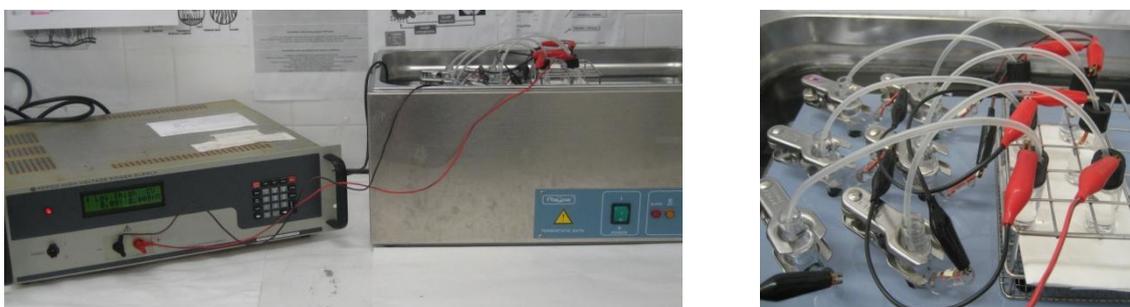


Figura 63. Aplicación de iontoforesis. Células de difusión inmersas en un baño a temperatura constante sobre un multiagitador conectados a un generador de corriente eléctrica.

La duración de todos los ensayos transdérmicos fue de 32 horas.

En los estudios de iontoforesis se aplicó corriente eléctrica (0.25 ó 0.50 mA/cm²) durante las primeras 8 horas, puesto que la iontoforesis *in vivo* no se aplica por periodos excesivamente prolongados. Tras el cese y retirada del sistema iontoforético, los ensayos prosiguieron hasta las 32 horas con difusión pasiva.

En todos los ensayos realizados con almotriptán, la toma de muestras, a tiempos predeterminados, consistió en extraer 200 µL del compartimento receptor y posterior reposición del mismo volumen. En el transcurso de cada ensayo se comprobó que las condiciones "sink" o sumidero se cumplían. El protocolo fue similar al descrito con anterioridad en el apartado 2.8 "Toma de muestras" del capítulo IV. La única diferencia fue que la última toma de muestras se efectuó a las 32 horas (véase figura 29).

Al finalizar cada uno de los experimentos, se procedió a la extracción del malato de almotriptán retenido en piel durante los ensayos de difusión. El procedimiento de extracción es idéntico al realizado con los otros fármacos de estudio y se detalla en el apartado 2.9 (Capítulo IV).

2.7. Valoración de las muestras

Con el fin de analizar las muestras obtenidas a partir de la realización de los ensayos de absorción transdérmica se adoptó, con ciertas modificaciones, un método analítico previamente validado, propuesto por los laboratorios Almirall, que permite la cuantificación de malato de almotriptán y sus impurezas además de ser útil en el proceso de control de calidad durante la fabricación a granel (Kumar y col., 2008).

El equipo empleado fue un sistema de cromatografía líquido-líquido de alta eficacia (HPLC) idéntico al detallado en el Capítulo III (apartado 2.3).

La separación de los componentes se llevó a cabo a temperatura ambiente (23 ± 2)°C empleando como fase estacionaria una columna de fase reversa (Kromasil® C₁₈) de longitud 250 mm, diámetro interno 4.6 mm y tamaño de partículas de sílice C₁₈ de 5 µm. La fase móvil empleada está compuesta por una mezcla de solución acuosa de amonio dihidrógeno fosfato monobásico y acetonitrilo (72:28, v/v), obtenidos ambos de Análisis Vínicos S.L. (Tomelloso, Castilla la Mancha, España). El pH de la mezcla se ajustó a pH 4.8 con ácido orto-fosfórico (0.05 M) (Panreac Química S.A.; Barcelona, España). La fase móvil se filtró, una vez preparada, a través de filtros MF Monitor Refills® (Millipore Corpotare; Billerica, MA, Estados Unidos) con un tamaño de poro de 0.45 µm. El flujo de la fase eluyente se mantuvo constante a 1 mL/min. Se inyectaron alícuotas de 50 µL. La cuantificación del malato de almotriptán en las muestras se realizó a la longitud de onda de 283.9 nm.

2.8. Análisis de datos

Para analizar la absorción transdérmica *in vitro* del malato de almotriptán a través de la piel de oreja de cerdo en las diferentes condiciones ensayadas se construyeron gráficas de las cantidades de fármaco acumuladas en el compartimento receptor Q (µg/cm²) frente al tiempo t (horas). El flujo transdérmico J se calculó a partir de la pendiente de la región

lineal de la gráfica obtenida (región denominada "estado estacionario"). El dato de periodo de latencia fue adquirido por extrapolación de la región lineal del perfil de permeación e intersección con el eje de las abscisas (tiempo).

Si se tiene en cuenta que la electrorrepulsión es el principal mecanismo implicado en el transporte de moléculas pequeñas y cargadas, como el almotriptán, y se determinan experimentalmente los valores de flujo transdérmico en los ensayos de iontoforesis aplicada en condiciones controladas, se puede calcular el número de transporte a partir de la ecuación 15 puntualizada en el capítulo IV.

Los flujos en el estado estacionario (J_{8h}) y los obtenidos en el tramo de difusión pasiva tras la aplicación de iontoforesis (J_{8-32h}), así como las cantidades de almotriptán retenidas en la piel tras las 32 horas de ensayo y los periodos de latencia (t_0), se compararon entre sí mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). El nivel de confianza fue del 95% de modo que existen diferencias significativas cuando el valor de probabilidad obtenido es inferior al 5%. A continuación se realizaron pruebas de comparaciones múltiples mediante pruebas de Scheffé en el caso de obtener varianzas homogéneas o, la prueba T3 de Dunnet para varianzas heterogéneas.

En los casos en los que se detectaron diferencias en los valores de flujos transdérmicos de los distintos grupos (ANOVA, $p < 0.05$), se calculó el efecto promotor (EP) de acuerdo con la ecuación 23.

$$EP = \frac{\text{Flujo con aplicación de iontoforesis}}{\text{Flujo sin aplicación de iontoforesis (control)}} \quad \text{Ec. 23}$$

3. Resultados y discusión

La absorción transdérmica *in vitro* del malato de almotriptán han sido estudiados durante 32 horas en diversas condiciones experimentales: difusión pasiva y aplicación de corriente eléctrica. Los experimentos se realizaron utilizando células de difusión estandarizadas y como membrana, piel de oreja de cerdo de 600 μm de espesor.

El estudio de iontoforesis se centró en la evaluación del efecto de la densidad de corriente aplicada: 0.25 mA/cm², correspondiente ésta a una intensidad de 0.142 mA y, el doble 0.50 mA/cm² (0.284 mA). La máxima densidad de corriente tolerable en humanos sin perjuicio para el paciente es de 0.50 mA/cm², pero eligiendo una densidad de corriente menor se minimizan los posibles daños en la piel (irritación y/o edema) y se consigue mejor tolerancia por parte del paciente, aumentando su confort, y en consecuencia, su cumplimiento terapéutico.

Durante las primeras horas de estudio iontoforético el voltaje requerido incrementó aproximadamente un 6.31% y 13.8% para las correspondientes densidades estudiadas 0.25 y 0.50 mA/cm². Posteriormente, el voltaje se redujo ligeramente y se mantuvo constante, durante las 8 horas de aplicación de iontoforesis.

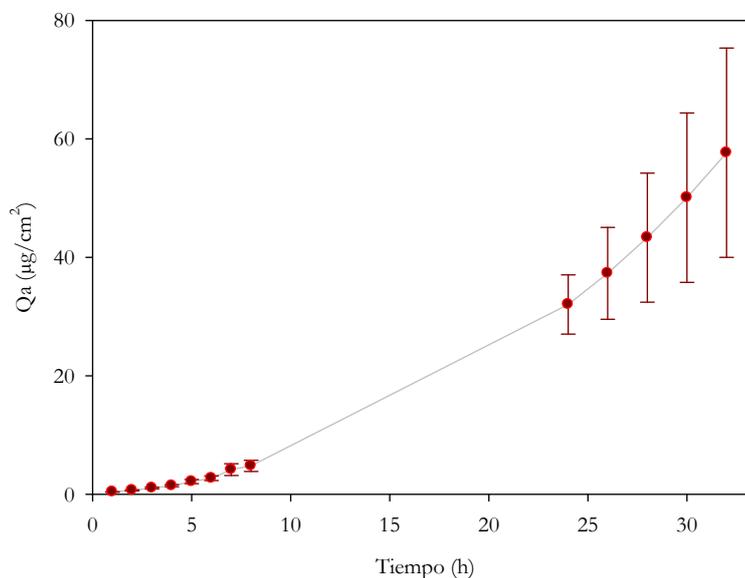
Las tablas que se muestran a continuación (50, 51 y 52) muestran las cantidades acumuladas medias de almotriptán (Q_a , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en el compartimento receptor calculadas a diferentes horas en los ensayos de difusión. Con esos datos, se calculó la cinética media de penetración cutánea en cada condición. En dichas tablas se representan las cinéticas asociadas y las barras de error revelan la desviación estándar de la media (D.E.).

También se presentan los tiempos de latencia (t_0 , h) y los valores de flujo transdérmico [J , $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\text{h})$] de las primeras 8 horas y de 8 a 32 horas, equivalente este periodo al tramo post-iontoforesis cuando se aplica el método físico a estudiar.

Control: DIFUSIÓN PASIVA [n=12]

Cantidades acumuladas de malato de almotriptán en el compartimento receptor

Tiempo (horas)	$Q_a \pm D.E.$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
1	0.39 ± 0.04
2	0.67 ± 0.09
3	1.06 ± 0.14
4	1.44 ± 0.16
5	2.15 ± 0.36
6	2.70 ± 0.39
7	4.16 ± 0.99
8	4.80 ± 0.94
24	32.0 ± 5.0
26	37.3 ± 7.8
28	43.3 ± 10.9
30	50.1 ± 14.3
32	57.7 ± 17.7



Parámetros de permeación

 J_{0-8h} ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) J_{8-32h} ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) t_0 (h) 0.64 ± 0.11 2.10 ± 0.64 13.9 ± 2.8

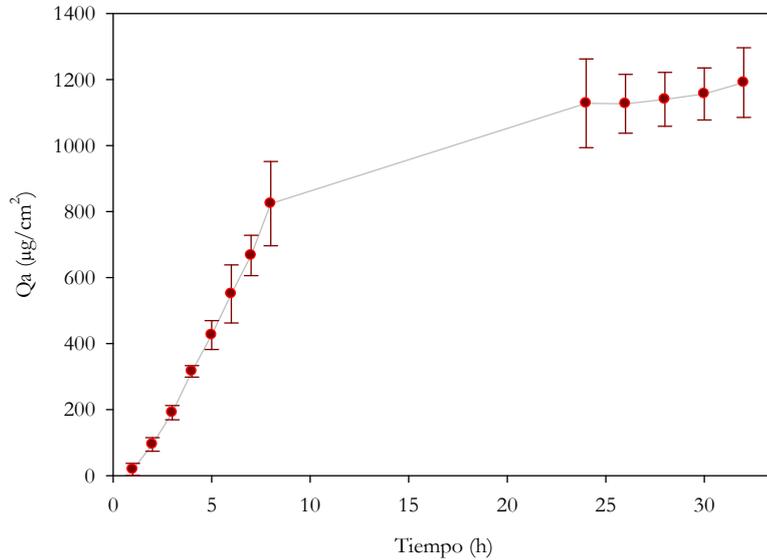
Tabla 50. Cantidades acumuladas medias (Q_a) de malato de almotriptán en el compartimento receptor frente al tiempo para el grupo control (difusión pasiva sin aplicación de iontoforesis) (Media \pm D.E.) (datos a la izquierda y gráfica a la derecha), flujos transdérmicos medios (J) para las primeras 8 horas (J_{0-8h}) y de 8 a 32 horas (J_{8-32h}) y tiempo de latencia (t_0) (Media \pm D.E.).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

IONTOFORESIS 0.25 mA/cm² [n=5]

Cantidades acumuladas de malato de almotriptán en el compartimento receptor

Tiempo (horas)	Q _a ± D.E. (µg/cm ²)
1	18.9 ± 18.3
2	94.5 ± 20.6
3	191 ± 22
4	316 ± 17
5	426 ± 44
6	551 ± 88
7	667 ± 61
8	824 ± 128
24	1128 ± 134
26	1127 ± 89
28	1140 ± 82
30	1156 ± 78
32	1191 ± 106



Parámetros de permeación

J_{0-8h} (µg·cm⁻²h⁻¹)

J_{8-32h} (µg·cm⁻²h⁻¹)

t₀ (h)

115 ± 17

15.3 ± 3.0

1.53 ± 0.11

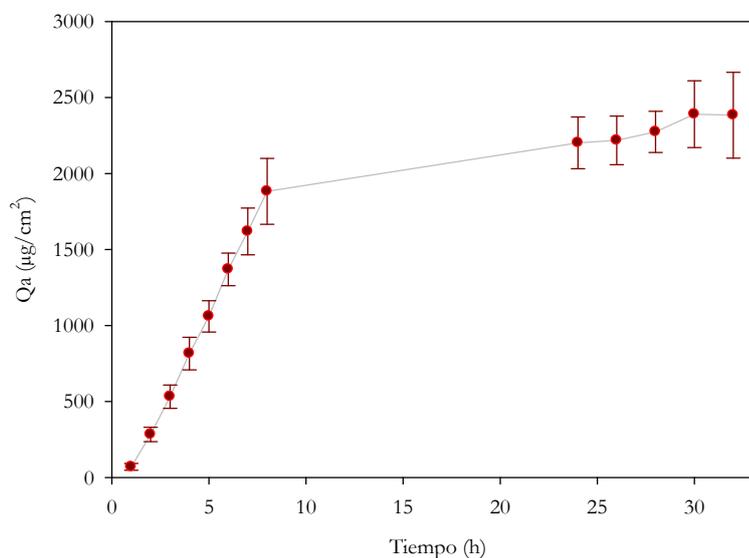
Tabla 51. Cantidades acumuladas medias (Q_a) de **malato de almotriptán** en el compartimento receptor frente al tiempo obtenidas con **iontoforesis 0.25 mA/cm²** (Media ± D.E.) (datos a la izquierda y gráfica a la derecha) y flujos transdérmicos medios (J) para las primeras 8 horas de aplicación de corriente eléctrica y tras su cese (flujo post-iontoforesis) y tiempo de latencia (t₀) (Media ± D.E.).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

IONTOFORESIS 0.50 mA/cm² [n=5]

Cantidades acumuladas de malato de almotriptán en el compartimento receptor

Tiempo (horas)	Q _a ± D.E. (µg/cm ²)
1	70.3 ± 22.1
2	283 ± 47
3	532 ± 77
4	816 ± 107
5	1060 ± 103
6	1369 ± 107
7	1619 ± 154
8	1883 ± 217
24	2202 ± 170
26	2218 ± 160
28	2274 ± 136
30	2390 ± 220
32	2384 ± 282



Parámetros de permeación

J_{0-8h} (µg·cm⁻²h⁻¹)

264 ± 24

J_{8-32h} (µg·cm⁻²h⁻¹)

21.2 ± 5.9

t₀ (h)

1.01 ± 0.04

Tabla 52. Cantidades acumuladas medias (Q_a) de **malato de almotriptán** en el compartimento receptor frente al tiempo obtenidas con **iontoforesis 0.50 mA/cm²** (Media ± D.E.) (datos a la izquierda y gráfica a la derecha) y flujos transdérmicos medios (J) para las primeras 8 horas de aplicación de corriente eléctrica y tras su cese (flujo post-iontoforesis) y tiempo de latencia (t₀) (Media ± D.E.).

El valor [n] representa el número de ensayos realizados.

Las cinéticas medias de todos los ensayos realizados bajo condiciones de una fuerza iónica NaCl 10 mM e intentando eliminar al máximo la competición de iones mediante la utilización de puentes salinos se muestran en la figura 64.

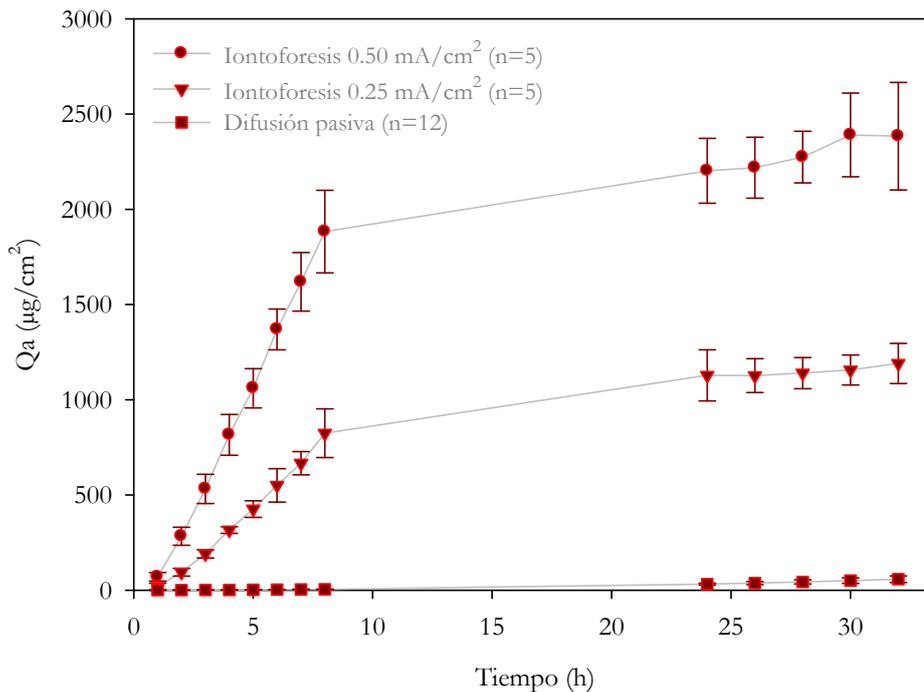


Figura 64. Cantidades acumuladas medias de **malato de almotriptán** en el compartimento receptor ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) frente al tiempo (h) para las condiciones de **iontoforesis** ensayadas. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Como se puede observar, la cantidad de almotriptán en el compartimento receptor a la hora 32 (fin de los ensayos) fue mucho menor en el ensayo de difusión pasiva ($57.7 \pm 17.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, media \pm D.E.; $n=12$) que las obtenidas con la aplicación de una densidad de corriente de $0.25 \text{ mA}/\text{cm}^2$ ($1191 \pm 106 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, media \pm D.E.; $n=5$) ó $0.50 \text{ mA}/\text{cm}^2$ ($2384 \pm 282 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, media \pm D.E.; $n=5$). Con iontoforesis, las cantidades acumuladas de fármaco en el compartimento receptor mostraron diferencias estadísticas respecto al control (difusión pasiva) ($p < 0.01$, test Scheffé). Asimismo, al aplicar una densidad de corriente eléctrica mayor ($0.50 \text{ mA}/\text{cm}^2$) se produce un incremento estadísticamente significativo en la cantidad de almotriptán acumulado respecto al grupo al que se le aplicó iontoforesis de $0.25 \text{ mA}/\text{cm}^2$ ($p < 0.01$).

Otra cuestión de interés es el tiempo que se requiere para alcanzar el equilibrio de flujo transdérmico. Como se puede observar en las tablas anteriores, los periodos de latencia obtenidos por difusión pasiva ($\sim 14\text{h}$) respecto a los de la iontoforesis ($\sim 1\text{h}$) difieren en muchas horas. Éstos presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, T3 Dunnet) entre la difusión pasiva y iontoforesis. La presencia de co-iones y

contraiones endógenos dentro de la piel y procedentes del cuerpo tiene un efecto considerable en el flujo por iontoforesis del fármaco ya que actúan como especies competidoras por la carga. Phipps y Gyory han descrito una liberación continua (8 horas) endógena de sodio y potasio durante la iontoforesis de una solución de LiCl a través de piel dermatomizada. El tiempo requerido para alcanzar el flujo máximo dependería por lo tanto, de cuánto tiempo tarda en desaparecer la reserva iónica preexistente en la piel. Es admisible que, manteniendo constante el resto de variables, esta reserva se agote más lentamente en piel completa que en piel dermatomizada (utilizada en este estudio). De acuerdo con estos autores, la presencia de co-iones endógenos introduce un tiempo de latencia aparente en el flujo de principio activo y una pequeña curvatura en la representación gráfica en cantidad acumulada liberada frente al tiempo (Phipps y Gyory, 1992). La relevancia de este periodo de latencia en una situación *in vivo* no está completamente caracterizada.

La figura 64 muestra como los ensayos con iontoforesis del almotriptán presentan cinéticas aparentemente en meseta. Esto es debido a que al interrumpir la corriente eléctrica, el fármaco sigue absorbiéndose por difusión pasiva hasta las 32 horas. Estudios previos han sugerido que la corriente eléctrica induce alteraciones epidérmicas a modo de poros que incrementan la permeabilidad de la piel (Inada y col., 1994) aunque con beneficio limitado para la permeación de macromoléculas (Smyth y col., 2009). *In vivo*, las alteraciones epidérmicas revierten en un corto plazo de tiempo, no siendo igual en *in vitro*.

Teniendo en cuenta que el fármaco presenta un pKa aproximado de 8 a pH 7.4 se encuentra cargado positivamente y éste presenta, tras el cese de la aplicación de iontoforesis, una disminución de casi un 13% del flujo transdérmico del almotriptán, se puede determinar que la electrorrepulsión y electroósmosis son los mecanismos principales presentes durante la iontoforesis.

Si se consideran los flujos transdérmicos obtenidos en las primeras 8 horas, para poder comparar el efecto de la iontoforesis, y tras el cese de ésta para determinar la posible diferencia de difusión pasiva post-iontoforética, se evidencia que sí existe un incremento de paso transdérmico de almotriptán respecto al control (difusión pasiva) cuando se aplica iontoforesis, siendo más evidente con 0.50 mA/cm² (test Scheffé, $p < 0.01$). La tabla 53 resume los valores de flujo transdérmico de almotriptán obtenidos en las diferentes condiciones ensayadas.

Flujo transdérmico de malato de almotriptán		
Condición	J_{0-8h} ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\text{h}^{-1}$) (Media \pm D.E.)	J_{8-32h} ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\text{h}^{-1}$) (Media \pm D.E.)
Difusión pasiva	0.64 \pm 0.11	2.10 \pm 0.64
Iontoforesis (0.25 mA/cm ²)	115 \pm 17 ^{a**}	15.3 \pm 3.0 ^{a*}
Iontoforesis (0.50 mA/cm ²)	264 \pm 24 ^{ab**}	21.2 \pm 5.9 ^{a*}

Tabla 53. Flujos transdérmicos medios (J) para las primeras 8 horas de aplicación de corriente eléctrica (J_{0-8h}) y en el tramo de 8 a 32 horas (J_{8-32h}) (Media \pm D.E.). [* ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$)].

^a diferencia estadísticamente significativa respecto al control (difusión pasiva).

^b diferencia estadísticamente significativa respecto a 0.25 mA/cm².

Cuando se detectaron diferencias significativas entre los grupos, se determinó la capacidad promotora de cada condición ensayada expresada como el efecto promotor (EP) respecto a grupo control (difusión pasiva) de acuerdo con la ecuación 23. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Efecto promotor	
Condición	EP respecto al control (Media \pm D.E.)
Iontoforesis (0.25 mA/cm ²)	180 \pm 41
Iontoforesis (0.50 mA/cm ²)	411 \pm 80 ^{**}

Tabla 54. Efecto promotor (EP) de las condiciones ensayadas en los estudios de densidad de corriente. ** diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.01$).

Si se observan los efectos promotores proporcionados por ambas densidades de corriente se evidencia como se incrementa el paso transdérmico de almotriptán de una manera importante respecto a su difusión pasiva. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas densidades ($p > 0.05$), cuando se aplicó 0.50 mA/cm², el efecto promotor fue aproximadamente 2.28 veces mayor que con 0.25 mA/cm². Estos resultados ratifican estudios previos realizados por otros autores (Burnette y Ongpipatanakul, 1987; Femenía-Font y col., 2005^a; Guy y col., 2001; Schuetz y col., 2006). Sin embargo, aunque los valores medios obtenidos muestran una relación lineal entre el efecto promotor de la densidad de corriente aplicada y el flujo transdérmico de almotriptán ($r=0.99$), la dispersión de los resultados no apoyan esta conclusión.

Con el fin de evidenciar con mayor claridad el impacto que los electrolitos presentes en la solución dadora ejercían sobre el transporte del fármaco en estudio, se calculó el número de transporte del malato de almotriptán (véase tabla 55), tal y como se describe en el apartado 2.11 (Capítulo IV), considerando los valores de flujo transdérmico individuales obtenidos para cada una de las células en cada condición iontoforética ensayada.

Número de transporte	
Condición	Número de transporte (%) (Media \pm D.E.)
Iontoforesis (0.25 mA/cm ²)	2.18 \pm 0.33
Iontoforesis (0.50 mA/cm ²)	2.49 \pm 0.23

Tabla 55. Número de transporte del malato de almotriptán (expresado en porcentaje) para la aplicación de iontoforesis en diferentes densidades de corriente eléctrica (0.25 y 0.50 mA/cm²) (Media \pm D.E.).

Tal y como se detalla en la tabla 54, el número de transporte del almotriptán se mantiene en valores próximos a 0.0218 (0.25 mA/cm²) y 0.0249 (0.50 mA/cm²) al mantener una fuerza iónica constante compuesta por la solución dadora (10 mM NaCl) y unos puentes salinos cuya finalidad era evitar la competición de los iones con el fármaco cargado positivamente. Se realizaron ensayos iontoforéticos previos al expuesto en el presente trabajo, también con malato de almotriptán y en las mismas condiciones experimentales pero sin la presencia de puentes salinos en los ensayos *in vitro*, y se puso en evidencia la necesidad de utilizar algún método de eliminación de competición iónica ya que los números de transporte obtenidos fueron casi 10 veces menores (\sim 13%) a los expuestos en el presente trabajo. Los datos expuestos en este trabajo confirman la efectividad de los ensayos iontoforéticos *in vitro* con la mínima competencia iónica.

Al finalizar cada ensayo se determinó la cantidad de almotriptán retenida en la piel (véase figura 65).

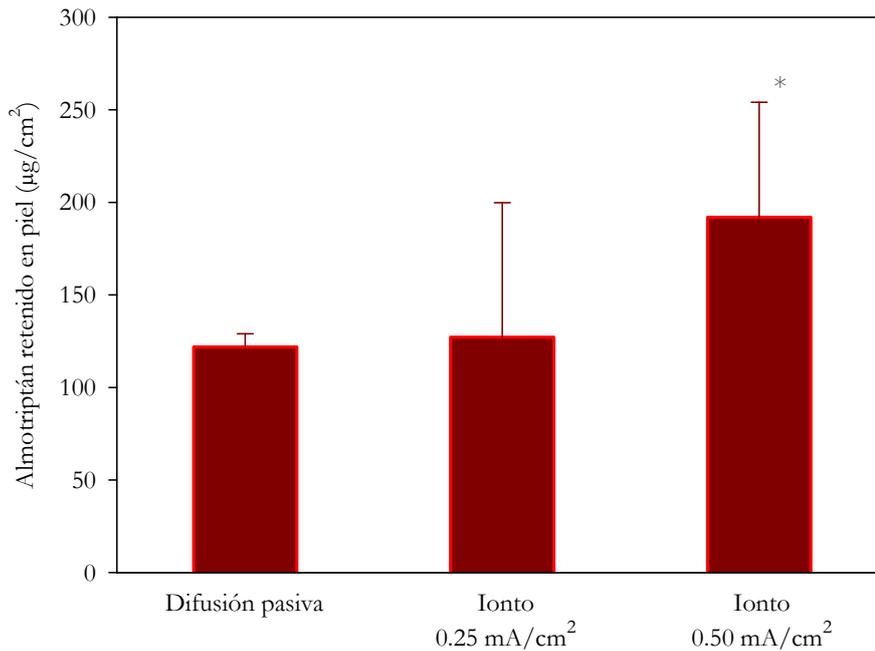


Figura 65. Cantidad de malato de almotriptán retenido en piel al fin de los experimentos. Las barras de error representan las desviaciones estándar. * diferencia estadísticamente significativa respecto a la difusión pasiva ($p < 0.05$, test Scheffé).

Las cantidades retenidas en piel fueron similares entre difusión pasiva ($122 \pm 7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) y la densidad de corriente $0.25 \text{ mA}/\text{cm}^2$ ($127 \pm 73 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Sin embargo, tras las 8 horas de aplicación de $0.50 \text{ mA}/\text{cm}^2$ y posterior permeación pasiva hasta la finalización de los ensayos (hora 32), la cantidad de almotriptán retenida en piel fue significativamente diferente respecto al control ($p < 0.05$) ($192 \pm 62 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Una posible explicación de este fenómeno es la formación de poros intercelulares, siendo más clara con densidades de corriente elevadas, durante la iontoforesis (Fatouros y col., 2006) reteniéndose en mayor medida el fármaco en la piel.

Este trabajo estuvo motivado por los resultados que se obtuvieron en estudios *in vitro* realizados en el laboratorio con solución de succinato de sumatriptán en el que se ensayaron promotores químicos (Femenía-Font y col., 2005^b) y la técnica de iontoforesis (Femenía-Font y col., 2005^a) para determinar la estrategia más eficaz para incrementar el paso de este triptán a través de la piel.

Las condiciones experimentales con el succinato de sumatriptán fueron ligeramente diferentes. Por ejemplo, los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y se emplearon

células de difusión similares a las celdas de tipo horizontal diseñadas por el Dr. Thomas J. Franz (Franz, 1975) con un tabique que separa en dos el compartimento dador y volúmenes mucho mayores a los utilizados en el presente capítulo. No obstante, teniendo en cuenta dichas condiciones experimentales, los datos considerados relevantes del succinato de sumatriptán han sido el flujo transdérmico en difusión pasiva ($\sim 0.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$) y la obtenida con la densidad de corriente de $0.25 \text{ mA}/\text{cm}^2$ con una fuerza iónica de 25 mM ($526 \pm 34 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$) (Femenía-Font y col., 2005^a).

Se observó que la iontoforesis incrementaba en gran medida el flujo de sumatriptán a través de la piel, mostrando la posibilidad de utilizar la vía transdérmica para el tratamiento agudo de la migraña. Y así, estos resultados permitieron afirmar que la aplicación de corriente eléctrica sobre la piel incrementa extraordinariamente el flujo de sumatriptán. Posteriormente, se desarrollaron STATs con sumatriptán (Femenía-Font y col., 2006; Balaguer-Fernández y col., 2010) que proporcionaron valores de flujo transdérmico que sostienen la posibilidad de desarrollar un sistema transdérmico capaz de proporcionar niveles terapéuticos eficaces de dicho agente antimigrañoso.

Por todo ello, se determinó la continuidad del proyecto de investigación, iniciado con el sumatriptán, planteando como hipótesis de trabajo la posibilidad de obtener resultados similares al aplicar la iontoforesis al almotriptán. Para ello se escogió el almotriptán y aquella técnica más útil con el triptán análogo, la iontoforesis.

Las diferencias observadas en el flujo transdérmico de los dos triptanes se pueden explicar analizando sus diferentes estructuras químicas y propiedades físico-químicas. El almotriptán presenta un peso molecular ligeramente superior (335.46 g/mol como base y 469.56 g/mol como malato de almotriptán) al triptán estudiado con anterioridad (295.49 g/mol el sumatriptán y 413.48 g/mol con succinato). El almotriptán es más lipófilo ($\log P=1.8$) que el sumatriptán ($\log P=0.9$). Asimismo, el almotriptán presenta un grupo pirrolidina en su estructura que le confiere una disposición molecular menos empaquetada (Ravikumar y col., 2008). Teniendo en cuenta estos tres aspectos y los datos obtenidos en este trabajo se puede considerar una contribución superior de la electroósmosis en el transporte del almotriptán que para el sumatriptán (Guy y col., 2001; Phipps y Gyory, 1992; Pikal, 2001).

La posibilidad de administrar a través de la piel el almotriptán es evidente observando los resultados obtenidos, así como estudios similares con otros triptanes. Patel y colaboradores confirmaron el potencial desarrollo de un sistema iontoforético de administración transdérmica en el tratamiento de la migraña. En sus experimentos, un sistema tipo reservorio de 4 cm² proporcionó un flujo *in vitro* de sumatriptán de 153 ± 25 µg/cm²h (Patel y col., 2007). Por otra parte, se realizaron estudios de aplicación de iontoforesis a partir de otro sistema terapéutico NP101. Este sistema NP101 [Zelrix (NuPathe Inc., Conshohocken, PA)] proporcionó perfiles plasmáticos constantes de sumatriptán durante más de 7 horas (Siegel y col., 2007) y estudios clínicos recientes muestran su eficacia y tolerabilidad en humanos (Goldstein y col. 2012; Pierce y col., 2009; Smith y col., 2012). Finalmente, en enero de 2013, la FDA ha aprobado un STAT iontoforético llamado Zecuity™ fabricado por la compañía farmacéutica Nupathe que libera 6.5 mg de sumatriptán durante el transcurso de 4 horas. El parche presenta unas dimensiones próximas a 20 cm de largo y 10 cm de ancho con una pequeña batería y un chip electrónico que regulan la carga para asegurar que el paciente reciba la dosis correcta (Drugs@FDA, 2013; Zecuity, 2013).

También se han estudiado otros triptanes para poderlos administrar a través de la piel. Patel y colaboradores han demostrado *in vitro* e *in vivo* la obtención de flujos iontoforéticos de zolmitriptán (Patel y col., 2009) apropiados para su uso en migraña debido a la baja dosis requerida (~5 mg/día) (Jhee y col., 2001). Asimismo, se han realizado recientemente ensayos para seleccionar, entre distintas formulaciones, un nuevo STAT con zolmitriptán (Subedi y col., 2011). Además de la aplicación de la iontoforesis también se ha evaluado la posibilidad de emplear otros sistemas, como los liposomas ultradeformables con triptanes como el sumatriptán (Balaguer-Fernández y col., 2011) y el rizatriptán (Garg y col., 2008). Los liposomas de rizatriptán han sido evaluados *in vitro* e *in vivo* mostrando la posibilidad futura como opción a la terapia migrañosa (Garg y col., 2008).

Si se analizan las propiedades farmacocinéticas del malato de almotriptán, su aclaramiento plasmático total en humanos es alrededor de 37 L/h y la concentración plasmática máxima media tras la administración de 12.5, 25 ó 50 mg de almotriptán vía oral se encuentra entre 52 ng/mL con la dosis más baja y 213.5 ng/mL con la más alta (Carretero, 2001; McEnroe y Fleishaker, 2005; Tfelt-Hansen y col., 2000). Si se toma como referencia la concentración plasmática obtenida con la dosis empleada en el tratamiento de la migraña (12.5 mg), como *concentración plasmática objetivo* en estado estacionario, se

requeriría una velocidad de entrada de 1.93 mg/h para alcanzar dicha concentración plasmática. Considerando el flujo transdérmico (J_{0-8h}) obtenido en los estudios realizados *in vitro* con 0.50 mA/cm² ($264 \pm 24 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$), el área mínima de un sistema transdérmico necesario para que fuera efectivo debería ser de unos 7.2 cm². Esta extrapolación debe interpretarse con cautela, teniendo en cuenta que los valores de flujo han sido obtenidos empleando piel de oreja de cerdo y que la permeabilidad *in vivo* es menor que en *in vitro*.

No obstante, con los valores de flujo transdérmico iontoforético alcanzados se puede estimar que es posible administrar a través de piel este fármaco. Asimismo, valorando que el almotriptán muestra ventajas frente a otros triptanes como el sumatriptán, zolmitriptán y rizatriptán, ya que presenta un riesgo menor de efectos secundarios, es mejor tolerado entre los pacientes y su relación coste-efectividad está demostrada (Allais y col., 2010; Antonaci y col., 2010; Bussone y col., 2011; Chen y Ashcroft, 2007; Díaz-Insa y col., 2011; Sandrini y col., 2007), se vislumbra la absorción transdérmica con iontoforesis como una buena estrategia para una administración terapéutica del almotriptán, para el tratamiento sintomático de la migraña.

Capítulo VII - Chapter VII

Resumen y conclusiones - Abstract and conclusions

1. Resumen y conclusiones

El trabajo de Tesis Doctoral que se presenta constituye un eslabón de un amplio proyecto encaminado a desarrollar sistemas terapéuticos de administración transdérmica para el tratamiento de la migraña.

La migraña es un trastorno crónico de carácter transitorio que se caracteriza por presentar episodios recurrentes de cefalea. Ésta destaca por su frecuencia y por el impacto negativo que ejerce sobre la calidad de vida de la persona que la padece. En los últimos años la prevalencia de esta enfermedad neurológica ha aumentado considerablemente, en el mundo una de cada cinco personas la padece y en España un 12.6% de la sociedad la sufre.

Por ello, es importante el desarrollo de formas farmacéuticas que incluyan fármacos antimigrañosos eficaces tales como los beta-bloqueantes para la prevención de las crisis y los triptanes como tratamiento sintomático, que permitan utilizar vías de administración como la transdérmica, que resulten adecuadas para una mayor tolerancia y comodidad del paciente a la terapia. No obstante, debido a que la piel humana constituye una eficiente barrera que limita o impide el paso de sustancias a su través y restringe la utilidad de la vía transdérmica en terapéutica, para proporcionar niveles plasmáticos eficaces en numerosos

casos se requiere el empleo de distintas estrategias que incrementen el paso de fármacos a través de la piel, tales como sustancias químicas susceptibles de actuar como promotores de absorción y métodos físicos, como la iontoforesis.

Los objetivos principales del trabajo que se describe en la presente memoria difieren según se trate de estudiar la absorción transdérmica de dos beta-bloqueantes, nadolol e hidrocloreuro de propranolol, o el almotriptán a través de piel de cerdo.

Por una parte, el estudio tuvo como finalidad caracterizar y comparar la absorción transdérmica *in vitro* del nadolol e hidrocloreuro de propranolol, estudiar el efecto que tiene sobre la misma la aplicación de promotores químicos e iontoforesis y, dado que la mayoría de técnicas de promoción comprometen la función barrera de la piel, evaluar y cuantificar ambos fármacos en el estrato córneo y determinar los parámetros dermatofarmacocinéticos de los fármacos en su difusión a través del estrato córneo.

Con el fin de caracterizar la absorción transdérmica de ambos beta-bloqueantes, es necesario llevar a cabo ensayos de difusión transdérmica. Para ello, se requiere de dos métodos analíticos que permitan cuantificar el nadolol e hidrocloreuro de propranolol de las muestras que se obtienen de estos ensayos. En el trabajo que se presenta se han validado dos métodos HPLC sencillos con detección en el UV que permiten cuantificar la absorción transdérmica de ambos fármacos (capítulo III). La separación se realizó en una columna Kromasil® C₁₈ a temperatura ambiente. La respuesta del detector, a 269 ó 291 nm según fuese nadolol o hidrocloreuro de propranolol, fue lineal en todo el intervalo de concentraciones validado [(0.17-167 μM) nadolol y (0.11-113 μM) hidrocloreuro de propranolol]. Ambos resultan exactos y precisos con errores relativos inferiores al 5.19% (nadolol) y 3.57% (propranolol) y coeficientes de variación inter e intradía inferiores al 6.08% (nadolol) y 7.28% (propranolol). Los límites de detección y cuantificación fueron 0.058 y 0.171 μM para el nadolol y 0.038 y 0.115 μM para el hidrocloreuro de propranolol, respectivamente. Asimismo, ambos métodos analíticos presentaban capacidad suficiente de poder sufrir pequeñas variaciones en variables como la longitud de onda y en las fases móviles sin mostrar diferencias significativas, demostrándose así la robustez de los métodos.

Una vez validados ambos métodos analíticos, se caracterizó la absorción *in vitro* del nadolol e hidrocloreuro de propranolol y se estudió el efecto que tenía sobre ella la aplicación de promotores químicos de la absorción y la iontoforesis (capítulo IV). Como

cabría esperar, el flujo por difusión pasiva del fármaco más lipófilo (propranolol) a través de piel de cerdo fue superior, $48.9 \pm 1.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$, al del nadolol, $17.1 \pm 0.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$. El pretratamiento de la piel de cerdo con etanol (vehículo de los promotores químicos), Azone[®], R-(+)-limoneno, ácido caproico y ácido oleico (al 5% en etanol, m/m) así como la aplicación de dos densidades de corriente eléctrica 0.25 y 0.50 mA/cm² produjeron efectos desiguales según el fármaco estudiado.

En el caso del nadolol, el pretratamiento con Azone[®] y ácido oleico ha mostrado un mayor efecto promotor respecto a la difusión pasiva. Pero sólo el Azone[®] produjo un incremento significativo del transporte transdérmico (7.18 veces respecto del flujo del control) ($p < 0.01$). De todos los promotores ensayados, el R-(+)-limoneno no fue capaz de promover la absorción del nadolol. Aunque alguna de las sustancias químicas empleadas es capaz de aumentar el flujo del nadolol, es sin duda la utilización de iontoforesis la que origina un mayor incremento en el transporte de la molécula, concretamente la aplicación de 0.50 mA/cm² produjo un flujo transdérmico de nadolol de $216 \pm 11 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (14.8 veces su flujo pasivo).

Por otra parte, el tratamiento con sustancias químicas y corriente eléctrica en el transporte percutáneo de hidrocloreto de propranolol manifestó un efecto promotor moderado. De todas las condiciones, el R-(+)-limoneno y la densidad de corriente superior (0.50 mA/cm²) han demostrado poseer la mayor capacidad para aumentar el flujo de propranolol, dando lugar a flujos de $106 \pm 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ y $108 \pm 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ respectivamente, incrementándose aproximadamente 1.88 veces el flujo transdérmico observado con el control. El Azone[®] y ácido oleico también actuaron como promotores de absorción transdérmica aunque en menor medida, aumentaron 1.74 y 1.39 el flujo de fármaco.

Así pues, el hecho de aplicar la iontoforesis no produjo el mismo efecto. La comparación de los flujos obtenidos en las primeras 8 horas con 0.25 mA/cm², $120 \pm 21 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (nadolol) y $61.6 \pm 7.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (hidrocloreto de propranolol) así como con el doble de densidad de corriente eléctrica (0.50 mA/cm²), $216 \pm 11 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (nadolol) y $108 \pm 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (propranolol), establecen diferencias estadísticamente significativas entre ambos fármacos ($p < 0.05$). Estos resultados muestran una clara influencia de la densidad de corriente para modular el paso a través de la piel de un fármaco modificando dicha densidad, además del importante efecto promotor que proporciona esta estrategia física para incrementar el flujo del fármaco más hidrófilo, el nadolol.

Tras la caracterización de la absorción transdérmica de ambos beta-bloqueantes a través de piel de cerdo, se cuantificaron y compararon los perfiles de distribución *in vitro* de los fármacos en el estrato córneo y, con el fin de explicar el efecto de las distintas estrategias promotoras ensayadas, se calcularon los parámetros dermatofarmacocinéticos, tales como reparto (K) y difusión (D/H^2), así como la cantidad de fármaco en la capa más superficial de la piel (capítulo V). Para el nadolol, la iontoforesis a 0.50 mA/cm^2 aumentó la cantidad total de fármaco presente en el estrato córneo, $9.61 \pm 1.28 \text{ mg/cm}^3$ (casi 3 veces más que por difusión pasiva) y el Azone[®] y ácido oleico proporcionaron valores de reparto y difusión estadísticamente diferentes al resto de condiciones ($p < 0.05$). Asimismo, su análogo hidrocloreuro de propranolol por difusión pasiva presentó un parámetro de reparto elevado (4.37 ± 0.62) aunque fue en presencia de ácido oleico cuando se alcanzó un mayor valor de K y una cantidad de fármaco en estrato córneo superior al resto de condiciones ($p < 0.05$) y similar a 0.50 mA/cm^2 . Paralelamente, se examinaron las cantidades acumuladas en el compartimento dador tras los ensayos y se observó que eran menores en los experimentos con nadolol. Se determinó así que el incremento de la cantidad de nadolol en el estrato córneo, sobretudo con la iontoforesis, era consecuencia del paso de fármaco a su través.

Basándonos en los prometedores resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación con el sumatriptán, el segundo objetivo principal del trabajo fue estudiar la viabilidad de una administración iontoforética del antimigrañoso malato de almotriptán (capítulo VI). El flujo transdérmico de almotriptán a través de piel de cerdo se determinó bajo distintas condiciones: (a) difusión pasiva (control) y, (b) la aplicación de iontoforesis (0.25 y 0.50 mA/cm^2) controlando la presencia de iones competidores en el medio. El flujo del almotriptán por difusión pasiva en las primeras 8 horas fue de $0.64 \pm 0.11 \text{ } \mu\text{g/cm}^2\text{h}$ (control). La aplicación de iontoforesis produjo, en todos los casos, un incremento significativo en el transporte del malato de almotriptán ($p < 0.01$). El flujo de fármaco fue de $115 \pm 17 \text{ } \mu\text{g/cm}^2\text{h}$ a densidad de corriente 0.25 mA/cm^2 , y de $264 \pm 24 \text{ } \mu\text{g/cm}^2\text{h}$ al duplicar la densidad de corriente aplicada. La aplicación de 0.50 mA/cm^2 incrementó 411 veces el flujo transdérmico observado con el control, hecho que revela la importancia de la iontoforesis en la absorción transdérmica del malato de almotriptán.

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

1. Se han desarrollado y validado dos nuevos métodos analíticos de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), con fotodiodo de detección UV/Visible, para la determinación rápida y precisa de nadolol e hidrocloreuro de propranolol en las muestras de ensayos de absorción transdérmica.
2. En relación a las sustancias químicas ensayadas como promotores de absorción transdérmica, el efecto que ejercen difiere en magnitud según el beta-bloqueante estudiado. Los compuestos más eficaces son el Azone® y el R-(+)-limoneno para el nadolol e hidrocloreuro de propranolol, respectivamente. Así pues, las diferencias en los valores obtenidos de flujo y parámetros de permeación evidencian la importancia de la lipofilia del fármaco y del promotor químico para conseguir un aumento en la absorción transdérmica.
3. La estrategia más eficaz de las estudiadas para incrementar la permeación de los beta-bloqueantes es la iontoforesis. Sin embargo, dicha técnica no produce el mismo efecto sobre ambos fármacos ya que promueve más el paso del fármaco más hidrófilo, concretamente la densidad de corriente superior (0.50 mA/cm^2) aumenta 14.8 veces el flujo transdérmico respecto a la difusión pasiva del nadolol.
4. Se ha realizado un estudio dermatofarmacocinético que ha permitido, tras un periodo de tiempo relativamente corto de ensayo de absorción transdérmica, caracterizar el paso del nadolol e hidrocloreuro de propranolol a través del estrato córneo y determinar los parámetros farmacocinéticos determinantes de la difusión a través de la piel. Así pues, se comprueba la baja permeabilidad que caracteriza al estrato córneo y confirma que es la principal barrera al paso de moléculas con una elevada resistencia y capacidad aislante.
5. El malato de almotriptán presenta una absorción transdérmica baja que aumenta de un modo significativo cuando se aplica la iontoforesis. La densidad de corriente 0.50 mA/cm^2 parece evidenciarse como la estrategia más eficaz ya que incrementa 411 veces la difusión del triptán.
6. El flujo iontoforético de nadolol y almotriptán *in vitro* obtenido a través de piel de cerdo, apuntan a la viabilidad "a priori" de su administración transdérmica. La iontoforesis se perfila como una alternativa interesante y ventajosa a la administración oral en el tratamiento preventivo y agudo de la migraña.

2. Abstract and conclusions

This doctoral thesis is part of a wider research project to develop transdermal therapeutic systems for the treatment of migraine.

Migraine is a transient chronic disorder characterized by recurrent episodes of headache. It is of particular relevance given the frequency with which it occurs and the negative impact it has on the quality of life of sufferers. In recent years the prevalence of neurological disease has greatly increased; it is now estimated to affect one in five people in the world and 12.6% of the Spanish population.

Thus, there is a need to develop effective pharmaceutical approaches that include drugs to prevent episodes (beta-blockers) or to treat symptoms (e.g. triptans), and which can be administered transdermally, as this route has proved to be more convenient and better tolerated by patients. However, human skin constitutes a highly efficient barrier that limits or even blocks the transport of drugs, thus restricting the transdermal delivery of therapeutic agents. Different strategies have been employed to enhance the passage of drugs across the skin and thus achieve a therapeutic blood concentration, including the use of chemical substances as absorption enhancers and application of iontophoresis.

The main objectives of the present work have differed depending upon whether the focus of study was the transdermal absorption through porcine skin of the beta-blockers, nadolol and propranolol hydrochloride, or of almotriptan.

On the one hand, the aim was to characterize and compare the *in vitro* transdermal absorption of nadolol and propranolol hydrochloride and to study the effect of chemical enhancers and iontophoresis on this absorption. In addition, given that the majority of enhancing techniques affect the barrier function of the skin, both drugs were quantified in the stratum corneum and their dermatopharmacokinetics parameters determined to describe the rate and extent of delivery across the skin.

In order to characterize the transdermal absorption of both beta-blockers, percutaneous diffusion experiments were performed. Two simple and rapid High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) methods with ultraviolet detection were chosen to determine the *in vitro* transdermal absorption of nadolol and propranolol hydrochloride (chapter III). Both methods were validated for specificity, linearity,

precision, accuracy, limit of detection, limit of quantification and robustness. Separation was carried out on a 250 mm Kromasil® C₁₈ column at room temperature. The detector wavelength was fixed at 269 nm for nadolol and 291 nm for propranolol hydrochloride and the response was linear for all the concentrations evaluated (range of 0.17 to 167 µM in the case of nadolol and 0.11 to 113 µM in the case of propranolol hydrochloride). The maximum relative error and relative standard deviation detected were 5.19% and 6.08% respectively for nadolol and 3.57% and 7.28% respectively for propranolol hydrochloride. The limits of detection and quantification were 0.058 and 0.038 µM for nadolol and 0.171 and 0.115 µM for propranolol hydrochloride, respectively. The results of robustness were highly satisfactory.

Once both analytical methods had been validated and shown to be adequate, the transdermal absorption of nadolol and propranolol hydrochloride was characterized and the effects of the application of chemical enhancers and iontophoresis on this absorption was investigated by means of *in vitro* permeation studies (chapter IV). As expected, the passive transdermal flux of the more lipophilic drug (propranolol) was higher than that of nadolol ($48.9 \pm 1.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ vs. $17.1 \pm 0.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$). Pretreatment of porcine skin with ethanol (vehicle), Azone®, R-(+)-limonene, caproic acid and oleic acid (at 5% in ethanol, w/w) and the application of two current densities (0.25 and 0.50 mA/cm²) produced varying effects depending on the drug studied.

In the case of nadolol, treatment of the skin with Azone® and oleic acid produced an increase in the flux compared with the control; however, *in vitro* data suggested that only Azone® produced a significant increase, with a value 7.18-fold that of the control ($p < 0.01$). Of all the enhancers tested, R-(+)-limonene was incapable enhancing the absorption of nadolol. Although some of the chemical substances assayed increased the absorption of nadolol, the most significant increment in the transdermal transport of nadolol was clearly produced by iontophoresis, specifically that of 0.50 mA/cm², which produced transdermal flux values of $216 \pm 11 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ for nadolol (14.8-fold that of passive diffusion).

On the other hand, the effect of chemical enhancers and iontophoresis on the absorption of propranolol hydrochloride across the porcine skin proved to be more moderate. All the strategies slightly increased the transdermal absorption of this agent; Azone® and oleic acid produced 1.74 and 1.39-fold increments with respect to control values, while R-(+)-limonene and iontophoresis at a current density of 0.50 mA/cm², proved to be the most effective of the techniques, resulting in values of $106 \pm 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$

and $108 \pm 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$, respectively, which represents a 1.88-fold increase with respect to the control.

Therefore, the application of iontophoresis did not produce the same effect on both drugs. When the fluxes obtained in the first 8 hours with current densities of 0.25 and $0.50 \text{ mA}/\text{cm}^2$ were compared, statistically significant differences were detected between the two drugs: $120 \pm 21 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (nadolol) and $61.6 \pm 7.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (propranolol hydrochloride) *vs.* $216 \pm 11 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (nadolol) and $108 \pm 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (propranolol) ($p < 0.05$). These results provide clear evidence of the modulating influence of current density on the transdermal transport of a drug through the skin and of the enhancing effect of this physical strategy in increasing the flux of the more hydrophilic of the two drugs assayed (nadolol).

After evaluating the transdermal absorption of both beta-blockers through porcine skin, the *in vitro* distribution profile of the drugs in stratum corneum were compared by calculating dermatopharmacokinetic parameters. The objective of these experiments was to determine the effect of the various strategies tested. The results were used to deduce the stratum corneum-vehicle partition coefficient (K) and its diffusion kinetic (D/H^2), as well as the amount of drug present in the outer layer of the skin (chapter V). When $0.50 \text{ mA}/\text{cm}^2$ iontophoresis was applied, the total amount values of nadolol in the stratum corneum was $9.61 \pm 1.28 \text{ mg}/\text{cm}^3$ (almost 3-fold that observed after passive diffusion). Moreover, the deduced values of K and D/H^2 obtained with oleic acid and Azone[®] were statistically different from those obtained under other conditions ($p < 0.05$). The partitioning parameter of propranolol hydrochloride by passive diffusion was high 4.37 ± 0.62 , though, oleic acid produced the highest value of K and the greatest amount of drug in the stratum corneum ($p < 0.05$), values that were similar to those achieved with $0.50 \text{ mA}/\text{cm}^2$. When the accumulated amounts of each beta-blocker in the donor compartments were compared they were found to be lower in the case of nadolol. It was thus determined that the higher amount of nadolol in the stratum corneum was a result of permeation of the drug, especially when iontophoresis had been applied.

Based on promising results obtained with sumatriptan in previous studies by our research group, the second main objective of this project was to investigate whether or not almotriptan can be administered transdermally, and to evaluate the feasibility of using iontophoresis in order to enhance its transdermal passage (chapter VI). Transdermal flux of almotriptan through porcine skin was determined in different conditions: (a) passive

diffusion (control) and (b) application of iontophoresis (0.25 and 0.50 mA/cm²) controlling the effect of ionic strength on the almotriptan transport. The transdermal flux of almotriptan malate over 8 hours was $0.64 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ (control). Application of iontophoresis produced a statistically significant increment of the transdermal transport of almotriptan malate ($p < 0.01$). When 0.25 mA/cm² iontophoresis was applied, transdermal flux values of $115 \pm 17 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ were obtained, and when the current was doubled the flux increased to $264 \pm 24 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$, which was 411-fold that obtained with the control, thus indicating the efficacy of iontophoresis in enhancing the transdermal absorption of almotriptan malate.

From the experimental results we can highlight the following conclusions:

1. Two new methods of High Performance Liquid Chromatographic with ultraviolet detection have been developed and validated for the rapid and precise determination of nadolol and propranolol hydrochloride in samples obtained from transdermal diffusion experiments.
2. The effect of the chemical substances assayed as transdermal absorption enhancers varies according to the beta-blocker in question. Of the substances studied, Azone[®] and R-(+)-limonene are the most powerful enhancers of nadolol and propranolol hydrochloride, respectively. The differences observed between the transdermal flux and permeation parameters of the two beta-blockers demonstrate the importance of the lipophilicity of both the drug and the chemical enhancer in the transdermal absorption.
3. Iontophoresis is the most effective of the strategies for increasing the transdermal absorption of the beta-blockers studied here. However, this technique does not produce the same effect on both drugs. The application of a current density of 0.50 mA/cm² enhances the flux of the more hydrophilic drug to values that are 14.8-fold those achieved with passive diffusion of nadolol.
4. The results of the dermatopharmacokinetic study, in which tape-stripping was used, allow the penetration of nadolol and propranolol hydrochloride through the stratum corneum and the pharmacokinetic parameters of this diffusion to be characterized. This research shows that shorter duration studies can predict the behavior that will be seen during longer periods of application. The low

permeability of the stratum corneum is evident, thus confirming its role as a barrier with a high resistance and capacity for blocking the passage of molecules.

5. Almotriptan malate is characterized by a low transdermal absorption that is increased significantly by iontophoresis. The application of a current density of 0.50 mA/cm² is the most effective strategy for enhancing the transdermal transport of a drug among those assessed, resulting in values 411-fold those obtained in controls.
6. Our results for the iontophoretic delivery of nadolol and almotriptan across porcine skin support the viability of the transdermal administration of these drugs. In this way, iontophoresis would seem to be a promising alternative to oral administration of pharmacological therapy for the prevention and acute treatment of migraine.

Capítulo VIII

Bibliografía

- Aalto-Korte K, Turpeinen M. Transepidermal water loss predicts systemic absorption of topical hydrocortisone in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 1996; 135(3):497-8.
- Abad-Santos F, Novalbos J, García AG. Sistema nervioso simpático: fármacos simpaticolíticos. En: *Farmacología básica y clínica* (18ª ed.). Velázquez Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Portolés A (eds.). Panamericana, Madrid. 2008; pp. 168-179.
- Abla N, Geiser L, Mirgaldi M, Naik A, Veuthey JL, Guy RH, Kalia YN. Capillary zone electrophoresis for the estimation of transdermal iontophoretic mobility. *J. Pharm. Sci.* 2005; 94(12):2667-75.
- Aboofazeli R, Zia H, Needham TE. Transdermal delivery of nicardipine: an approach to *in vitro* permeation enhancement. *Drug Deliv.* 2002; 9(4):239-47.
- Abrams MB. Medication overuse headaches. *Med. Clin. North Am.* 2013; 97(2):337-52.
- A.D.A.M. Images. Your online source for medical images (internet). Atlanta, Georgia (Estados Unidos); (actualizado enero 2012; citado el 1 de febrero 2013). Disponible en: <http://www.adamimages.com>.

- Afouna MI, Fincher TK, Zaghoul AA, Reddy IK. Effect of Azone upon the *in vivo* antiviral efficacy of cidofovir or acyclovir topical formulations in treatment/prevention of cutaneous HSV-1 infections and its correlation with skin target site free drug concentration in hairless mice. *Int. J. Pharm.* 2003; 253(1-2):159-68.
- Aguilar Cordero MJ. El feto y el recién nacido. Crecimiento y desarrollo. En: Tratado de enfermería infantil. Elsevier España, S.A., Madrid. 2003; pp. 23-42.
- Ahad A, Aqil M, Kohli K, Chaudhary H, Sultana Y, Mujeeb M, Talegaonkar S. Chemical penetration enhancers: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2009; 19(7):969-88.
- Ahad A, Aqil M, Kohli K, Sultana Y, Mujeeb M, Ali A. Interactions between novel terpenes and main components of rat and human skin: mechanistic view for transdermal delivery of propranolol hydrochloride. *Curr. Drug Deliv.* 2011; 8(2):213-24.
- Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, AC-19. 1974; 716-23.
- Alberti I, Kalia YN, Naik A, Guy RH. Assessment and prediction of the cutaneous bioavailability of topical terbinafine, *in vivo*, in man. *Pharm. Res.* 2001^a; 18(10):1472-5.
- Alberti I, Kalia YN, Naik A, Bonny JD, Guy RH. *In vivo* assessment of enhanced topical delivery of terbinafine to human stratum corneum. *J. Control. Release.* 2001^b; 71(3): 319-27.
- Alberti I, Kalia YN, Naik A, Bonny J, Guy RH. Effect of ethanol and isopropyl myristate on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum, *in vivo*. *Int. J. Pharm.* 2001^c; 219(1-2):11-9.
- Alexander A, Dwivedi S, Ajazuddin, Giri TK, Saraf S, Tripathi DK. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J. Control. Release.* 2012; 164(1):26-40.
- Allais G, Acuto G, Benedetto C, D'Andrea G, Grazzi L, Manzoni GC, Moschiano F, d'Onofrio F, Valguarnera F, Bussone G. Evolution of migraine-associated symptoms in menstrually related migraine following symptomatic treatment with almotriptan. *Neurol. Sci.* 2010; 31 Suppl 1:S115-9.
- Allan G. Azone[®]. En: Percutaneous Penetration Enhancers. Smith EW, Maibach HI (eds.). CRC Press, Florida. 1995; pp. 130-136.

- Amarbayasgalan T, Takahashi H, Dekio I, Morita E. Content of vascular endothelial growth factor in stratum corneum well correlates to local severity of acute inflammation in patients with atopic dermatitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012; 157(3):251-8.
- Amin AS, Ragab GH, Saleh H. Colorimetric determination of beta-blockers in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002; 30(4):1347-53.
- Andega S, Kanikkannan N, Singh M. Comparison of the effect of fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. *J. Control. Release.* 2001; 77(1-2):17-25.
- Anderson RL, Cassidy JM. Variation in physical dimensions and chemical composition of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 1973; 61(1):30-2.
- Anderson BD, Raykar PV. Solute structure-permeability relationships in human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 1989; 93(2):280-6.
- Andersson KE, Vinge E. Beta-adrenoceptor blockers and calcium antagonists in the prophylaxis and treatment of migraine. *Drugs.* 1990; 39(3):355-73.
- Anigbogu ANC, Williams AC, Barry BW, Edwards HGM. Fourier transform raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethylsulfoxide and human stratum corneum. *Int. J. Pharm.* 1995; 125(2):265-82.
- Anissimov YG, Roberts MS. Diffusion modeling of percutaneous absorption kinetics: 2. Finite vehicle volume and solvent deposited solids. *J. Pharm. Sci.* 2001; 90(4):504-20.
- Antonaci F, De Cillis I, Cuzzoni MG, Allena M. Almotriptan for the treatment of acute migraine: a review of early intervention trials. *Expert Rev. Neurother.* 2010; 10(3):351-64.
- Aqil M, Sultana V, Ali A. Transdermal delivery of beta-blockers. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2006; 3(3):405-18.
- Aqil M, Ahad A, Sultana Y, Ali A. Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug Discov. Today.* 2007; 12(23-24):1061-7.
- Ashburn MA, Streisand J, Zhang J, Love G, Rowin M, Niu S, Kievit JK, Kroep JR, Mertens MJ. The iontophoresis of fentanyl citrate in humans. *Anesthesiology.* 1995; 82(5):1146-53.

- Ashkenasi A. Effect of transdermal methylphenidate wear times on sleep in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Pediatr. Neurol.* 2011; 45(6):381-6.
- Balaguer-Fernández C, Padula C, Femenía-Font A, Merino V, Santi P, López-Castellano A. Development and evaluation of occlusive systems employing polyvinyl alcohol for transdermal delivery of sumatriptan succinate. *Drug Deliv.* 2010; 17(2):83-91.
- Balaguer-Fernández C, Femenía-Font A, Merino V, Córdoba-Díaz D, Elorza-Barroeta MA, López-Castellano A, Córdoba-Díaz M. Elastic vesicles of sumatriptan succinate for transdermal administration: characterization and *in vitro* permeation studies. *J. Liposome Res.* 2011; 21(1):55-9.
- Banga AK. Transdermal and intradermal delivery of therapeutic agents. Application of physical technologies. CRC Press, Boca Raton. 2011; pp. 1-26.
- Bariya SH, Gohel MC, Mehta TA, Sharma OP. Microneedles: an emerging transdermal drug delivery system. *J. Pharm. Pharmacol.* 2012; 64(1):11-29.
- Barker N, Hadgraft J. Facilitated percutaneous absorption: a model system. *Int. J. Pharm.* 1981; 8(3):193-202.
- Barker N, Hadgraft J, Rutter N. Skin permeability in the newborn. *J. Invest. Dermatol.* 1987; 88(4):409-11.
- Barry BW, Brace AR. Permeation of oestrone, oestradiol, oestriol and dexamethasone across cellulose acetate membrane. *J. Pharm. Pharmacol.* 1977; 29(7):397-400.
- Barry BW. Methods for studying percutaneous absorption. En: *Dermatological Formulations*. Marcel Dekker, New York. 1983; pp. 234-295.
- Barry BW. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J. Control. Release.* 1987; 6(1):85-97.
- Barry BW, Bennett SL. Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin. *J. Pharm. Pharmacol.* 1987; 39(7):535-46.
- Barry BW. Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *J. Control. Release.* 1991; 15(3):237-48.
- Bashir SJ, Chew AL, Anigbogu A, Dreher F, Maibach HI. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin Res. Technol.* 2001; 7(1):40-8.

- Bath BD, Scott ER, Phipps JB, White HS. Scanning electrochemical microscopy of iontophoretic transport in hairless mouse skin. Analysis of the relative contributions of diffusion, migration, and electroosmosis to transport in hair follicles. *J. Pharm. Sci.* 2000; 89(12):1537-49.
- Beastall J, Guy RH, Hadgraft J, Wilding I. The influence of urea on percutaneous absorption. *Pharm. Res.* 1986; 3(5):294-7.
- Belas FJ, Phillips MA, Srinivas NR, Barbhaiya RH, Blair IA. Simultaneous determination of nadolol enantiomers in human plasma by high-performance liquid chromatography using fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* 1995; 9(3):140-5.
- Bendas B, Schmalfuss U, Neubert R. Influence of propylene glycol as cosolvent on mechanisms of drug transport from hydrogels. *Int. J. Pharm.* 1995; 116(1):19-30.
- Benemei S, Nicoletti P, Capone JG, De Cesaris F, Geppetti P. Migraine. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009; 194:75-89.
- Berardesca E, de Rigal J, Leveque JL, Maibach HI. *In vivo* biophysical characterization of skin physiological differences in races. *Dermatologica.* 1991; 182(2):89-93.
- Berner B, Mazzenga GC, Otte JH, Steffens RJ, Juang RH, Ebert CD. Ethanol: water mutually enhanced transdermal therapeutic system II: skin permeation of ethanol and nitroglycerin. *J. Pharm. Sci.* 1989; 78(5):402-7.
- Berner B, Liu P. Alcohols. En: *Percutaneous Penetration Enhancers*. Smith EW, Maibach HI (eds). CRC Press, Florida. 1995; pp. 40-60.
- Blank IH. Penetration of low-molecular-weight alcohols into skin. I. Effect of concentration of alcohol and type of vehicle. *J. Invest. Dermatol.* 1964; 43:415-20.
- Bommannan D, Potts RO, Guy RH. Examination of stratum corneum barrier function *in vivo* by infrared spectroscopy. *J. Invest. Dermatol.* 1990; 95(4):403-8.
- Borrás-Blasco J, López A, Morant MJ, Díez-Sales O, Herráez-Domínguez M. Influence of sodium lauryl sulphate on the *in vitro* percutaneous absorption of compounds with different lipophilicity. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1997; 5(1):15-22.
- Borrás-Blasco J, Díez-Sales O, López A, Herráez-Domínguez M. A mathematical approach to predicting the percutaneous absorption enhancing effect of sodium lauryl sulphate. *Int. J. Pharm.* 2004; 269(1): 121-9.

- Bou J, Domènech T, Puig J, Heredia A, Gras J, Fernández-Forner D, Beleta J, Palacios JM. Pharmacological characterization of almotriptan: an indolic 5-HT receptor agonist for the treatment of migraine. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 410(1):33-41.
- Bouwstra JA, Gooris GS, Weerheim A, Kempenaar J, Ponc M. Characterization of stratum corneum structure in reconstructed epidermis by X-ray diffraction. *J. Lipid Res.* 1995a; 36(3):496-504.
- Bouwstra JA, Gooris GS, Bras W, Downing DT. Lipid organization in pig stratum corneum. *J. Lipid Res.* 1995b; 36(4):685-95.
- Brain KR, Walters KA, Watkinson AC. Investigation of skin permeation *in vitro*. En: Dermal absorption and toxicity assessment. Roberts MS, Walters KA (eds.). Marcel Dekker, New York. 1998; pp. 161-187.
- Brand RM, Singh P, Aspe-Carranza E, Maibach HI, Guy RH. Acute effects of iontophoresis on human skin *in vivo*: cutaneous blood flow and transepidermal water loss measurements. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1997; 43(2):133-8.
- Braverman IM, Sibley J, Keh A. Ultrastructural analysis of the endothelial-pericyte relationship in diabetic cutaneous vessels. *J. Invest. Dermatol.* 1990; 95(2):147-53.
- Bressler RS, Bressler CH. Functional anatomy of the skin. *Clin. Podiatr. Med. Surg.* 1989; 6(2):229-46.
- Breternitz M, Flach M, Prässler J, Elsner P, Fluhr JW. Acute barrier disruption by adhesive tapes is influenced by pressure, time and anatomical location: integrity and cohesion assessed by sequential tape stripping. A randomized, controlled study. *Br. J. Dermatol.* 2007; 156(2):231-40.
- Bronaugh RL, Steward RF, Congdon ER. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies. II. Animal models for human skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1982; 62(3):481-8.
- Bronaugh RL, Steward RF. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies. IV: The flow-through diffusion cell. *J. Pharm. Sci.* 1985; 74(1):64-7.
- Bronaugh RL. Methods for *in vitro* percutaneous absorption. En: Zhai H, Maibach HI (eds.). *Dermatotoxicology* (6^a ed.). CRC Press, New York. 2004; pp. 520-526.

- Bucks DA, Hinz RS, Sarason R, Maibach HI, Guy RH. *In vivo* percutaneous absorption of chemicals: a multiple dose study in rhesus monkeys. *Food Chem. Toxicol.* 1990; 28(2):129-32.
- Burnette RR, Ongpipattanakul B. Characterization of the permselective properties of excised human skin during iontophoresis. *J. Pharm. Sci.* 1987; 76(10):765-73.
- Burnette RR, Ongpipattanakul B. Characterization of the pore transport properties and tissue alteration of excised human skin during iontophoresis. *J. Pharm. Sci.* 1988; 77(2):132-7.
- Burnette RR. Iontophoresis. En: *Transdermal delivery systems: development issues and research initiatives*. Hadgraft J, Guy RH (eds.). Marcel Dekker, New York. 1989; pp. 247-291.
- Burriss JF. The USA experience with the clonidine transdermal therapeutic system. *Clin. Auton. Res.* 1993; 3(6):391-6.
- Bussone G, Allais G, Castagnoli Gabellari I, Benedetto C. Almotriptan for menstrually related migraine. *Expert Opin. Pharmacother.* 2011; 12(12):1933-43.
- Cady RK. Treating an acute attack of migraine. *Headache.* 2008; 48(9):1415-6.
- Cardoso CR, Favoreto S Jr, Oliveira LL, Vancim JO, Barban GB, Ferraz DB, Silva JS. Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: a new approach for skin repair. *Immunobiology.* 2011; 216(3):409-15.
- Carretero M. Medicamentos de vanguardia: Almotriptán. Enero 2001: 132-134. OFFARM (internet). (Citado el 18 de abril 2012). Disponible en: <http://www.dfarmacia.com>.
- Caussin J, Gooris GS, Janssens M, Bouwstra JA. Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008; 1778(6):1472-82.
- Cázares-Delgadillo J, Naik A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Skin permeation enhancement by sucrose esters: a pH-dependent phenomenon. *Int. J. Pharm.* 2005; 297(1-2):204-12.
- Cázares-Delgadillo J, Naik A, Ganem-Rondero A, Quintanar-Guerrero D, Kalia YN. Transdermal delivery of cytochrome C--A 12.4 kDa protein--across intact skin by constant-current iontophoresis. *Pharm. Res.* 2007; 24(7):1360-8.

- Cázares-Delgadillo J, Aziza IB, Balaguer-Fernández C, Calatayud-Pascual A, Ganem-Rondero A, Quintanar-Guerrero D, Castellano AC, Merino V, Kalia YN. Comparing metoclopramide electrotransport kinetics *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010; 41(2):353-9.
- CEIIER. Comité de Ética del Instituto de Investigaciones de Enfermedades Raras. Recomendaciones sobre los aspectos éticos de las colecciones de muestras o bancos de materiales humanos con fines de investigación biomédica. España: Instituto de Salud Carlos III; 2007 (citado el 20 de diciembre 2012). Disponible en: <http://www.isciii.es>
- Chang SK, Riviere JE. Percutaneous absorption of parathion *in vitro* in porcine skin: effects of dose, temperature, humidity, and perfusate composition on absorptive flux. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1991; 17(3):494-504.
- Charoo NA, Rahman Z, Repka MA, Murthy SN. Electroporation: an avenue for transdermal drug delivery. *Curr. Drug Deliv.* 2010; 7(2):125-36.
- Chatelain E, Gabard B, Surber C. Skin penetration and sun protection factor of five UV filters: effect of the vehicle. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2003; 16(1):28-35.
- Chattaraj SC, Walker RB. Penetration enhancers classification. En: *Percutaneous penetration enhancers*. CRC Press, Boca Raton. 1995; pp. 5-20.
- Chen QP, Li QT. Effect of cardiolipin on proton permeability of phospholipid liposomes: the role of hydration at the lipid-water interface. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001; 389(2):201-6.
- Chen LC, Ashcroft DM. Meta-analysis examining the efficacy and safety of almotriptan in the acute treatment of migraine. *Headache.* 2007; 47(8):1169-77.
- Choi EH, Man MQ, Wang F, Zhang X, Brown BE, Feingold KR, Elias PM. Is endogenous glycerol a determinant of stratum corneum hydration in humans?. *J. Invest. Dermatol.* 2005; 125(2):288-93.
- Ciach T, Moscicka-Studzinska A. Buccal iontophoresis: an opportunity for drug delivery and metabolite monitoring. *Drug Discov. Today.* 2011; 16(7-8):361-6.
- Clemessy M, Couarraze G, Bevan B, Puisieux F. Mechanisms involved in iontophoretic transport of angiotensin. *Pharm. Res.* 1995; 12(7):998-1002.
- Coldman MF, Poulsen BJ, Higuchi T. Enhancement of percutaneous absorption by the use of volatile: nonvolatile systems as vehicles. *J. Pharm. Sci.* 1969; 58(9):1098-102.

- Collins CJ, Arrigan DW. Ion-transfer voltammetric determination of the beta-blocker propranolol in a physiological matrix at silicon membrane-based liquid/liquid microinterface arrays. *Anal. Chem.* 2009; 81(6):2344-9.
- Collins CJ, Lyons C, Strutwolf J, Arrigan DW. Serum-protein effects on the detection of the beta-blocker propranolol by ion-transfer voltammetry at a micro-ITIES array. *Talanta.* 2010; 80(5):1993-8.
- Conjeevaram R, Chaturvedula A, Betageri GV, Sunkara G, Banga AK. Iontophoretic *in vivo* transdermal delivery of beta-blockers in hairless rats and reduced skin irritation by liposomal formulation. *Pharm. Res.* 2003; 20(9):1496-501.
- Cooper ER. Increased skin permeability for lipophilic molecules. *J. Pharm. Sci.* 1984; 73(8):1153-6.
- Corbo M, Liu JC, Chien YW. Bioavailability of propranolol following oral and transdermal administration in rabbits. *J. Pharm. Sci.* 1990; 79(7):584-7.
- Corcuff P, Fiat F, Minondo AM. Ultrastructure of the human stratum corneum. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2001; 14 Suppl 1:4-9.
- Cornwell PA, Barry BW. The routes of penetration of ions and 5-fluorouracil across human skin and the mechanisms of action of terpene skin penetration enhancers. *Int. J. Pharm.* 1993; 94(1-3):189-94.
- Costello CT, Jeske AH. Iontophoresis: applications in transdermal medication delivery. *Phys. Ther.* 1995; 75(6):554-63.
- Craane-van Hinsberg WH, Verhoef JC, Bax LJ, Junginger HE, Boddé HE. Role of appendages in skin resistance and iontophoretic peptide flux: human *versus* snake skin. *Pharm. Res.* 1995; 12(10):1506-12.
- Crank J. Diffusion in a plane sheet. En: *The Mathematics of Diffusion*. Clark J (ed). Oxford University Press, London. 1975; pp. 44-68.
- Crank J. *The Mathematics of Diffusion* (2^a ed.). Clarendon Press, Oxford. 1979.
- Cronin MT, Dearden JC, Gupta R, Moss GP. An investigation of the mechanism of flux across polydimethylsiloxane membranes by use of quantitative structure-permeability relationships. *J. Pharm. Pharmacol.* 1998; 50(2):143-52.
- Cross SE, Roberts MS. Importance of dermal blood supply and epidermis on the transdermal iontophoretic delivery of monovalent cations. *J. Pharm. Sci.* 1995; 84(5):584-92.

- Cross SE, Roberts MS. Use of *in vitro* human skin membranes to model and predict the effect of changing blood flow on the flux and retention of topically applied solutes. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97(8):3442-50.
- Crouthamel WG, Tan GH, Dittert LW, Doluisio JT. Drug absorption IV: influence of pH on absorption kinetics of weakly acidic drugs. *J. Pharm. Sci.* 1971; 60(8):1160-3.
- Crowther JB, Salomons P, Callaghan C. Analytical method development for assay and impurity determination in drug substances and drug products. En: *Analytical chemistry in a GMP environment: a practical guide*. Miller KM, Crowther JB (eds.). John Wiley and Sons, New York. 2000; pp. 331-370.
- Crutcher W, Maibach HI. The effect of perfusion rate on *in vitro* percutaneous penetration. *J. Invest. Dermatol.* 1969; 53(4):264-9.
- Cui Y, Li L, Zhang L, Li J, Gu J, Gong H, Guo P, Tong W. Enhancement and mechanism of transdermal absorption of terpene-induced propranolol hydrochloride. *Arch. Pharm. Res.* 2011; 34(9):1477-85.
- Cullander C, Guy RH. Sites of iontophoretic current flow into skin: identification and characterization with the vibrating probe electrode. *J. Invest. Dermatol.* 1991; 97(1):55-64.
- Cullander C. What are the pathways of iontophoretic current flow through mammalian skin?. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1992; 9(2-3):119-35.
- Cullander C, Rao G, Guy RH. Why silver/silver chloride? Criteria for iontophoresis electrodes. En: *Prediction of percutaneous penetration*. Brain KR, James VJ, Walters KA (eds.). STS, Cardiff. 1993; pp. 381-390.
- Davis AF, Hadgraft J. Supersaturated solutions as topical drug delivery systems. En: *Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement*. Walters KA, Hadgraft J (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York. 1993; pp. 243-269.
- del Rio-Sancho S, Serna-Jiménez CE, Calatayud-Pascual MA, Balaguer-Fernández C, Femenía-Font A, Merino V, López-Castellano A. Transdermal absorption of memantine: effect of chemical enhancers, iontophoresis, and role of enhancer lipophilicity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012; 82(1):164-70.
- del Rio Sancho S, Serna Jiménez CE, Calatayud Pascual MA, Balaguer Fernández C, Femenía Font A, Castillo García E, Merino V, López Castellano A. Evaluation of

- percutaneous absorption of esculetin: effect of chemical enhancers. *Planta Med.* 2013; 79(2):131-6.
- Delamoye M, Duverneuil C, Paraire F, de Mazancourt P, Alvarez JC. Simultaneous determination of thirteen beta-blockers and one metabolite by gradient high-performance liquid chromatography with photodiode-array UV detection. *Forensic Sci. Int.* 2004; 141(1):23-31.
- Delgado-Charro MB, Guy RH. Characterization of convective solvent flow during iontophoresis. *Pharm. Res.* 1994; 11(7):929-35.
- Delgado-Charro MB, Guy RH. Iontophoretic delivery of nafarelin across the skin. *Int. J. Pharm.* 1995^a; 117(2):165-72.
- Delgado-Charro MB, Rodríguez-Bayón AM, Guy RH. Iontophoresis of nafarelin: Effects of current density and concentration on electrotransport *in vitro*. *J. Control. Release.* 1995^b; 35(1):35-40.
- Delgado-Charro MB. Iontophoretic drug delivery across the nail. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2012; 9(1):91-103.
- Denet AR, Vanbever R, Pr eat V. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56(5):659-74.
- Díaz-Insa S, Vila C, McGown CC. Improved patient satisfaction and pain evolution with almotriptan in migraine: a primary care study. *Curr. Med. Res. Opin.* 2011; 27(3):559-67.
- Diener HC, Gendolla A, Gebert I, Beneke M. Almotriptan in migraine patients who respond poorly to oral sumatriptan: a double-blind, randomized trial. *Headache.* 2005; 45(7):874-82.
- Díez-Sales O, Pérez-Sayas E, Martín-Villodre A, Herráez-Domínguez M. The prediction of percutaneous absorption: I. Influence of the dermis on *in vitro* permeation models. *Int. J. Pharm.* 1993; 100(1-3):1-7.
- Díez-Sales O, Watkinson AC, Herráez-Domínguez M, Javaloyes C, Hadgraft J. A mechanistic investigation of the *in vitro* human skin permeation enhancing effect of Azone[®]. *Int. J. Pharm.* 1996; 129(1-2):33-40.
- Dixit N, Bali V, Baboota S, Ahuja A, Ali J. Iontophoresis - an approach for controlled drug delivery: a review. *Curr. Drug Deliv.* 2007; 4(1):1-10.

- Downing DT. Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J. Lipid Res.* 1992; 33(3):301-13.
- Dreher F. Quantification of stratum corneum removed by tape stripping. En: *Dermatoxicology* (7^a ed.). Zhai H, Wilhelm KP, Maibach HI (eds.). Informa Healthcare. 2007; pp. 343-345.
- Drugs@FDA. FDA approved drugs products 2013 (internet). Silver Spring (Maryland): U.S. Department of health and human services; (actualizado en marzo 2013, citado el 17 de abril de 2013). Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>.
- Drummer OH, McNeil J, Pritchard E, Louis WJ. Combined high-performance liquid chromatographic procedure for measuring 4-hydroxypropranolol and propranolol in plasma: pharmacokinetic measurements following conventional and slow-release propranolol administration. *J. Pharm. Sci.* 1981; 70(9):1030-2.
- Eastman RC, Chase HP, Buckingham B, Hathout EH, Fuller-Byk L, Leptien A, Van Wyhe MM, Davis TL, Fermi SJ, Pechler H, Sahyun G, Lopatin M, Wang BY, Wei C, Bartkowiak M, Ginsberg BH, Tamada JA, Pitzer KR. Use of the GlucoWatch biographer in children and adolescents with diabetes. *Pediatr. Diabetes.* 2002; 3(3): 127-34.
- ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals). Percutaneous absorption (Monograph No. 20). Brussels. 1993; pp. 1-80.
- Edwards C, Marks R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. *Clin. Dermatol.* 1995; 13(4):375-80.
- Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* 1983; 80(1 Suppl):S44-9.
- El-Kattan AF, Asbill CS, Kim N, Michniak BB. The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. *Int. J. Pharm.* 2001; 215(1-2):229-40.
- Elkhyat A, Agache P, Zahouani H, Humbert P. A new method to measure *in vivo* human skin hydrophobia. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2001; 23(6):347-52.

- Escobar-Chávez JJ, Merino-Sanjuán V, López-Cervantes M, Urban-Morlan Z, Piñón-Segundo E, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2008; 11(1):104-30.
- Essa EA, Bonner MC, Barry BW. Human skin sandwich for assessing shunt route penetration during passive and iontophoretic drug and liposome delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 2002; 54(11):1481-90.
- Eucerin®: medical skin science that shows (internet). Hamburgo (Alemania): Beiersdorf AG (actualizado en 2009; citado el 22 de febrero de 2013). Disponible en: <http://www.eucerin.com/es/la-piel/acerca-de-la-piel/estructura-interna-de-la-piel/la-epidermis/>.
- European Medicines Agency. Ionsys: fentanyl hydrochloride. 2009. Doc. Ref: EMA/317433/2009.
- Evers S, Áfra J, Frese A, Goadsby PJ, Linde M, May A, Sándor PS. Drug treatment of migraine. En: *European Handbook of Neurological Management* (2ª ed.). Gilhus NE, Barnes MR, Brainin M (eds.). John Wiley & Sons Ltd-Blackwell Publishing Ltd, Singapore. 2011; pp. 159-178.
- Fatouros DG, Groenink HW, de Graaff AM, van Aelst AC, Koerten HK, Bouwstra JA. Visualization studies of human skin *in vitro/in vivo* under the influence of an electrical field. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006; 29(2):160-70.
- FDA. Draft Guidance: Guidance for Industry: topical dermatological drug product NDAs and ANDAs-*in vivo* bioavailability, bioequivalence, *in vitro* release, and associated studies, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center of Drug Evaluation and Research (CDER). 1998.
- FDA. Guidelines for Industry. Analytical procedures and methods validation. 2000.
- FDA. Guidance for Industry on special protocol assessment: Availability, Fed. Reg. 67: 35122, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 2002.
- FDA. Clinical laboratory improvement amendments 2010 (internet). Silver Spring (Maryland): U.S. Department of health and human services; (actualizado en abril 2012, citado el 5 de diciembre de 2012). Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfClia/Detail.cfm?ID=5038844>.

- Feldmann RJ, Maibach HI. Penetration of ^{14}C hydrocortisone through normal skin. The effect of stripping and occlusion. *Arch. Dermatol.* 1965; 91(6):661-6.
- Feldmann RJ, Maibach HI. Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest. Dermatol.* 1970; 54(5):399-404.
- Femenía-Font A, Balaguer-Fernández C, Merino V, López-Castellano A. Iontophoretic transdermal delivery of sumatriptan: effect of current density and ionic strength. *J. Pharm. Sci.* 2005^a; 94(10):2183-6.
- Femenía-Font A, Balaguer-Fernández C, Merino V, Rodilla V, López-Castellano A. Effect of chemical enhancers on the *in vitro* percutaneous absorption of sumatriptan succinate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005^b; 61(1-2):50-5.
- Femenía-Font A, Padula C, Marra F, Balaguer-Fernández C, Merino V, López-Castellano A, Nicoli S, Santi P. Bioadhesive monolayer film for the *in vitro* transdermal delivery of sumatriptan. *J. Pharm. Sci.* 2006; 95(7):1561-9.
- Fernandez C, Nielloud F, Fortuné R, Vian L, Marti-Mestres G. Benzophenone-3: rapid prediction and evaluation using non-invasive methods of *in vivo* human penetration. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002; 28(1):57-63.
- Ferry LL, Argentieri G, Lochner DH. The comparative histology of porcine and guinea pig skin with respect to iontophoretic drug delivery. *Pharm. Acta Helv.* 1995; 70(1):43-56.
- Flórez J. *Farmacología humana* (5^a ed.). Masson, Barcelona. 2008.
- Flynn GL, Yalkowsky SH. Correlation and prediction of mass transport across membranes. I. Influence of alkyl chain length on flux-determining properties of barrier and diffusant. *J. Pharm. Sci.* 1972; 61(6):838-52.
- Flynn GL, Yalkowsky SH, Roseman TJ. Mass transport phenomena and models: theoretical concepts. *J. Pharm. Sci.* 1974; 63(4):479-510.
- Foreman MI, Kelly I, Lukowiecki GA. A method for the measurement of diffusion constants suitable for studies of non-occluded skin. *J. Pharm. Pharmacol.* 1977; 29(2):108-9.
- Franz TJ. Percutaneous absorption on the relevance of *in vitro* data. *J. Invest. Dermatol.* 1975; 64(3):190-5.
- Franz TJ. The finite dose technique as a valid *in vitro* model for the study of percutaneous absorption in man. *Curr. Probl. Dermatol.* 1978; 7:58-68.

- Friedman BW, Lipton RB. Headache in the emergency department. *Curr. Pain Headache Rep.* 2011; 15(4):302-7.
- Garg T, Jain S, Singh HP, Sharma A, Tiwary AK. Elastic liposomal formulation for sustained delivery of antimigraine drug: *in vitro* characterization and biological evaluation. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2008; 34(10):1100-10.
- Garson JC, Doucet J, Lévêque JL, Tsoucaris G. Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction. *J. Invest. Dermatol.* 1991; 96(1):43-9.
- Gaudana RJ, Gokulgandhi MR, Boddu SH, Mitra AK. Recent overview of ocular patents. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 2012; 6(2):95-106.
- GECSSEN (Grupo de estudio de Cefalea. Sociedad Española de Neurología). Actitud diagnóstica y terapéutica en la cefalea. Ediciones Ergon, S.A., Madrid. 2006.
- Ghosh TK, Chiao CS, Gokhale RD. *In-vitro* permeation of some beta-blockers across the hairless mouse skin. *J. Pharm. Pharmacol.* 1993; 45(3):218-9.
- Ghosh TK, Pfister WR. Transdermal and topical drug delivery systems. Interpharm Press, Inc, Buffalo Grove. 1997.
- Gibson WT, Teall MR. Interactions of C12 surfactants with the skin: changes in enzymes and visible and histological features of rat skin treated with sodium lauryl sulphate. *Food Chem. Toxicol.* 1983; 21(5):587-94.
- Goadsby PJ. Pathophysiology of migraine. *Neurol. Clin.* 2009; 27(2):335-60.
- Godin B, Touitou E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animals models. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007; 59(11):1152-61.
- Godwin DA, Michniak BB. Influence of drug lipophilicity on terpenes as transdermal penetration enhancers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1999; 25(8):905-15.
- Goldstein I, Payton TR, Schechter PJ. A double-blind, placebo-controlled, efficacy and safety study of topical gel formulation of 1% alprostadil (Topiglan) for the in-office treatment of erectile dysfunction. *Urology.* 2001; 57(2):301-5.
- Goldstein J, Smith TR, Pugach N, Griesser J, Sebree T, Pierce M. A sumatriptan iontophoretic transdermal system for the acute treatment of migraine. *Headache.* 2012; 52(9):1402-10.
- Gracia-Naya M, Huerta-Villanueva M, Rios C, Garcia-Gomara MJ, Artal-Roy J, Sanchez-Valiente S, Santos-Lasaosa S, Mauri-Llerda JA, Latorre-Jimenez AM. [A study to

- compare independent groups of patients with episodic migraine who were treated preventively with flunarizine or nadolol]. *Rev. Neurol.* 2012; 54(5):277-83.
- Gratieri T, Kalaria D, Kalia YN. Non-invasive iontophoretic delivery of peptides and proteins across the skin. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2011; 8(5):645-63.
- Gray GM, Yardley HJ. Lipid compositions of cells isolated from pig, human, and rat epidermis. *J. Lipid Res.* 1975; 16(6):434-40.
- Green PG, Hadgraft J, Ridout G. Enhanced *in vitro* skin permeation of cationic drugs. *Pharm. Res.* 1989; 6(7):628-32.
- Green PG, Hinz RS, Cullander C, Yamane G, Guy RH. Iontophoretic delivery of amino acids and amino acid derivatives across the skin *in vitro*. *Pharm. Res.* 1991^a; 8(9):1113-20.
- Green PG, Hinz RS, Kim A, Szoka FC, Guy RH. Iontophoretic delivery of a series of tripeptides across the skin *in vitro*. *Pharm. Res.* 1991^b; 8(9):1121-7.
- Gupta RR, Jain SK, Varshney M. AOT water-in-oil microemulsions as a penetration enhancer in transdermal drug delivery of 5-fluorouracil. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2005; 41(1):25-32.
- Gurtovenko AA, Anwar J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *J. Phys. Chem. B.* 2007; 111(35):10453-60.
- Guy RH, Kalia YN, Delgado-Charro MB, Merino V, López A, Marro D. Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. *J. Control. Release.* 2000; 64(1-3):129-32.
- Guy RH, Delgado-Charro MB, Kalia YN. Iontophoretic transport across the skin. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2001; 14 Suppl 1:S35-40
- Hadgraft J. Calculations of drug release rates from controlled release devices. The slab. *Int. J. Pharm.* 1979; 2(3-4):177-94.
- Hadgraft J, Walters KA, Wotton PK. Facilitated transport of sodium salicylate across an artificial lipid membrane by Azone. *J. Pharm. Pharmacol.* 1985; 37(10):725-7.
- Hadgraft J, Guy RH. Transdermal drug delivery. Development issues and research initiatives. Marcel Dekker Inc., New York. 1989.

- Hadgraft J, Walters KA, Guy RH. Epidermal lipids and topical drug delivery. *Semin. Dermatol.* 1992; 11(2):139-44.
- Hadgraft J, Walters KA. Skin penetration enhancers. En: *Drug targeting and delivery: Concepts in dosage form design.* Junginge HE (ed.). Ellis Horwood Limited, Chichester. 1992; pp. 169-177.
- Hadgraft J, Peck J, Williams DG, Pugh WJ, Allan G. Mechanisms of action of skin penetration enhancers/retarders: Azone and analogues. *Int. J. Pharm.* 1996; 141(1-2):17-25.
- Hadgraft J, Valenta C. pH, pK(a) and dermal delivery. *Int. J. Pharm.* 2000; 200(2):243-7.
- Hadgraft J, Lane ME. Skin permeation: the years of enlightenment. *Int. J. Pharm.* 2005; 305(1-2):2-12.
- Hadgraft J, Lane ME. Skin: the ultimate interface. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011; 13(12):5215-22.
- Han SK, Jun YH, Rho YJ, Hong SC, Kim YM. Percutaneous absorption-enhancing activity of urea derivatives. *Arch. Pharm. Res.* 1991; 14(1):12-8.
- Harrison JE, Watkinson AC, Green DM, Hadgraft J, Brain K. The relative effect of Azone and Transcutol on permeant diffusivity and solubility in human stratum corneum. *Pharm. Res.* 1996; 13(4):542-6.
- Hatanaka T, Inuma M, Sugibayashi K, Morimoto Y. Prediction of skin permeability of drugs. I. Comparison with artificial membrane. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 1990; 38(12):3452-9.
- Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society. The International Classification of Headache Disorders (2^a ed.). *Cephalalgia.* 2004; 24 Suppl 1: S1-160.
- Helferich F. Ion exchange. Constable and Company Ltd, Londres. 1995.
- Hellgren L, Larsson K. On the effect of urea on human epidermis. *Dermatologica.* 1974; 149(5):289-93.
- Herkenne C, Naik A, Kalia YN, Hadgraft J, Guy RH. Pig ear skin *ex vivo* as a model for *in vivo* dermatopharmacokinetic studies in man. *Pharm. Res.* 2006; 23(8):1850-6.

- Herkenne C, Naik A, Kalia YN, Hadgraft J, Guy RH. Dermatopharmacokinetic prediction of topical drug bioavailability *in vivo*. J. Invest. Dermatol. 2007^a; 127(4):887-94.
- Herkenne C, Naik A, Kalia YN, Hadgraft J, Guy RH. Ibuprofen transport into and through skin from topical formulations: *in vitro-in vivo* comparison. J. Invest. Dermatol. 2007^b; 127(1):135-42.
- Herkenne C, Alberti I, Naik A, Kalia YN, Mathy FX, Pr at V, Guy RH. *In vivo* methods for the assessment of topical drug bioavailability. Pharm. Res. 2008^a; 25(1):87-103.
- Herkenne C, Naik A, Kalia YN, Hadgraft J, Guy RH. Effect of propylene glycol on ibuprofen absorption into human skin *in vivo*. J. Pharm. Sci. 2008^b; 97(1):185-97.
- Hilton J, Woollen BH, Scott RC, Auton TR, Trebilcock KL, Wilks MF. Vehicle effects on *in vitro* percutaneous absorption through rat and human skin. Pharm. Res. 1994; 11(10):1396-400.
- Hinz RS, Hodson CD, Lorence CR, Guy RH. *In vitro* percutaneous penetration: evaluation of the utility of hairless mouse skin. J. Invest. Dermatol. 1989; 93(1):87-91.
- Hirvonen J, Guy RH. Iontophoretic delivery across the skin: electroosmosis and its modulation by drug substances. Pharm. Res. 1997; 14(9):1258-63.
- Hirvonen J, Murtom aki L, Kontturi K. Experimental verification of the mechanistic model for transdermal transport including iontophoresis. J. Control. Release. 1998; 56(1-3): 169-74.
- Hoffmann J, Goadsby PJ. New agents for acute treatment of migraine: CGRP receptor antagonists, iNOS inhibitors. Curr. Treat. Options Neurol. 2012; 14(1):50-9.
- Holbrook KA. A histological comparison on infant and adult skin. En: Neonatal skin, structure and function. Maibach HI, Boisits EK (eds.). Dekker, New York. 1982; pp. 3-31.
- Hoopes MI, Noro MG, Longo ML, Faller R. Bilayer structure and lipid dynamics in a model stratum corneum with oleic acid. J. Phys. Chem. B. 2011; 115(12):3164-71.
- Hori M, Maibach HI, Guy RH. Enhancement of propranolol hydrochloride and diazepam skin absorption *in vitro*. II: Drug, vehicle and enhancer penetration kinetics. J. Pharm. Sci. 1992; 81(4):330-3.
- Hoshino M, Yajima K, Suzuki Y, Okahira A. Determination of nadolol diastereomers in dog plasma using chiral derivatization and reversed-phase high-performance liquid

- chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 1994; 661(2):281-9.
- Hu L, Silva SM, Damaj BB, Martin R, Michniak-Kohn BB. Transdermal and transbuccal drug delivery systems: enhancement using iontophoretic and chemical approaches. *Int. J. Pharm.* 2011; 421(1):53-62.
- Hung CF, Fang CL, Al-Suwayeh SA, Yang SY, Fang JY. Evaluation of drug and sunscreen permeation via skin irradiated with UVA and UVB: comparisons of normal skin and chronologically aged skin. *J. Dermatol. Sci.* 2012; 68(3):135-48.
- Hunke WA, Matheson LE Jr. Mass transport properties of co(polyether)polyurethane membranes II: permeability and sorption characteristics. *J. Pharm. Sci.* 1981; 70(12): 1313-8.
- Hunt A, Goldman A, Devine T, Phillips M, FEN-GBR-14 Study Group. Transdermal fentanyl for pain relief in a paediatric palliative care population. *Palliat. Med.* 2001; 15(5):405-12.
- Hwang CC, Danti AG. Percutaneous absorption of flufenamic acid in rabbits: effect of dimethyl sulfoxide and various nonionic surface-active agents. *J. Pharm. Sci.* 1983; 72(8):857-60.
- Ibrahim SA, Li SK. Effects of solvent deposited enhancers on transdermal permeation and their relationship with Emax. *J. Control. Release.* 2009; 136(2):117-24.
- Idson B. Percutaneous absorption. *J. Pharm. Sci.* 1975; 64(6):901-24.
- Illel B, Schaefer H, Wepierre J, Doucet O. Follicles play an important role in percutaneous absorption. *J. Pharm. Sci.* 1991; 80(5):424-7.
- Inada H, Ghanem AH, Higuchi WI. Studies on the effects of applied voltage and duration on human epidermal membrane alteration/recovery and the resultant effects upon iontophoresis. *Pharm. Res.* 1994; 11(5):687-97.
- International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 1994. ICH harmonised tripartite guideline: text on validation of analytical procedures Q2A.
- International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 1996. ICH harmonised tripartite guideline: validation of analytical procedures methodology Q2B.

- Iordanskii AL, Feldstein MM, Markin VS, Hadgraft J, Plate NA. Modeling of the drug delivery from a hydrophilic transdermal therapeutic system across polymer membrane. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000; 49(3):287-93.
- Jackman GP, McLean AJ, Jennings GL, Bobik A. No stereoselective first-pass hepatic extraction of propranolol. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1981; 30(3):291-6.
- Jampilek J, Brychtova K. Azone analogues: classification, design, and transdermal penetration principles. *Med. Res. Rev.* 2012; 32(5):907-47.
- Janz GJ, Ives DJ. Silver, silver chloride electrodes. *Ann. NY Acad. Sci.* 1968; 148(1):210-21.
- Jaskari T, Vuorio M, Kontturi K, Urtti A, Manzanares JA, Hirvonen J. Controlled transdermal iontophoresis by ion-exchange fiber. *J. Control. Release.* 2000; 67(2-3):179-90.
- Jhee SS, Shiovitz T, Crawford AW, Cutler NR. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the triptan antimigraine agents: a comparative review. *Clin. Pharmacokinet.* 2001; 40(3):189-205.
- Jenke DR. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 1996^a; 19(5):719-36.
- Jenke DR. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 1996^b; 19(5):737-57.
- Jiang S, Koo SW, Lee SH. The morphologic changes in lamellar bodies and intercorneocyte lipids after tape stripping and occlusion with a water vapor-impermeable membrane. *Arch. Dermatol. Res.* 1998; 290(3):145-51.
- Johnson PN, Harrison D, Allen C. Utility of transdermal fentanyl for prevention of iatrogenic opioid abstinence syndrome in children. *J. Opioid Manag.* 2010; 6(2):117-24.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histología básica* (6^a ed). Masson, Barcelona. 2005.
- Kalaria D, Dubey S, Kalia YN. Clinical applications of transdermal iontophoresis. En: *Topical and transdermal drug delivery: principles and practice*. Benson HA, Watkinson AC (eds.). John Wiley & Sons, Inc., New Jersey. 2012; pp. 67-84.
- Kalia YN, Pirot F, Guy RH. Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across human stratum corneum *in vivo*. *Biophys. J.* 1996; 71(5):2692-700.

- Kalia YN, Nonato LB, Lund CH, Guy RH. Development of skin barrier function in premature infants. *J. Invest. Dermatol.* 1998; 111(2):320-6.
- Kalia YN, Alberti I, Sekkat N, Curdy C, Naik A, Guy RH. Normalization of stratum corneum barrier function and transepidermal water loss *in vivo*. *Pharm. Res.* 2000; 17(9): 1148-50.
- Kalia YN, Alberti I, Naik A, Guy RH. Assessment of topical bioavailability *in vivo*: the importance of stratum corneum thickness. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2001; 14 Suppl 1:S82-6.
- Kalia YN, Naik A, Garrison J, Guy RH. Iontophoretic drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56(5):619-58.
- Kanikkannan N, Kandimalla K, Lamba SS, Singh M. Structures-activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery. *Curr. Med. Chem.* 2000; 7(6):593-608.
- Kanikkannan N. Iontophoresis-based transdermal delivery systems. *BioDrugs.* 2002; 16(5): 339-47.
- Kanikkannan N, Singh M. Skin permeation enhancement effect and skin irritation of saturated fatty alcohols. *Int. J. Pharm.* 2002; 248(1-2):219-28.
- Karande P, Mitragotri S. High throughput screening of transdermal formulations. *Pharm. Res.* 2002; 19(5):655-60.
- Karnes HT, March C. Precision, accuracy and data acceptance criteria in biopharmaceutical analysis. *Pharm. Res.* 1993; 10(10):1420-6.
- Kasting GB, Keister JC. Application of electrodiffusion theory for a homogeneous membrane to iontophoretic transport through skin. *J. Control. Release.* 1989; 8(3):195-210.
- Kennedy AH, Golden GM, Gay CL, Guy RH, Francoeur ML, Mak VH. Stratum corneum lipids of human epidermal keratinocyte air-liquid cultures: implications for barrier function. *Pharm. Res.* 1996; 13(8):1162-7.
- Kim YB, Ghanem AB, Mahmoud B, Higuchi WI. Short chain alkanols as transport enhancers for lipophilic and polar/ionic permeants in hairless mouse skin: Mechanism(s) of action. *Int. J. Pharm.* 1992; 80(1-3):17-31.

- Kim CK, Kim JJ, Chi SC, Shim CK. Effect of fatty acids and urea on the penetration of ketoprofen through rat skin. *Int. J. Pharm.* 1993a; 99(2-3):109-18.
- Kim A, Green PG, Rao G, Guy RH. Convective solvent flow across the skin during iontophoresis. *Pharm. Res.* 1993b; 10(9):1315-20.
- Klang V, Schwarz JC, Lenobel B, Nadj M, Auböck J, Wolzt M, Valenta C. *In vitro vs. in vivo* tape stripping: validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012; 80(3):604-14.
- Klang V, Schwarz JC, Haberfeld S, Xiao P, Wirth M, Valenta C. Skin integrity testing and monitoring of *in vitro* tape stripping by capacitance-based sensor imaging. *Skin Res. Technol.* 2013; 19(1):e259-72.
- Klimentová J, Kosák P, Vávrová K, Holas T, Hrabálek A. Influence of terminal branching on the transdermal permeation-enhancing activity in fatty alcohols and acids. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14(23):7681-7.
- Knepp VM, Hadgraft J, Guy RH. Transdermal drug delivery: problems and possibilities. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1987; 4(1):13-37.
- Kontturi K, Murtomäki L. Mechanistic model for transdermal transport including iontophoresis. *J. Control. Release.* 1996; 41(3):177-85.
- Kralinger MT, Voigt M, Kieselbach G, Hamasaki D, Hayden BC, Parel JM. Ocular delivery of acetylsalicylic acid by repetitive coulomb-controlled iontophoresis. *Ophthalmic. Res.* 2003; 35(2):102-10.
- Krishna R, Pandit JK. Carboxymethylcellulose-sodium based transdermal drug delivery system for propranolol. *J. Pharm. Pharmacol.* 1996; 48(4):367-70.
- Krukemyer JJ, Boudoulas H, Binkley PF, Lima JJ. Comparison of single-dose and steady-state nadolol plasma concentrations. *Pharm. Res.* 1990; 7(9):953-6.
- Kubota K, Yamada T. Finite dose percutaneous drug absorption: theory and its application to *in vitro* timolol permeation. *J. Pharm. Sci.* 1990; 79(11):1015-9.
- Kumar S, Char H, Patel S, Piemontese D, Iqbal K, Malick AW, Neugroschel E, Behl CR. Effect of iontophoresis on *in vitro* skin permeation of an analogue of growth hormone releasing factor in the hairless guinea pig model. *J. Pharm. Sci.* 1992; 81(7):635-9.
- Kumar AP, Ganesh VR, Rao DV, Anil C, Rao BV, Hariharakrishnan VS, Suneetha A, Sundar BS. A validated reversed phase HPLC method for the determination of

- process-related impurities in almotriptan malate API. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008; 46(4):792-8.
- Kunta JR, Goskonda VR, Brotherton HO, Khan MA, Reddy IK. Effect of menthol and related terpenes on the percutaneous absorption of propranolol across excised hairless mouse skin. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86(12):1369-73.
- Lademann J, Otberg N, Jacobi U, Hoffman RM, Blume-Peytavi U. Follicular penetration and targeting. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2005; 10(3):301-3.
- Lademann J, Jacobi U, Surber C, Weigmann HJ, Fluhr JW. The tape stripping procedure-evaluation of some critical parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009; 72(2):317-23.
- Lainez-Andres JM, Caminero A, Diaz-Insa S, Gracia-Naya M, Huerta-Villanueva M, Irimia P, Jimenez-Hernandez MD, Leira R, Sanchez del Rio-Gonzalez M. [Triptans in clinical practice: effectiveness, tolerance and patient's satisfaction with medication (TRIPRACLI study)]. *Rev. Neurol.* 2013; 56(3):143-51.
- Lantéri-Minet M, Duru G, Mudge M, Cottrell S. Quality of life impairment, disability and economic burden associated with chronic daily headache, focusing on chronic migraine with or without medication overuse: a systematic review. *Cephalalgia.* 2011; 31(7):837-50.
- Lboutounne H, Chaulet JF, Ploton C, Falson F, Pirot F. Sustained *ex vivo* skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(epsilon-caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J. Control. Release.* 2002; 82(2-3):319-34.
- Le Brun PPH, Fox PLA, de Vries ME, Bodd'e HE. *In vitro* penetration of some β -adrenoreceptor blocking drugs through porcine buccal mucosa. *Int. J. Pharm.* 1989; 49(2):141-5.
- Leboulanger B, Guy RH, Delgado-Charro MB. Reverse iontophoresis for non-invasive transdermal monitoring. *Physiol. Meas.* 2004; 25(3):35-50.
- Ledger PW. Skin biological issues in electrically enhanced transdermal delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1992; 9(2-3):289-307.
- Lee CK, Uchida T, Kitagawa K, Yagi A, Kim NS, Goto S. Skin permeability of various drugs with different lipophilicity. *J. Pharm. Sci.* 1994; 83(4):562-5.
- Leonhardt H. *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.* George Thieme Verlag, Alemania. 1990; pp. 343-350 (citado el 4 de diciembre de 2012). Disponible en:

<http://www.skin-care-forum.basf.com/en/images-/home/schematic-diagram-of-the-human-skin/schematic-diagram-of-the-human-skin/2001/>.

Liaño H. Tratamiento profiláctico de la migraña. *Rev. Neurol.* 1995; 23 Suppl 2:S212-8.

Linder SL, Mathew NT, Cady RK, Finlayson G, Ishkanian G, Lewis DW. Efficacy and tolerability of almotriptan in adolescents: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Headache.* 2008; 48(9):1326-36.

Lipton RB, Cutrer FM, Goadsby PJ, Ferrari MD, Dodick DW, McCrory D, Liberman JN, Williams P. How treatment priorities influence triptan preferences in clinical practice: perspectives of migraine sufferers, neurologists, and primary care physicians. *Curr. Med. Res. Opin.* 2005; 21(3):413-24.

Liu W, Zhang L, Wei Z, Chen S, Chen G. Analysis of beta-agonists and beta-blockers in urine using hollow fibre-protected liquid-phase microextraction with *in situ* derivatization followed by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2009; 1216(28):5340-6.

Liu KC, Green CR, Alany RG, Rupenthal ID. Synergistic effect of chemical penetration enhancer and iontophoresis on transappendageal transport of oligodeoxynucleotides. *Int. J. Pharm.* 2013; 441(1-2):687-92.

Lo JS, Oriba HA, Maibach HI, Bailin PL. Transepidermal potassium ion, chloride ion, and water flux across delipidized and cellophane tape-stripped skin. *Dermatologica.* 1990; 180(2):66-8.

Lober CW, Fenske NA. Cutaneous aging: effect of intrinsic changes on surgical considerations. *South. Med. J.* 1991; 84(12):1444-6.

Löffler H, Dreher F, Maibach HI. Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. *Br. J. Dermatol.* 2004; 151(4):746-52.

López A, Llinares F, Cortell C, Herráez M. Comparative enhancer effects of Span20 and Tween20 and Azone on the *in vitro* percutaneous penetration of compounds with different lipophilicities. *Int. J. Pharm.* 2000; 202(1-2):133-40.

Lopez RF, Bentley MV, Begoña Delgado-Charro M, Guy RH. Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis. *J. Control. Release.* 2003^a; 88(1):65-70.

- Lopez RF, Bentley MV, Delgado-Charro MB, Salomon D, van den Bergh H, Lange N, Guy RH. Enhanced delivery of 5-aminolevulinic acid esters by iontophoresis *in vitro*. Photochem. Photobiol. 2003b; 77(3):304-8.
- López-Cervantes M, Márquez-Mejía E, Cázares-Delgadillo J, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A, Angeles-Anguiano E. Chemical enhancers for the absorption of substances through the skin: Laurocapram and its derivatives. Drug Dev. Ind. Pharm. 2006; 32(3):267-86.
- Lotte C, Wester RC, Rougier A, Maibach HI. Racial differences in the *in vivo* percutaneous absorption of some organic compounds: a comparison between black, Caucasian and Asian subjects. Arch. Dermatol. Res. 1993; 284(8):456-9.
- MacGregor A, Wikinson M. La migraña y otras cefaleas. Síntomas, causas, diagnóstico, estilo de vida, fármacos, terapias. Ediciones B, Barcelona. 1999.
- Maitani Y, Coutel-Egros A, Obata Y, Nagai T. Prediction of skin permeabilities of diclofenac and propranolol from theoretical partition coefficients determined from cohesion parameters. J. Pharm. Sci. 1993; 82(4):416-20.
- Manabe E, Sugibayashi K, Morimoto Y. Analysis of skin penetration enhancing effect of drugs by ethanol-water mixed systems with hydrodynamic pore theory. Int. J. Pharm. 1996; 129(1-2):211-21.
- Manzoni GC, Stovner LJ. Epidemiology of headache. Handb. Clin. Neurol. 2010; 97:3-22.
- Marchini G, Lindow S, Brismar H, Stabi B, Berggren V, Ulfgren AK, Lonne-Rahm S, Agerberth B, Gudmundsson GH. The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. Br. J. Dermatol. 2002; 147(6):1127-34.
- Marren K. Dimethyl sulfoxide: an effective penetration enhancer for topical administration of NSAIDs. Phys. Sportsmed. 2011; 39(3):75-82.
- Marro D, Guy RH, Delgado-Charro MB. Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin. J. Control. Release. 2001a; 70(1-2):213-7.
- Marro D, Kalia YN, Delgado-Charro MB, Guy RH. Contributions of electromigration and electroosmosis to iontophoretic drug delivery. Pharm. Res. 2001b; 18(12):1701-8.

- Marro D, Kalia YN, Delgado-Charro MB, Guy RH. Optimizing iontophoretic drug delivery: identification and distribution of the charge-carrying species. *Pharm. Res.* 2001c; 18(12):1709-13.
- Martindale: the complete drug reference. Sean C. Sweetman (ed.). Pharmaceutical Press. Londres. 2011; pp. 672, 1478, 1515, 1516, 2695, 2688, 3409, 3430.
- Martin E, Neelissen-Subnel MT, De Haan FH, Boddé HE. A critical comparison of methods to quantify stratum corneum removed by tape stripping. *Skin. Pharmacol.* 1996; 9(1):69-77.
- Marzulli FN, Callahan JF, Brown DW. Chemical structure and skin penetrating capacity of a short series of organic phosphates and phosphoric acid. *J. Invest. Dermatol.* 1965; 44:339-44.
- Mateus R, Abdalghafor H, Oliveira G, Hadgraft J, Lane ME. A new paradigm in dermatopharmacokinetics - Confocal Raman spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 2013; 444(1-2):106-8.
- Matías-Guiu J, Porta-Etessam J, Mateos V, Díaz-Insa S, Lopez-Gil A, Fernández C, Scientific Committee of the PALM Program. One-year prevalence of migraine in Spain: a nationwide population-based survey. *Cephalalgia.* 2011; 31(4):463-70.
- Matschiner S, Neubert RH, Wohlrab W. The use ion pairing to facilitate percutaneous absorption of drugs. *Percutaneous penetration enhancers.* Smith EW, Maibach HI (eds.). CRC Press, Inc. Boca Raton (Florida). 1995; pp. 407-417.
- Mattar EH. Effect of age on the biomechanical and microcirculatory properties of the skin in healthy individuals and during venous ulceration. *Indian J. Dermatol.* 2011; 56(1): 19-24.
- Maurer HH, Tenberken O, Kratzsch C, Weber AA, Peters FT. Screening for library-assisted identification and fully validated quantification of 22 beta-blockers in blood plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J. Chromatogr. A.* 2004; 1058(1-2):169-81.
- McEnroe JD, Fleishaker JC. Clinical pharmacokinetics of almotriptan, a serotonin 5-HT (1B/1D) receptor agonist for the treatment of migraine. *Clin. Pharmacokinet.* 2005; 44(3):237-46.

- Megrab NA, Williams AC, Barry BW. Oestradiol permeation across human skin, silastic and snake skin membranes: The effects of ethanol/water co-solvent systems. *Int. J. Pharm.* 1995; 116(1):101-12.
- Menon GK, Feingold KR, Elias PM. Lamellar body secretory response to barrier disruption. *J. Invest. Dermatol.* 1992; 98(3):279-89.
- Merino V, López A, Kalia YN, Guy RH. Electropulsion *versus* electroosmosis: effect of pH on the iontophoretic flux of 5-fluorouracil. *Pharm. Res.* 1999; 16(5):758-61.
- Meyer W, Schwarz R, Neurand K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. *Curr. Probl. Dermatol.* 1978a; 7:39-52.
- Meyer W, Neurand K, Schwarz R. [Significance of the apocrine skin glands in the general body surface of various domestic mammals]. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 1978b; 85(6):194-7.
- Miller JC, Miller JN. *Statistics for analytical chemistry.* Ellis Horwood, New York. 1993.
- Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. *Pharm. Res.* 1996; 13(3):411-20.
- Mitragotri S, Anissimov YG, Bunge AL, Frasch HF, Guy RH, Hadgraft J, Kasting GB, Lane ME, Roberts MS. Mathematical models of skin permeability: an overview. *Int. J. Pharm.* 2011; 418(1):115-29.
- Mittal A, Sara UV, Ali A, Aqil M. Status of fatty acids as skin penetration enhancers - a review. *Curr. Drug Deliv.* 2009; 6(3):274-9.
- Modamio P, Lastra CF, Mariño EL. A comparative *in vitro* study of percutaneous penetration of beta-blockers in human skin. *Int. J. Pharm.* 2000; 194(2):249-59.
- Moghimi HR, Williams AC, Barry BW. Enhancement by terpenes of 5-fluorouracil permeation through the stratum corneum: model solvent approach. *J. Pharm. Pharmacol.* 1998; 50(9):955-64.
- Moser K, Kriwet K, Naik A, Kalia YN, Guy RH. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2001; 52(2):103-12.
- Mudry B, Guy RH, Delgado-Charro MB. Transport numbers in transdermal iontophoresis. *Biophys. J.* 2006; 90(8):2822-30.

- Muizzuddin N, Hellemans L, Van Overloop L, Corstjens H, Declercq L, Maes D. Structural and functional differences in barrier properties of African American, Caucasian and East Asian skin. *J. Dermatol. Sci.* 2010; 59(2):123-8.
- Mura P, Faucci MT, Bramanti G, Corti P. Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000; 9(4):365-72.
- Murahata RI, Toton-Quinn R, Finkey MB. Effect of pH on the production of irritation in a chamber irritation test. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1988; 18(1 Pt 1):62-6.
- Muzina DJ, Chen W, Bowlin SJ. A large pharmacy claims-based descriptive analysis of patients with migraine and associated pharmacologic treatment patterns. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2011; 7(1):663-72.
- Nair V, Panchagnula R. Physicochemical considerations in the iontophoretic delivery of a small peptide: *in vitro* studies using arginine vasopressin as a model peptide. *Pharmacol. Res.* 2003; 48(2):175-82.
- Nanda A, Nanda S, Ghilzai NM. Current developments using emerging transdermal technologies in physical enhancement methods. *Curr. Drug Deliv.* 2006; 3(3):233-42.
- N'Dri-Stempffer B, Navidi WC, Guy RH, Bunge AL. Optimizing metrics for the assessment of bioequivalence between topical drug products. *Pharm. Res.* 2008; 25(7):1621-30.
- N'Dri-Stempffer B, Navidi WC, Guy RH, Bunge AL. Improved bioequivalence assessment of topical dermatological drug products using dermatopharmacokinetics. *Pharm. Res.* 2009; 26(2):316-28.
- Nickoloff BJ, Naidu Y. Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1994; 30(4):535-46.
- Nicoli S, Bunge AL, Delgado-Charro MB, Guy RH. Dermatopharmacokinetics: factors influencing drug clearance from the stratum corneum. *Pharm. Res.* 2009; 26(4):865-71.
- Nolan LM, Corish J, Corrigan OI, Fitzpatrick D. Combined effects of iontophoretic and chemical enhancement on drug delivery. II. Transport across human and murine skin. *Int. J. Pharm.* 2007; 341(1-2):114-24.
- Northup PG, Henry ZH. Editorial: Beta-blockers and the prevention of decompensation in cirrhosis: worth the trouble. *Am. J. Gastroenterol.* 2012; 107(3):428-30.

- Novotný J, Janusová B, Novotný M, Hrabálek A, Vávrová K. Short-chain ceramides decrease skin barrier properties. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2009; 22(1):22-30.
- OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development, Environment Directorate, and Assessment. Guidance document for the conduct of skin absorption studies. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 28, Paris. 2004^a; pp. 1-31.
- OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline for testing of chemicals. Skin absorption: *in vitro* method (Guideline 428). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing, Paris. 2004^b; pp. 1-8.
- Ogawa H, Yoshiike T. Atopic dermatitis: studies of skin permeability and effectiveness of topical PUVA treatment. *Pediatr. Dermatol.* 1992; 9(4):383-5.
- Ogiso T, Shintani M. Mechanism for the enhancement effect of fatty acids on the percutaneous absorption of propranolol. *J. Pharm. Sci.* 1990; 79(12):1065-71.
- Oh SY, Guy RH. Effects of iontophoresis on the electrical properties of human skin *in vivo*. *Int. J. Pharm.* 1995; 124(1):137-42.
- Ohara N, Takayama K, Nagai T. Combined effect of d-limonene pretreatment and temperature on the rat skin permeation of lipophilic and hydrophilic drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 1995; 18(3):439-42.
- Okabe H, Takayama K, Ogura A, Nagai T. Effect of limonene and related compounds on the percutaneous absorption of indomethacin. *Drug Des. Deliv.* 1989; 4(4):313-21.
- Okabe H, Obata Y, Takayama K, Nagai T. Percutaneous absorption enhancing effect and skin irritation of monocyclic monoterpenes. *Drug Des. Deliv.* 1990; 6(3):229-38.
- Ongpipattanakul B, Burnette RR, Potts RO, Francoeur ML. Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids. *Pharm. Res.* 1991; 8(3):350-4.
- Oshima S, Suzuki C, Yajima R, Egawa Y, Hosoya O, Juni K, Seki T. The use of an artificial skin model to study transdermal absorption of drugs in inflamed skin. *Biol. Pharm. Bull.* 2012; 35(2):203-9.
- Ota Y, Hamada A, Nakano M, Saito H. Evaluation of percutaneous absorption of midazolam by terpenes. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2003; 18(4):261-6.

- Padmanabhan RV, Phipps JB, Lattin GA, Sawchuk RJ. *In vitro* and *in vivo* evaluation of transdermal iontophoretic delivery of hydromorphone. *J. Control. Release.* 1990; 11(1-3):123-35.
- Paduch R, Kandefér-Szerszeń M, Trytek M, Fiedurek J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2007; 55(5):315-27.
- Pailler-Mattei C, Guerret-Piécourt C, Zahouani H, Nicoli S. Interpretation of the human skin biotribological behaviour after tape stripping. *J. R. Soc. Interface.* 2011; 8(60):934-41.
- Panchagnula R, Desu H, Jain A, Khandavilli S. Effect of lipid bilayer alteration on transdermal delivery of a high-molecular-weight and lipophilic drug: studies with paclitaxel. *J. Pharm. Sci.* 2004; 93(9):2177-83.
- Parfitt NR, Skinner MF, Bon C, Kanfer I. Bioequivalence of topical clotrimazole formulations: an improved tape stripping method. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2011; 14(3):347-57.
- Park JH, Lee JW, Kim YC, Prausnitz MR. The effect of heat on skin permeability. *Int. J. Pharm.* 2008; 359(1-2):94-103.
- Pascual J, Castro ME. Fisiopatología de la migraña. *Neurología.* 1998; 13(1):29-32.
- Pascual J. Migraña. Masson, Barcelona. 2001.
- Pascual J. [Chronic migraine: treatment]. *Rev. Neurol.* 2012; 54 Suppl 2:S31-8.
- Patel BR, Kirschbaum JJ, Poet RB. High-pressure liquid chromatography of nadolol and other beta-adrenergic blocking drugs. *J. Pharm Sci.* 1981; 70(3):336-8.
- Patel SR, Zhong H, Sharma A, Kalia YN. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the transdermal iontophoretic delivery of sumatriptan succinate. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2007; 66(2):296-301.
- Patel SR, Zhong H, Sharma A, Kalia YN. Controlled non-invasive transdermal iontophoretic delivery of zolmitriptan hydrochloride *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009; 72(2):304-9.
- Paut O, Camboulives J, Viard L, Lemoing JP, Levron JC. Pharmacokinetics of transdermal fentanyl in peri-operative period in young children. *Anaesthesia.* 2000; 55(12):1202-7.
- Pellet M, Raghavan SL, Hadgraft J, Davis AF. The application of supersaturated systems to percutaneous drug delivery. En: *Transdermal Drug Delivery.* Guy RH, Hadgraft J (eds.). Marcel Dekker Inc. New York. 2003; pp. 305-326.

- Pettis RJ, Harvey AJ. Microneedle delivery: clinical studies and emerging medical applications. *Ther. Deliv.* 2012; 3(3):357-71.
- Phipps JB, Gyory JR. Transdermal ion migration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1992; 9(2-3): 137-76.
- Phipps JB, Scott ER, Gyory R, Padmanabhan RV. Iontophoresis. En: *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. Swarbrick J (ed.). Informa Healthcare USA, Inc. New York. 2007; pp. 2121-2129.
- Pierce M, Marbury T, O'Neill C, Siegel S, Du W, Sebree T. Zelix: a novel transdermal formulation of sumatriptan. *Headache.* 2009; 49(6):817-25.
- Pierre MB, Dos Santos Miranda Costa I. Liposomal systems as drug delivery vehicles for dermal and transdermal applications. *Arch. Dermatol. Res.* 2011; 303(9):607-21.
- Pikal MJ. Transport mechanisms in iontophoresis. I. A theoretical model for the effect of electroosmotic flow on flux enhancement in transdermal iontophoresis. *Pharm. Res.* 1990; 7(2):118-26.
- Pikal MJ, Shah S. Transport mechanisms in iontophoresis. II. Electroosmotic flow and transference number measurements for hairless mouse skin. *Pharm. Res.* 1990^a; 7(3): 213-21.
- Pikal MJ, Shah S. Transport mechanisms in iontophoresis. III. An experimental study of the contributions of electroosmotic flow and permeability change in transport of low and high molecular weight solutes. *Pharm. Res.* 1990^b; 7(3):222-9.
- Pikal MJ. The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 46(1-3):281-305.
- Pilgram GS, van der Meulen J, Gooris GS, Koerten HK, Bouwstra JA. The influence of two azones and sebaceous lipids on the lateral organization of lipids isolated from human stratum corneum. *Biochem. Biophys. Acta.* 2001; 1511(2):244-54.
- Pillai O, Kumar N, Dey CS, Borkute S, Nagalingam S, Panchagnula R. Transdermal iontophoresis of insulin. Part 1: A study on the issues associated with the use of platinum electrodes on rat skin. *J. Pharm. Pharmacol.* 2003; 55(11):1505-13.
- Pirot F, Berardesca E, Kalia YN, Singh M, Maibach HI, Guy RH. Stratum corneum thickness and apparent water diffusivity: facile and noninvasive quantitation *in vivo*. *Pharm. Res.* 1998; 15(3):492-4.

- Pistoia F, Sacco S, Carolei A. Behavioral therapy for chronic migraine. *Curr. Pain Headache Rep.* 2013; 17(1):304.
- Polat BE, Hart D, Langer R, Blankschtein D. Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: mechanisms, scope, and emerging trends. *J. Control. Release.* 2011; 152(3): 330-48.
- Potts RO, Buras EM Jr, Chrisman DA Jr. Changes with age in the moisture content of human skin. *J. Invest. Dermatol.* 1984; 82(1):97-100.
- Pozo-Rosich P. [Chronic migraine: its epidemiology and impact]. *Rev. Neurol.* 2012; 54 Suppl 2:S3-11.
- Prausnitz MR, Bose VG, Langer R, Weaver JC. Electroporation. En: Percutaneous penetration enhancers. Smith EW, Maibach HI (eds.). CRC Press, Florida. 1995; pp. 393-405.
- Pringsheim T, Davenport W, Mackie G, Worthington I, Aubé M, Christie SN, Gladstone J, Becker WJ; Canadian Headache Society Prophylactic Guidelines Development Group. Canadian Headache Society guideline for migraine prophylaxis. *Can. J. Neurol. Sci.* 2012; 39(2 Suppl 2):S1-59.
- Proksch E, Holleran WM, Menon GK, Elias PM, Feingold KR. Barrier function regulates epidermal lipid and DNA synthesis. *Br. J. Dermatol.* 1993; 128(5):473-82.
- Puglia C, Bonina F, Trapani G, Franco M, Ricci M. Evaluation of *in vitro* percutaneous absorption of lorazepam and clonazepam from hydro-alcoholic gel formulations. *Int. J. Pharm.* 2001; 228(1-2):79-87.
- Raiman J, Hänninen K, Kontturi K, Murtomäki J, Hirvonen J. Drug adsorption in human skin: a streaming potential study. *J. Pharm. Sci.* 2003; 92(12):2366-72.
- Raiman J, Koljonen M, Huikko K, Kostianen R, Hirvonen J. Delivery and stability of LHRH and Nafarelin in human skin: the effect of constant/pulsed iontophoresis. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2004; 21(2-3):371-7.
- Ramírez González MA. Adrenérgicos. En: *Farmacología médica*. Mendoza Patiño N (ed.). Panamericana, Madrid. 2008; pp. 242-248.
- Ranade VV, Cannon JB. *Drug Delivery Systems*. CRC Press, Boca Raton, 2011; p. 269.
- Ranta VP, Toropainen E, Talvitie A, Auriola S, Urtti A. Simultaneous determination of eight beta-blockers by gradient high-performance liquid chromatography with

- combined ultraviolet and fluorescence detection in corneal permeability studies *in vitro*. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2002; 772(1):81-7.
- Ravikumar K, Sridhar B, Krishnan H, Singh AN. Almotriptan, an antimigraine agent, and its malate salt. Acta Crystallogr. C. 2008; 64(Pt 1):o15-17.
- Raynauld JP, Laviolette JR. The silver-silver chloride electrode: a possible generator of offset voltages and currents. J. Neurosci. Methods. 1987; 19(3):249-55.
- Reddy LH, Ghosh B. Enhancer aided *in vitro* permeation of atenolol and prazosin hydrochloride through mice skin. Indian J. Exp. Biol. 2001; 39(1):47-51.
- Reddy MB, Stinchcomb AL, Guy RH, Bunge AL. Determining dermal absorption parameters *in vivo* from tape strip data. Pharm. Res. 2002; 19(3):292-8.
- Reed JT, Ghadially R, Elias PM. Skin type, but neither race nor gender, influence epidermal permeability barrier function. Arch. Dermatol. 1995; 131(10):1134-8.
- Rhein LD, Simion FA, Hill RL, Cagan RH, Mattai J, Maibach HI. Human cutaneous response to a mixed surfactant system: role of solution phenomena in controlling surfactant irritation. Dermatologica. 1990; 180(1):18-23.
- Riviere JE, Sage B, Williams PL. Effects of vasoactive drugs on transdermal lidocaine iontophoresis. J. Pharm. Sci. 1991; 80(7):615-20.
- Rizwan M, Aqil M, Talegaonkar S, Azeem A, Sultana Y, Ali A. Enhanced transdermal drug delivery techniques: an extensive review of patents. Recent Pat. Drug Deliv. Formul. 2009; 3(2):105-24.
- Rob Harris MD. Clinical Review Axert (almotriptan malate). En: FDA U.S. Orange book: Approved Drug Therapeutics Equivalence. 2009: 21-001 (018).
- Roberts MS, Walter M. Water: the most natural penetration enhancer. En: Pharmaceutical skin penetration enhancement. Walters KA, Hadgraft J (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York. 1993; pp. 1-30.
- Roberts MS, Walters KA. The relationship between structure and barrier function of skin. En: Dermal Absorption and toxicity assessment. Roberts MS, Walters KA (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York. 1998.
- Roberts MS, Anissimov YG, Gonsalvez RA. Mathematical models in percutaneous absorption. En: Bronaugh RL, Maibach HI (eds.). Percutaneous absorption drugs, cosmetics, mechanisms, methodology. Dekker, New York. 1999; pp. 3-55.

- Roberts MS, Walters KA. Human skin morphology and dermal absorption. En: Dermal absorption and toxicity assessment (2^a ed.). Roberts MS, Walters KA (eds.). Informa Healthcare, New York. 2008; pp. 1-15.
- Romonchuk WJ, Bunge AL. Temperature variations in diffusion cell systems. En: Perspectives in percutaneous penetration (Vol. 9a). Abstracts of presentations at the ninth international perspectives in percutaneous penetration conference held in La Grande Motte. Brain KR, Walters KA (eds.). STS Publishing, Cardiff. 2004; p. 86.
- Roskos KV, Maibach HI, Guy RH. The effect of aging on percutaneous absorption in man. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1989; 17(6):617-30.
- Rowat AC, Kitson N, Thewalt JL. Interactions of oleic acid and model stratum corneum membranes as seen by 2H NMR. *Int. J. Pharm.* 2006; 307(2):225-31.
- Rudy BC, Senkowski BZ. En: Analytical profiles of drug substances (2^a ed.). Florey K (ed). Academic Press, Nueva York. 1973; pp. 221-224.
- Russell LM, Wiedersberg S, Delgado-Charro MB. The determination of stratum corneum thickness: an alternative approach. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008; 69(3):861-70.
- Russell LM, Guy RH. Novel imaging method to quantify stratum corneum in dermatopharmacokinetic studies. *Pharm. Res.* 2012; 29(9):2389-97.
- Sachdeva V, Banga AK. Microneedles and their applications. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 2011; 5(2):95-132.
- Salman SA, Sulaiman SA, Ismail Z, Gan SH. Quantitative determination of propranolol by ultraviolet HPLC in human plasma. *Toxicol. Mech. Methods.* 2010; 20(3):137-42.
- Sandrini G, Perrotta A, Arce Leal NL, Buscone S, Nappi G. Almotriptan in the treatment of migraine. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2007; 3(6):799-809.
- Santi P, Guy RH. Reverse iontophoresis – Parameters determining electroosmotic flow: I. pH and ionic strength. *J. Control. Release.* 1996^a; 38(2-3):159-65.
- Santi P, Guy RH. Reverse iontophoresis – Parameters determining electro-osmotic flow: II. Electrode chamber formulation. *J. Control. Release.* 1996^b; 42(1):29-36.
- Santoianni P, Nino M, Calabro G. Intradermal drug delivery by low-frequency sonophoresis (25 kHz). *Dermatol. Online J.* 2004; 10(2):24.

- Sapra B, Jain S, Tiwary AK. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: mechanistic view. *AAPS J.* 2008; 10(1):120-32.
- Sasaki H, Igarashi Y, Nishida K, Nakamura J. Intestinal permeability of ophthalmic beta-blockers for predicting ocular permeability. *J. Pharm. Sci.* 1994; 83(9):1335-8.
- Scalia S, Mezzena M, Ramaccini D. Encapsulation of the UV filters ethylhexyl methoxycinnamate and butyl methoxydibenzoylmethane in lipid microparticles: effect on *in vivo* human skin permeation. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2011; 24(4):182-9.
- Schaefer H, Lademann J. The role of follicular penetration. A differential view. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2001; 14 Suppl 1:23-7.
- Schäfer-Korting M, Bach N, Knauf H, Mutschler E. Pharmacokinetics of nadolol in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1984; 26(1):125-7.
- Schäfer M, Werner S. The cornified envelope: a first line of defense against reactive oxygen species. *J. Invest. Dermatol.* 2011; 131(7):1409-11.
- Scheuplein RJ. Mechanism of percutaneous adsorption I. Routes of penetration and the influence of solubility. *J. Invest. Dermatol.* 1965; 45(5):334-46.
- Scheuplein RJ. Mechanism of percutaneous absorption. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration. *J. Invest. Dermatol.* 1967. 48(1):79-88.
- Scheuplein RJ, Blank IH, Brauner GJ, MacFarlane DJ. Percutaneous absorption of steroids. *J. Invest. Dermatol.* 1969; 52(1):63-70.
- Scheuplein RJ, Blank IH. Permeability of the skin. *Physiol. Rev.* 1971; 51(4):702-47.
- Scheuplein RJ, Blank IH. Mechanism of percutaneous absorption. IV. Penetration of nonelectrolytes (alcohols) from aqueous solutions and from pure liquids. *J. Invest. Dermatol.* 1973; 60(5):286-96.
- Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in *in-vitro* percutaneous absorption. *Int. J. Pharm.* 2001; 215(1-2):51-6.
- Schoenwald RD, Huang HS. Corneal penetration behavior of beta-blocking agents I: Physicochemical factors. *J. Pharm. Sci.* 1983; 72(11):1266-72.

- Schuetz YB, Carrupt PA, Naik A, Guy RH, Kalia YN. Structure-permeation relationships for the non-invasive transdermal delivery of cationic peptides by iontophoresis. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006; 29(1):53-9.
- Scott RC, Walker M, Dugard PH. A comparison of the *in vitro* permeability properties of human and some laboratory animal skins. *Int. J. Cosmet. Sci.* 1986; 8(4):189-94.
- Scott ER, White HS, Phipps JB. Direct imaging of ionic pathways in stratum corneum using scanning electrochemical microscopy. *Solid State Ionics.* 1992; 53-56(1):176-83.
- Scott ER, White HS, Phipps JB. Iontophoretic transport through porous membranes using scanning electrochemical microscopy: application to *in vitro* studies of ion fluxes through skin. *Anal. Chem.* 1993^a; 65(11):1537-45.
- Scott ER, Laplaza AI, White HS, Phipps JB. Transport of ionic species in skin: contribution of pores to the overall skin conductance. *Pharm. Res.* 1993^b; 10(12):1699-1709.
- SCCS. Scientific Committee on Consumer Safety. Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients (SCCS/1358/10), updated June 2010, adopted by the SCCS during the 7th plenary meeting of 22 June 2010.
- Sekkat N, Kalia YN, Guy RH. Porcine ear skin as a model for the assessment of transdermal drug delivery to premature neonates. *Pharm. Res.* 2004; 21(8):1390-7.
- Shah VP, Flynn GL, Yacobi A, Maibach HI, Bon C, Fleischer NM, Franz TJ, Kaplan SA, Kawamoto J, Lesko LJ, Marty JP, Pershing LK, Schaefer H, Sequeira JA, Shrivastava SP, Wilkin J, Williams RL. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms- methods of evaluation of bioequivalence. *Pharm. Res.* 1998; 15(2):167-71.
- Shao XM, Feldman JL. Micro-agar salt bridge in patch-clamp electrode holder stabilizes electrode potentials. *J. Neurosci. Methods.* 2007; 159(1):108-15.
- Sharma S, Lee J, Gao P, Steele VE. Toxicity profile of solvents by aspiration approach for topical agent delivery to respiratory tract epithelium. *Int. J. Toxicol.* 2011; 30(3):358-66.
- Shen WW, Danti AG, Bruscatto FN. Effect of nonionic surfactants on percutaneous absorption of salicylic acid and sodium salicylate in the presence of dimethyl sulfoxide. *J. Pharm. Sci.* 1976; 65(12):1780-3.
- Shokri J, Nokhodchi A, Dashbolaghi A, Hassan-Zadeh D, Ghafourian T, Barzegar Jalali M. The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. *Int. J. Pharm.* 2001; 228(1-2):99-107.

- Shytle RD, Silver AA, Wilkinson BJ, Sanberg PR. A pilot controlled trial of transdermal nicotine in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder. *World J. Biol. Psychiatry.* 2002; 3(3):150-5.
- Sieg A, Jeanneret F, Fathi M, Hochstrasser D, Rudaz S, Veuthey JL, Guy RH, Delgado-Charro MB. Extraction of amino acids by reverse iontophoresis *in vivo*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009; 72(1):226-31.
- Siegel SJ, O'Neill C, Dubé LM, Kaldeway P, Morris R, Jackson D, Sebree T. A unique iontophoretic patch for optimal transdermal delivery of sumatriptan. *Pharm. Res.* 2007; 24(10):1919-26.
- Simon GA, Maibach HI. Relevance of hairless mouse as an experimental model of percutaneous penetration in man. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 1998; 11(2):80-6.
- Sjögren F, Anderson C. The spectrum of inflammatory cell response to dimethyl sulfoxide. *Contact Dermatitis.* 2000; 42(4):216-21.
- Skin Care Forum BASF (internet). Ludwigshafen (Alemania): BASF The Chemical Company; (actualizado diciembre 2011; citado el 20 de febrero 2013). Disponible en: <http://www.skin-care-forum.basf.com>.
- Sloan KB, Devarajan-Ketha H, Wasdo SC. Dermal and transdermal delivery: prodrugs. *Ther. Deliv.* 2011; 2(1):83-105.
- Smith TR, Goldstein J, Singer R, Pugach N, Silberstein S, Pierce MW. Twelve-month tolerability and efficacy study of NP101, the sumatriptan iontophoretic transdermal system. *Headache.* 2012; 52(4):612-24.
- Smyth HD, Becket G, Mehta S. The influence of porosity changes in human epidermal membrane during iontophoresis on the permeability enhancement of a model peptide. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2009; 35(10):1201-9.
- Soler LI, Boix A, Lauroba J, Colom H, Domenech J. Transdermal delivery of alprazolam from a monolithic patch: formulation based on *in vitro* characterization. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2012; 38(10):1171-8.
- Solomon LM, Esterly NB. Neonatal dermatology. I. The newborn skin. *J. Pediatr.* 1970; 77(5):888-94.

- Srinivas NR, Shyu WC, Shah VR, Campbell DA, Barbhaiya RH. High-performance liquid chromatographic assay for the quantitation of nadolol in human plasma using fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* 1995; 9(2):75-9.
- Stamatialis DF, Rolevink HH, Koops GH. Passive and iontophoretic controlled delivery of salmon calcitonin through artificial membranes. *Curr. Drug Deliv.* 2004; 1(2):137-43.
- Steiling W, Kreutz J, Hofer H. Percutaneous penetration/dermal absorption of hair dyes *in vitro*. *Toxicol. In Vitro.* 2001; 15(4-5):565-70.
- Steiner TJ. Headache in the world: public health and research priorities. *Expert Rev. Pharmacoecon. Outcomes Res.* 2013; 13(1):51-7.
- Stoughton RB, Fritsch W. Influence of dimethylsulfoxide (DMSO) on human percutaneous absorption. *Arch. Dermatol.* 1964; 90(5):512-7.
- Subedi RK, Oh SY, Chun MK, Choi HK. Recent advances in transdermal drug delivery. *Arch. Pharm. Res.* 2010; 33(3):339-51.
- Subedi RK, Ryoo JP, Moon C, Choi HK. Influence of formulation variables in transdermal drug delivery system containing zolmitriptan. *Int. J. Pharm.* 2011; 419(1-2):209-14.
- Sudilovsky A, Elkind AH, Ryan RE Sr, Saper JR, Stern MA, Meyer JH. Comparative efficacy of nadolol and propranolol in the management of migraine. *Headache.* 1987; 27(8):421-6.
- Sugibayashi K, Nemoto M, Morimoto Y. Effect of several penetration enhancers on the percutaneous absorption of indomethacin in hairless rat. *Chem. Pharm. Bull.* 1988; 36(4):1519-28.
- Sugibayashi K, Nakayama S, Seki T, Hosoya K, Morimoto Y. Mechanism of skin penetration-enhancing effect by laurocapram. *J. Pharm. Sci.* 1992; 81(1):58-64.
- Sulzberger MB, Cortese TA Jr, Fishman L, Wiley HS, Peyakovich PS. Some effects of DMSO on human skin *in vivo*. *Ann. NY Acad. Sci.* 1967; 141(1):437-50.
- Suzuki Y, Nagase Y, Iga K, Kawase M, Oka M, Yanai S, Matsumoto Y, Nakagawa S, Fukuda T, Adachi H, Higo N, Ogawa Y. Prevention of bone loss in ovariectomized rats by pulsatile transdermal iontophoretic administration of human PTH(1-34). *J. Pharm. Sci.* 2002; 91(2):350-61.
- Svozil M, Dolezal P, Hrabálek A, Mericka P. *In vitro* studies on transdermal permeation of butorphanol. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2007; 33(5):559-67.

- Sweeney V. Enfoque del paciente con afecciones neurológicas. En: Medicina Interna (2ª ed). Kelley WN (ed.). Médica Panamericana S.A. Madrid. 1992; pp. 2524-2526.
- Tan Z, Zhang J, Wu J, Fang L, He Z. The enhancing effect of ion-pairing on the skin permeation of glipizide. AAPS PharmSciTech. 2009; 10(3):967-76.
- Tanojo H, Bos-van Geest A, Bouwstra JA, Junginger HE. *In vitro* human skin barrier perturbation by oleic acid: thermal analysis and freeze fracture electron microscopy studies. Thermochim. Acta. 1997; 293(1-2):77-85.
- Tassinary LG, Geen TR, Cacioppo JT, Edelberg R. Issues in biometrics: offset potentials and the electrical stability of Ag/AgCl electrode. Psychophysiology. 1990; 27(2):236-42.
- Tepper SJ, Spears RC. Acute treatment of migraine. Neurol. Clin. 2009; 27(2):417-27.
- Tfelt-Hansen P, De Vries P, Saxena PR. Triptans in migraine: a comparative review of pharmacology, pharmacokinetics and efficacy. Drugs. 2000; 60(6):1259-87.
- Tfelt-Hansen P. Meta-analysis of oral triptans. Cephalalgia. 2004; 24(8):688.
- Tfelt-Hansen P. Optimal balance of efficacy and tolerability of oral triptans and telcagepant: a review and a clinical comment. J. Headache Pain. 2011; 12(3):275-80.
- Thomas NS, Panchagnula R. Transdermal delivery of zidovudine: effect of vehicles on permeation across rat skin and their mechanism of action. Eur. J. Pharm. Sci. 2003; 18(1):71-9.
- Thysman S, Pr at V, Roland M. Factors affecting iontophoretic mobility of metoprolol. J. Pharm. Sci. 1992; 81(7):670-5.
- Thysman S, Hanchard C, Pr at V. Human calcitonin delivery in rats by iontophoresis. J. Pharm. Pharmacol. 1994; 46(9):725-30.
- Tierney MJ, Tamada JA, Potts RO, Jovanovic L, Garg S, Cygnus Research Team. Clinical evaluation of the GlucoWatch biographer: a continual, non-invasive glucose monitor for patients with diabetes. Biosens. Bioelectron. 2001; 16(9-12):621-9.
- Touitou E, Godin B, Karl Y, Bujanover S, Becker Y. Oleic acid, skin penetration enhancer, affects Langerhans cells and corneocytes. J. Control. Release. 2002; 80(1-3):1-7.
- Trebilcock KL, Heylings JR, Wilks MF. *In vitro* tape stripping as a model for *in vivo* skin stripping. Toxicol. In Vitro. 1994; 8(4):665-7.

- Treffel P, Panisset F, Faivre B, Agache P. Hydration, transepidermal water loss, pH and skin surface parameters: correlations and variations between dominant and non-dominant forearms. *Br. J. Dermatol.* 1994; 130(3):325-8.
- Tsai JC, Cappel MJ, Weiner ND, Flynn GL, Ferry J. Solvent effects on the harvesting of stratum corneum from hairless mouse skin through adhesive tape stripping *in vitro*. *Int. J. Pharm.* 1991^a; 68(1-3):127-33.
- Tsai JC, Weiner ND, Flynn GL, Ferry J. Properties of adhesive tapes used for stratum corneum stripping. *Int. J. Pharm.* 1991^b; 72(3):227-31.
- Tsai JC, Lin CY, Sheu HM, Lo YL, Huang YH. Noninvasive characterization of regional variation in drug transport into human stratum corneum *in vivo*. *Pharm. Res.* 2003; 20(4):632-8.
- Tsuzuki N, Wong O, Higuchi T. Effect on primary alcohols on percutaneous absorption. *Int. J. Pharm.* 1988; 46(1-2):19-23.
- Turner NG, Ferry L, Price M, Cullander C, Guy RH. Iontophoresis of poly-L-lysines: the role of molecular weight?. *Pharm. Res.* 1997; 14(10):1322-31.
- Turner NG, Guy RH. Iontophoretic transport pathways: dependence on penetrant physicochemical properties. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86(12):1385-9.
- Umezawa H, Lee XP, Arima Y, Hasegawa C, Izawa H, Kumazawa T, Sato K. Simultaneous determination of beta-blockers in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 2008; 22(7):702-11.
- Valenta C, Siman U, Kratzel M, Hadgraft J. The dermal delivery of lignocaine: influence of ion pairing. *Int. J. Pharm.* 2000; 197(1-2):77-85.
- van de Sandt JJ, Rutten AA. Differential effects of chemical irritants in rabbit and human skin organ cultures. *Toxicol. In Vitro.* 1995; 9(2):157-68.
- van der Valk PG, Maibach HI. A functional study of the skin barrier to evaporative water loss by means of repeated cellophane-tape stripping. *Clin. Exp. Dermatol.* 1990; 15(3):180-2.
- van Ravenzwaay B, Leibold E. A comparison between *in vitro* rat and human and *in vivo* rat skin absorption studies. *Hum. Exp. Toxicol.* 2004; 23(9):421-30.

- Vecchia BE, Bunge AL. Animal models: a comparison of permeability coefficients for excised skin from humans and animals. En: Dermal absorption models in toxicology and pharmacology. Riviere JE (ed.). Taylor & Francis, Boca Raton. 2005; pp. 303-365.
- Visscher MO, Utturkar R, Pickens WL, LaRuffa AA, Robinson M, Wickett RR, Narendran V, Hoath SB. Neonatal skin maturation-vernix caseosa and free amino acids. *Pediatr. Dermatol.* 2011; 28(2):122-32.
- Vollmer DL, Szlek MA, Kolb K, Lloyd LB, Parkinson TM. *In vivo* transscleral iontophoresis of amikacin to rabbit eyes. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2002; 18(6):549-58.
- Vuorio M, Manzanares JA, Murtomäki L, Hirvonen J, Kankkunen T, Kontturi K. Ion-exchange fibers and drugs: a transient study. *J. Control. Release.* 2003; 91(3):439-48.
- Wachsman W, Morhenn V, Palmer T, Walls L, Hata T, Zalla J, Scheinberg R, Sofen H, Mraz S, Gross K, Rabinovitz H, Polsky D, Chang S. Noninvasive genomic detection of melanoma. *Br. J. Dermatol.* 2011; 164(4):797-806.
- Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from *in vitro* experiments with human skin and skin equivalents. *J. Control. Release.* 2001; 75(3):283-95.
- Walters KA, Hadgraft J. Pharmaceutical skin enhancement. Marcel Dekker Inc., New York. 1993.
- Walters KA. Dermatological and transdermal formulations. Marcel Dekker Inc., New York. 2002.
- Wang Y, Thakur R, Fan Q, Michniak B. Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005^a; 60(2):179-91.
- Wang MY, Yang YY, Heng PW. Skin permeation of physostigmine from fatty acids-based formulations: evaluating the choice of solvent. *Int. J. Pharm.* 2005^b; 290(1-2):25-36.
- Wang CY, Maibach HI. Why minimally invasive skin sampling techniques? A bright scientific future. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 2011; 30(1):1-6.
- Ward AJI, Tallon R. Penetration enhancer incorporation in bilayers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1988; 14(9):1155-66.

- Watkinson RM, Herkenne C, Guy RH, Hadgraft J, Oliveira G, Lane ME. Influence of ethanol on the solubility, ionization and permeation characteristics of ibuprofen in silicone and human skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2009; 22(1):15-21.
- Wei R, Simon L, Hu L, Michniak-Kohn B. Effects of iontophoresis and chemical enhancers on the transport of lidocaine and nicotine across the oral mucosa. *Pharm. Res.* 2012; 29(4):961-71.
- Weigand DA, Haygood C, Gaylor JR. Cell layers and density of Negro and Caucasian stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 1974; 62(6):563-8.
- Wertz PW, Downing DT. Stratum corneum: biological and biochemical considerations. En: *Transdermal drug delivery: development issues and research initiatives.* Hadgraft J, Guy RH (eds.). Marcel Dekker, New York. 1989; pp. 1-22.
- Wertz PW, Swartzendruber DC, Kitko DJ, Madison KC, Downing DT. The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 1989; 93(1):169-72.
- Wester RC, Maibach HI. Penetration enhancement by skin hydration. En: *Percutaneous penetration enhancers.* Smith EW, Maibach HI (eds.). CRC Press, Boca Raton. 1995; pp. 21-28.
- Wester RC, Maibach HI. Regional variation in percutaneous absorption. En: *Percutaneous Absorption: drugs, cosmetics, mechanisms, methodology (3^a ed).* Bronaugh RL, Maibach HI (eds.). Marcel Dekker, New York. 1999; pp. 107-116.
- Wesley NO, Maibach HI. Racial (ethnic) differences in skin properties: the objective data. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2003; 4(12):843-60.
- Wiechers JW, de Zeeuw RA. Transdermal drug delivery: efficacy and potential applications of the penetration enhancer Azone. *Drug Des. Deliv.* 1990; 6(2):87-100.
- Wiechers J. Use of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery-possibilities and difficulties. *Acta Pharm. Nord.* 1992; 4(2):123.
- Wiedersberg S, Leopold CS, Guy RH. Dermatopharmacokinetics of betamethasone 17-valerate: influence of formulation viscosity and skin surface cleaning procedure. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009^a; 71(2):362-6.

- Wiedersberg S, Naik A, Leopold CS, Guy RH. Pharmacodynamics and dermatopharmacokinetics of betamethasone 17-valerate: assessment of topical bioavailability. *Br. J. Dermatol.* 2009b; 160(3):676-86.
- Wilkes GL, Brown IA, Wildnauer RH. The biomechanical properties of skin. *CRC Crit. Rev. Bioeng.* 1973; 1(4):453-95.
- Wilkinson SC, Williams FM. Effects of experimental conditions on absorption of glycol ethers through human skin *in vitro*. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2002; 75(8): 519-27.
- Wilkinson SC, Maas WJ, Nielsen JB, Greaves LC, van de Sandt JJ, Williams FM. Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2006; 79(5):405-13.
- Williams AC, Barry BW. Urea analogues in propylene glycol as penetration enhancers in human skin. *Int. J. Pharm.* 1989; 56(1):43-50.
- Williams AC, Barry BW. Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Pharm. Res.* 1991; 8(1):17-24.
- Williams AC. Urea and its derivatives as penetration enhancers. En: *Percutaneous penetration enhancers*. Smith EW, Maibach HI (eds.). CRC Press, Boca Raton. 1995; pp. 289-296.
- Williams AC. *Transdermal and topical drug delivery*. Pharmaceutical Press, London. 2003; pp. 1-23, 90.
- Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56(5):603-18.
- Yamada M, Uda Y. Enhancement of percutaneous absorption of molsidomine. *Chem. Pharm. Bull.* 1987; 35(8):3390-8.
- Yamane MA, Williams AC, Barry BW. Terpene penetration enhancers in propylene glycol/water co-solvent systems: effectiveness and mechanism of action. *J. Pharm. Pharmacol.* 1995; 47(12A):978-89.
- Yoshida NH, Roberts MS. Solute molecular size and transdermal iontophoresis across excised human skin. *J. Control. Release.* 1993; 25(3):177-95.
- Yoshida NH, Roberts MS. Prediction of cathodal iontophoretic transport of various anions across excised skin from different vehicles using conductivity measurements. *J. Pharm. Pharmacol.* 1995; 47(11):883-90.

Zarranz JJ. Neurología (3^a ed.). Elsevier España, Madrid. 2003; pp. 166-172.

Zecuity™ - Migraine treatment (internet). Conshohocken, Pensilvania (Estados Unidos): NuPathe Innovating Neuroscience; (actualizado febrero 2013; citado el 17 de abril 2013). Disponible en: <http://www.zecuity.com>.

Zempsky WT, Sullivan J, Paulson DM, Hoath SB. Evaluation of a low-dose lidocaine iontophoresis system for topical anesthesia in adults and children: a randomized, controlled trial. Clin. Ther. 2004; 26(7):1110-9.

Zhai H, Maibach HI. Effects of skin occlusion on percutaneous absorption: an overview. Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. 2001; 14(1):1-10.

Zhang J, Liu M, Jin H, Deng L, Xing J, Dong A. *In vitro* enhancement of lactate esters on the percutaneous penetration of drugs with different lipophilicity. AAPS PharmSciTech. 2010; 11(2):894-903.

Zhang J, Sun M, Fan A, Wang Z, Zhao Y. The effect of solute-membrane interaction on solute permeation under supersaturated conditions. Int. J. Pharm. 2013; 441(1-2):389-94.

Zhao K, Singh J. *In vitro* percutaneous absorption enhancement of propranolol hydrochloride through porcine epidermis by terpenes/ethanol. J. Control. Release. 1999; 62(3):359-66.

