Universidad de Santiago de Compostela

Promoción de la penetración transdérmica de metotrexato

María Javiera Álvarez Figueroa

Tesis de Doctorado

Facultad: Farmacia

Directora: Dr. José Blanco Méndez

2001

Universidad de Santiago de Compostela
Facultad de Farmacia
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Promoción de la penetración transdérmica de metotrexato

María Javiera Alvarez Figueroa
Santiago de Compostela, 2000.

Agracedimientos

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Es difícil expresar en un par de líneas mis agradecimientos a las personas que he tenido cerca en estos años de tesis.

Comienzo por mi profesor guía, José Blanco, quién me dio la oportunidad de venir a este país (España) a realizar mis estudios de doctorado. A la Pontificia Universidad Católica de Chile, por su apoyo económico y su incondicional ayuda durante todo mi período de estancia doctoral. En especial a Patricia Mallea (encargada de becas de la Vicerrectoría Académica) y a Luis Hernán Tagle (Decano de la Facultad de Química).

A mi familia, que aunque nos separan miles de kilómetros de distancia, gracias a sus “e-mails” diarios, me permitieron sentirlos muy cerca.

Ahora es el turno de agradecerle a mis amigos (que son muchos). Sin sus consejos, su apoyo, sus risas, sus ganas de conocer y conquistar el mundo, estos años no hubieran sido tan significativos e importantes para mí.

Comienzo por la persona que contribuyó a que esta tesis tomara forma: Edison. Gracias al préstamo de su casa con ordenador incluido, el período de escritura de mi tesis fue relajado y muy productivo. A Mirtha Mayra, siempre receptiva y dispuesta a escucharme y darme ánimo. A Lisardo, por su gran paciencia y apoyo en mis momentos de bajas anímicas.

A los de la planta piloto: a Ana buena buenísima (Gómez) y a la Congui (Belén), que ayudaron a que la risa estuviera constantemente en mi cara. A los de prácticas: Margo, Rafa, Libia, Ana Portero, Kevin, Angela, siempre dispuestos a solucionar problemas y a darme aliento cuando las cosas no iban por buen camino.

A los de mi laboratorio. Algunos que ya no están: Leisy, Elena, Charo, Marcello, Francesco y a los que van quedando: María, por tener siempre la paciencia de descubrir los “problemas técnicos” del HPLC y Chus.

A otros muchos amigos: a Magdalena, a Anita (de la planta piloto), a Ludwing y a Serguito por sus abundantes y divertidos halagos.

A los profesores de este departamento por su amable acogida. En especial a Fran, que siempre estuvo dispuesto a solucionar mis problemas computacionales.

A todos, gracias. Hicieron de estos años, unos años muy gratos de mi vida.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Indice

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Introducción y Objetivos 1

Revisión Bibliográfica 5

Parte I: Metotrexato y su uso en Psoriasis 7
Metotrexato 7
- Farmacocinética 9
- Reacciones adversas 11
- Contraindicaciones 11

Psoriasis 12
Tratamiento de la Psoriasis 13
- Metotrexato y su uso en psoriasis 13
- Metotrexato por vía tópica 14

Parte II: Absorción Transdérmica 15
La piel 15
- Epidermis 17
- Dermis 18
- Hipodermis o tejido subcutáneo 19
- Vasos y nervios de la piel 19

Administración transdérmica de fármacos 19
- Fundamentos de la absorción transdérmica 20
- Factores que afectan la permeabilidad transdérmica 22
- Sistemas de liberación trandérmicos 24

Nuevas estrategias de administración trandérmica 27
- Promotores de la absorción 27
- Iontoforesis 28
- Electroporación y Sonoforesis 29
- Iontoforesis reversa 30
- Nuevas formulaciones 30

Parte III: Iontoforesis 31
Fundamentos de la técnica de iontoforesis 34
Rutas de penetración de principios activos durante la iontoforesis 35
Mecanismos de transporte de los principios activos durante la iontoforesis 36
Componentes de un sistema de liberación iontoforético 39
Montaje de un sistema de iontoforesis “in vitro” 44

Parte IV: Hidrogeles 47
Polimerización 48
Tipos de reacciones de polimerización 52
Composición de los hidrogeles 53
Síntesis de los hidrogeles 56
Técnicas de síntesis de los hidrogeles 57
Propiedades de los hidrogeles 57
Los hidrogeles como sistemas de liberación de fármacos 61

Aplicación de corriente eléctrica a los hidrogeles..... 62
Parte V: Microemulsiones..... 63
Componentes de una microemulsión..... 64
Estudio de formación de una microemulsión..... 66
Clasificación de las microemulsiones..... 66
Elaboración de las microemulsiones..... 68
Aplicaciones de las microemulsiones..... 68

Materiales y Métodos..... 71

Estudio de difusión pasiva de soluciones de MTX..... 73
Montaje del experimento..... 73
Cuantificación del MTX..... 74
Análisis de los datos..... 76
Estudio de iontoforesis de soluciones de MTX..... 77
Determinación de la solubilidad del MTX en las diferentes soluciones donantes empleadas..... 77
Montaje del experimento..... 77
Cuantificación del MTX..... 80
Análisis de los datos..... 80
Síntesis y caracterización de los hidrogeles..... 81
Síntesis de hidrogeles..... 81
Estudios de hinchamiento..... 82
Determinación del pH en el interior del hidrogel..... 83
Estudios de captación de MTX en los hidrogeles..... 83
Estudio de distribución del MTX dentro de los hidrogeles..... 84
Paso transdérmico de metotrexato a partir de hidrogeles utilizando la técnica de iontoforesis..... 86
Montaje del experimento..... 86
Cuantificación del MTX..... 87
Análisis de los datos..... 88
Microemulsiones..... 89
Preparación de las microemulsiones..... 89
Cuantificación del MTX para los estudios de solubilidad..... 92
Estudios de solubilidad del MTX en las microemulsiones..... 93
Estudio de difusión pasiva de microemulsiones de MTX..... 93
Cuantificación del MTX para los estudios de difusión..... 94
Análisis de los datos..... 94

Resultados y Discusión..... 95

Estudio de difusión pasiva de soluciones de MTX..... 97
Montaje del experimento..... 97
Recta de calibrado..... 97
Determinación del MTX en la solución receptora y en la piel..... 98

Estudio de iontoforesis de soluciones de MTX..... 100
Determinación de la solubilidad del MTX en las diferentes soluciones donantes empleadas..... 100
Montaje del experimento..... 101
Comparación de estudios de difusión pasiva y de iontoforesis..... 102
Caracterización del transporte iontoforético del MTX..... 102
Determinación de MTX en la piel..... 111
Obtención y caracterizacón de los hidrogeles..... 114
Síntesis de los de los hidrogeles..... 114
Estudios de hinchamiento..... 114
Determinación del pH en el interior de los hidrogeles..... 119
Estudios de captación de MTX en los hidrogeles..... 119
Estudio de distribución del MTX dentro de los hidrogeles..... 122
Paso transdérmico de metotrexato a partir de hidrogeles utilizando la técnica de iontoforesis..... 123
Montaje del experimento..... 123
Cuantificación del MTX..... 124
Determinación del MTX en la solución receptora..... 124
Determinación del MTX en la piel..... 126
Microemulsiones..... 128
Preparación de las microemulsiones..... 128
Cuantificación del MTX en las microemulsiones..... 128
Estudios de solubilidad del MTX en las microemulsiones..... 129
Estudio de difusión pasiva de microemulsiones de MTX..... 131

Conclusiones..... 141

Bibliografía..... 145

Publicaciones..... 163

Passive and iontophoretic transdermal penetration of methotrexate..... 165
Transdermal delivery of methotrexate: iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions..... 171

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Introducción y Objetivos

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

El Metotrexato (MTX) es un agente antineoplásico de la familia de los antagonistas del ácido fólico. Es una sustancia que inhibe en forma competitiva a la enzima dihidrofolato reductasa cuya función está relacionada con la síntesis del DNA (Chlátek y col. 1998).

Este compuesto por disminuir la actividad mitótica celular, también es efectivo en el tratamiento de la psoriasis recalcitrante (Vaidyanathan y col. 1985; Lu y col. 1997): una patología cutánea caracterizada por la hiperproliferación de células de la epidermis, observándose áreas de engrosamiento cutáneo y lesiones eritematosas en determinadas zonas del cuerpo (especialmente en la espalda, los codos, las rodillas y el cuero cabelludo) (Ghadially y col. 1996; Tan y col. 1998).

El MTX ha demostrado ser efectivo para el tratamiento de la psoriasis cuando se utiliza por vía oral o parenteral y por períodos de tiempo prolongados. Sin embargo, se han observado numerosos efectos adversos asociados a su uso sistémico como náuseas, vómitos, fatigas, dolor de cabeza, disnea, leucopenia, trombocitopenia, anemia y toxicidad hepática (Van Dooren-Greebe y col. 1994; Bookbinder y col. 1984). Para disminuir esta toxicidad se ha intentado su administración por vía tópica y con este propósito se ha estudiado su incorporación en pomadas, cremas, ungüentos y geles (Hwang y col. 1995; Singh y col. 1995; Weintein y col. 1989; Chatterjee y col. 1997; Trotta y col. 1996); no existiendo todavía ningún producto comercial de uso tópico para este fármaco.

El MTX es una molécula hidrosoluble, que tiene un peso molecular elevado y que está mayoritariamente disociado a pH fisiológico por lo que su capacidad de penetrar a través de la piel por mecanismos de difusión pasiva es limitada. Por ello, el objetivo fundamental de este trabajo de investigación fue estudiar ciertas técnicas y/o vehículos de administración transdérmica que permitan aumentar la penetración de este fármaco. Con este fin se estudio la técnica de iontoforesis, que consiste en la aplicación de un campo eléctrico a través de la piel, ya que es una técnica interesante para aumentar la penetración de moléculas cargadas, neutras y/o moléculas polares (como es el caso del manitol y la glucosa) (Rao y col. 1993; Kim y col. 1993). En este contexto, el objetivo de nuestro trabajo fue estudiar los factores que influyen en el electrotransporte del MTX a través de piel de cerdo: concentración de fármaco, cantidad de corriente aplicada, fuerza iónica y pH.

Posteriormente se estudió la técnica de iontoforesis utilizando como vehículo a los hidrogeles ya que estos sistemas permiten modular la cinética de liberación de ciertos principios activos. Ellos pueden diseñarse para liberar fármacos de forma específica, predeterminada, predecible y por períodos de tiempo programados (Kim y col. 1992; Vakkalanka y col. 1996).

Finalmente, se estudió la incorporación del MTX en microemulsiones. Estos sistemas han sido reconocidos como vehículos adecuados para la administración de fármacos ya que incrementan la penetración transdérmica por diferentes mecanismos: tienen la capacidad de solubilizar un gran número de fármacos, provocan un cambio en la actividad termodinámica de los fármacos que contienen produciendo una modificación en su componente de reparto y además, contienen surfactantes que reducen la función barrera que posee el estrato córneo (Osborne y col. 1991; Thacharodi y col. 1994; Delgado-Charro y col. 1997).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Revisión Bibliográfica

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Parte I: Metotrexato y su uso en Psoriasis

Metotrexato

El metotrexato (MTX, fig.1) es un compuesto sólido de color amarillo anaranjado. Es una molécula de carácter ácido que presenta tres valores de pKa y que a pH fisiológico está mayoritariamente ionizada.

Es poco soluble en bases lipofílicas, prácticamente insoluble en agua, etanol, cloroformo y éter; y muy soluble en soluciones diluidas de álcalis o carbonatos (Bookbinder y col. 1984; Florey 1976; Jackson y col. 1986; Lu y col. 1998; Merck 1996).

Es un compuesto que se degrada con la luz por lo que es importante protegerlo adecuadamente frente a ella. Los productos de degradación corresponden a 2,4-diamino-6-pteridinecarbaldehido, ácido 2,4-diamino-6-pteridina carboxílico y ácido p-aminobenzolglutámico. Esta reacción es de orden cero con respecto a la concentración de MTX y es catalizada por el ión bicarbonato (Chatterji y col. 1978)

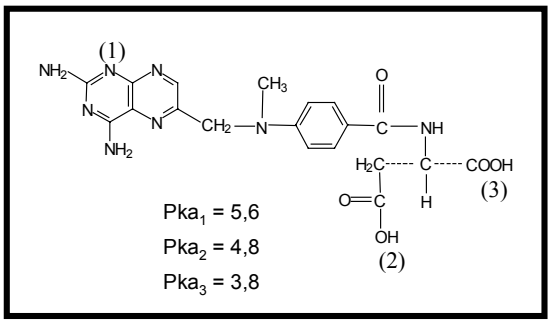


Figura 1: Estructura química del metotrexato (ácido 4-amino-10 metilpteroil- L glutámico). PM = 454,56 g/mol. Lop P oct/agua = -1,85 (Jackson y col. 1986).

Este compuesto tienen propiedades farmacológicas siendo considerado como un agente antineoplásico de la familia de los antagonistas del ácido fólico ya que inhibe en forma competitiva a la enzima dihidrofolato reductasa. Esta enzima tiene por función reducir los dihidrofolatos a tetrahidrofolatos. El tetrahidrofolato (FH_4) actúa como factor de transferencia de grupos metilo (CH_3) en diversos procesos implicados en la síntesis de aminoácidos, así como también en la síntesis de bases nucleicas. Por consiguiente, el ácido fólico es indispensable para la síntesis de DNA (Breithaupt y col. 1982; Cuéllar R. 1998; Lawson y col. 1981).

En condiciones normales, el ácido fólico se encuentra almacenado en el citoplasma bajo la forma de poliglutamato. La forma biológicamente activa del ácido fólico (F) es el tetrahidrofolato (FH_4). El proceso de activación se realiza en dos pasos mediante una única enzima, la dihidrofolato reductasa, pasando primero de F a FH_2 (dihidrofolato) y posteriormente a FH_4. El MTX inhibe selectivamente la dihidrofolato reductasa, al competir con el FH_2; de hecho, el MTX tiene más afinidad por la enzima que el propio sustrato natural. El resultado es la formación de un complejo ternario estable entre el MTX, la enzima y el NADPH que actúa como cofactor de la reacción (Cuéllar R. 1998; Goodman 1996).

El MTX presenta múltiples aplicaciones terapéuticas, además de aquellas derivadas de su acción antineoplásica. Este fármaco ha mostrado tener también efecto inmunosupresor e inhibidor de la proliferación celular. Debido a estas otras propiedades farmacológicas, el MTX se ha empleado para el tratamiento de la artritis reumatoide (en sus fases progresivas), de la vasculitis, de la sarcoidosis y de la psoriasis (Cuéllar R. 1998; Lu y col. 1997; Velasco y col. 1993).

Farmacocinética

Administración

El MTX es utilizado normalmente por vía oral, parenteral o intravenosa, aunque últimamente se están estudiando formas farmacéuticas de uso tópico.

Este fármaco, se absorbe fácilmente del tracto gastrointestinal en las dosis que se emplean comúnmente en la práctica clínica (0,1 mg/kg), pero a dosis mayores se absorbe en forma incompleta (Bookbinder y col. 1984; Goodman 1996). Este hecho sugiere la existencia de un mecanismo saturable de absorción intestinal (Cercós-Fortea y col. 1997; Tung y col. 1990).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

La presencia de alimentos, especialmente leche, disminuyen su biodisponibilidad (Tung y col. 1990).

Distribución

En equilibrio, las mayores concentraciones del fármaco se encuentran en los riñones, la vesícula biliar, el bazo, el hígado y la piel (Tung y col. 1990). Se transporta escasamente a través de la barrera hematoencefálica, por lo que las células neoplásicas que han entrado al sistema nervioso central no están afectadas por las concentraciones plasmáticas habituales de este fármaco (Goodman 1996).

Entre el 50%-70% del MTX está unido a proteínas plasmáticas, en su mayoría a albúmina. Los fármacos que desplazan al MTX en su unión a proteínas (como se observa en la tabla 1) incrementan considerablemente la concentración plasmática de este principio activo (Bookbinder y col. 1984; Goodman 1996).

Debido a que existe una relación compleja entre el volumen de distribución y el aclaramiento que experimenta el MTX, las vidas medias aparentes que presenta este fármaco no se calculan aplicando un método farmacocinético lineal tradicional. Un modelo bicompartimental, con una vida media inicial α de 2 – 3 horas y una vida media terminal, ó β, de aproximadamente 10 horas, parecen representar razonablemente la fase de eliminación de este fármaco (Winter 1988).

Metabolismo

Este fármaco no parece metabolizarse de manera significativa (Akimoto y col. 1997; Goodman 1996). Sin embargo, se han encontrado metabolitos del MTX en el plasma y en la orina cuando este fármaco se administra en dosis elevadas. La cantidad de metabolitos formados es

aproximadamente 3 veces mayor cuando se administra por vía oral que parenteral, esto sugiere que el metabolismo del MTX ocurre principalmente en el tracto gastrointestinal o bien en el hígado por causa de la recirculación enterohepática (Bookbinder y col. 1984).

Fármaco	Mecanismo	Efecto
Barbitúricos Sulfonamidas Salicilatos Probenecid Fenilbutazona Fenitoína	Desplazamiento de MTX de las proteínas del plasma	Incremento en la conc. de MTX libre
Fenilbutazona AINE Sulonamidas Probenecid Salicilatos	Reducción de la eliminación renal de MTX	Prolonga la vida media sérica de MTX
Dipiridamol	Acumulación intracelular de MTX	Prolonga el efecto de MTX

Tabla 1: Interacción del MTX con otros fármacos (Tung y col. 1990).

Los metabolitos del MTX que se han detectado corresponden al ácido 2,4, diamino-10-metil-esteroico, al 7-hidroximetotrexato y a derivados poliglutamílicos de este fármaco. Estos últimos han mostrado ser potentes inhibidores de la enzima dihidrofolato reductasa ya que forman un complejo de lenta disociación con ella (Tung y col. 1990).

Excreción

El metotrexato se excreta principalmente por el riñón vía filtración glomerular y transporte activo (95%). Entre 1-2% de la dosis excretada es eliminada por las heces ya sea como compuesto original o como alguno de sus metabolitos (Bookbinder y col. 1984; Cercós-Fortea y col. 1997).

La reabsorción tubular de MTX es un proceso saturable por lo que una concentración plasmática de más de 1 mg/mL produce un incremento en el aclaramiento de este fármaco (Tung y col. 1990).

Reacciones adversas y toxicidad

Se han observado numerosos efectos adversos asociados al empleo de MTX. Algunas de estas reacciones son: náuseas, vómitos, dolor abdominal, complicaciones gástricas, úlcera gástrica, fatigas, dolor de cabeza, disnea, leucopenia, trombocitopenia, anemia y pérdida de cabello (Bookbinder y col. 1984; Van Dooren-Greebe y col. 1994). Estas reacciones están relacionadas con la dosis y son reversibles. Además, como el MTX es introducido en el citoplasma mediante el mismo sistema de transporte activo que el ácido fólico y este sistema no está presente en los microorganismos, su acción citotóxica es exclusiva de las células de los mamíferos (Cuéllar R. 1998).

Según un estudio realizado en personas que emplean MTX en forma prolongada (por más de 20 años), se ha observado que este fármaco es relativamente seguro y que no existe una aparente relación entre la cantidad acumulada de MTX (o duración de la terapia) y la frecuencia de reacciones adversas. Estas reacciones pueden presentarse en cualquier fase del tratamiento, y puede suceder que los pacientes que han ingerido por muchos años MTX sin presentar problemas aparentes frente a este fármaco, si los presenten en el futuro (Van Dooren-Greebe y col. 1994).

Uno de los principales problemas observados luego del uso de MTX es la toxicidad hepática. Sin embargo, el desarrollo de fibrosis y la cirrosis por la acumulación de MTX en el hígado aún no ha sido demostrado (Chládek y col. 1998; Lawson y col. 1981).

La monitorización sérica de los niveles de MTX es esencial para detectar el desarrollo de toxicidad y para poder actuar adecuadamente y de forma rápida frente a ella. La cuantificación sérica de su metabolito 7 hidroximetotrexato es importante ya que este compuesto está relacionado con la toxicidad renal que presenta el MTX (Lawson y col. 1981).

Cuando existe intoxicación con MTX o cuando se desarrolla toxicidad renal debido al uso de este fármaco, se debe administrar folato cálcico, ya sea por vía intramuscular, intravenosa u oral. Se requieren de al menos 6 horas para que las concentraciones s´ricas de MTX bajen a niveles terapéuticos (Tung y col. 1990).

Contraindicaciones

El MTX es conocido como un fármaco teratogénico por lo que su uso está contraindicado en pacientes embarazadas y se debe emplear conjuntamente con fármacos anticonceptivos en mujeres de edad fértil. También debe evitarse su uso en caso de enfermedad del hígado o de los riñones, infecciones activas (tuberculosis, pielonefritis), hipoplasia de la médula ósea, úlcera péptica, colitis ulcerosa, diabetes mellitus, obesidad y en pacientes inmunosuprimidos y consumidores frecuentes de alcohol (Tung y col. 1990). Además, es importante que los pacientes

que utilicen este fármaco, tengan un aclaramiento renal adecuado (Rees y col. 1967; Van de Kerkhof 1998)

Psoriasis

La psoriasis es una patología cutánea caracterizada por una hiperproliferación de las células epidermales y por lesiones eritematosas en determinadas zonas del cuerpo (especialmente en la espalda, las rodillas y el cuero cabelludo). Afecta a gente de todas las edades, de ambos sexos y de diferentes grupos étnicos. Adem.as, se ha observado predisposición genética frente a ella. Es una enfermedad que no tienen cura farmacológica y que sólo es posible su remisión por ciertos períodos de tiempo (Ghadially y col. 1990; Wang y col. 1997).

Cuando la piel está afectada por esta patología, se obsevan cambios en su función de permeabilidad, siendo la pérdida de agua en una piel con psoriasis 20 veces mayor que una piel normal (Ghadially y col. 1996).

El curso usual de esta enfermedad es una serie de exacerbaciones y remisiones, con lesiones variables de tamaño y forma de paciente a paciente y en un mismo paciente en diferentes períodos de tiempo. Esta patología puede causar trastornos sicológicos cuando las lesiones son extensas (ya que en ciertos casos las placas de psoriasis pueden cubrir totalmente la superficie cutánea) y trastornos emocionales por la desfiguración física que en ciertos casos se produce (tan y col. 1998; Tung y col. 1990).

Algunas de las causas de la alteración en la proliferación de la epidermis que se observa en la psoriasis pueden ser las siguientes:

- Reducción en el tiempo del ciclo celular (el ciclo celular dura entre 457 y 152 hrs. Y para el caso de la epidermis con psoriasis, se han observado ciclos de 91 y 36 hrs.).
- Un incremento en la proliferación celular.
- Un incremento en el número de células de la epidermis en la etapa de mitosis a cada instante (Tung y col. 1990).

La presencia de linfocitos T en las placas de la dermis psoriática sugiere que también existe un componente inmunológico en el desarrollo de esta enfermedad (Ghadially y col. 1996; Tung y col. 1990).

Tratamiento de la Psoriasis

De primera elección para el tratamiento de la psoriasis es el tratamiento tópico. En primer término, el calcipotriol es efectivo y seguro. En caso de que la enfermedad continúe, se debe seguir el tratamiento con ditranol o alquitrán, siendo este último recomendado especialmente en pacientes que tienen psoriasis con picazón. La siguiente posibilidad es fototerapia UVB y alternativamente, fotoquimioterapia.

Cuando el paciente es reactivo a estas terapias y cuando se observan placas crónicas de psoriasis, psoriasis eritrodérmica o psoriasis pustular; se indica un tratamiento sistémico con metotrexato, ciclosporina o acitretina (Tan y col. 1998; Van de Kerkhof 1998). En el caso de la terapia sistémica, se prefiere el empleo de MTX frente a los otros agentes inmunosupresores por ser menos tóxico (Bookbinder y col. 1984).

Metotrexato y su uso en psoriasis

El metotrexato es muy efectivo en muchas formas de psoriasis. Como este compuesto actúa en las primeras etapas de la síntesis del DNA (fase S), su acción afecta principalmente a las células que tienen un cambio brusco en su ciclo celular, como es el caso de las células que se encuentran en la epidermis psoriática (Bookbinder y col. 1984). Es por esto, que al emplearse el MTX para el tratamiento de la psoriasis, se observa una disminución en la actividad mitótica de dichas células (Chládek y col. 1998; Vaidyanathan y col. 1985).

Se emplea por vía oral o vía intravenosa de manera intermitente para reducir su potencial tóxico y se utiliza en una dosis máxima semanal de 15 mg (repartidos en 3 dosis espaciadas por 12 horas) (Hwang y col. 1995; Tan y col. 1998; Van der Kerkhof 1998; Van Dooren-Greebe y col. 1994). Se ha observado que esiste una relación entre la farmacocinética (área bajo la curva) y farmacodinamia (área de la psoriasis y severidad de ésta) del MTX. Es por esto último que se sugiere una terapia que considere los niveles plasmáticos de este fármaco ya que estos están relacionados directamente con su efecto farmacológico (Chládek y col. 1998).

Para disminuir los efectos adversos que el MTX provoca, se ha intentado su administración por vía tópica y con este objetivo han sido estudiados diferentes vehículos: pomadas, cremas y geles (Lu y col. 1997; Lu y col. 1998; Weintein y col. 1989). Las vías de administración subcutáneas e intramusculares presentan menor toxicidad comparadas con laadministración intravenosa (Chatterjee y col. 1997; Rees y col. 1967).

Metotrexato por vía tópica

Por las características químicas del MTX (solubilidad, peso molecular), este fármaco penetra escasamente a través de la piel. Se ha observado que cuando se administra el MTX en forma tópica y por cortos períodos de tiempo, no se alcanzan niveles sanguíneos adecuados. Se ha observado un importante aclaramiento de este principio activo en su paso desde la epidermis a la dermis (Hwang y col. 1995). Además, se han encontrado grandes valores en el tiempo de respuesta o lag time de este fármaco en estas condiciones, Sin embargo, la efectividad de este principio activo parece aumentar cuando se administra por períodos de tiempo prolongados (Vaidyanathan y col. 1985).

El estrato córneo es probablemente la principal barrera que se opone al paso de MTX a través de la piel humanan y el mecanismo predominante de su penetración parece ser la difusión pasiva. Debiso a esto último se espera que cambios de pH en el vehículo influyan en la penetración de este fármaco ya que la difusión pasiva es máxima cuando la molécula está en su forma no ionizada (Li y col. 1998; Vaidyanathan y col. 1985). El MTX se encuentra mayoritariamente no ionizado en el rango pH 4 – 5, por lo que en este rango de pH, el paso de MTX por medio de difusión pasiva debería ser máximo (Vaidyanathan y col. 1985). En un estudio a pH 1 – 3, se observó que la proporción y la extensión de la penentración de MTX fue baja, probablemente debido a la pequeña cantidad de fármaco no disociado en este rango de pH; sin embargo, la cantidad de fármaco retenido en el estrato córneo fue bastante alta. Esto sugiere la unión del MTX a algún compuesto del estrato córneo (Vaidyanathan y col. 1985).

Para aumentar la penetración de este fármaco a través de la piel, se han estudiado formas farmacéuticas no convencionales para su administración. Es así como se han investigado diferentes vehículos para su incorporación en formas farmacéuticas de uso tópico (pomadas, cremas, hidrogeles, geles). Conteniendo sustancias promotoras de la absorción (dimetilsulfóxido, propilenglicol o alcohol isopropílico) en su formulación (Weinstein y col. 1989). También se ha intentado el uso de ciertas técnicas, como por ejemplo la iontoforesis. Se ha observado que esta técnica y el uso de promotores de la absorción provocan un incremento de la descamación de la superficie de la epidermis y un aumento del espacio intercelular y por lo tanto un mayor paso transdérmico de este fármaco (Singh y col. 1995).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Parte II: Absorción Transdérmica

La piel

La piel es uno de los órganos más extensos y accesible del cuerpo humano. En una persona adulta tiene una superficie aproximada de 1,2 - 1,3 m^2, alcanza el 16% del peso corporal y recibe un tercio de la circulación sanguínea del cuerpo. Este órgano es elástico, duro, y se regenera en condiciones fisiológicas normales (Chien 1991; Junqueira y col. 1996).

Antiguamente se pensaba que la piel constituía una barrera impermeable a todas las sustancias excepto los gases. Hoy día se sabe que la piel es permeable a sustancias lipofílicas y a sustancias no cargadas, y que constituye una barrera, tanto física como química, que protege al cuerpo frente a la invasión de microorganismos (Chien 1982).

La piel tiene múltiples funciones. Cumple una importante función en la regulación de la temperatura corporal ya que por medio de sus terminaciones nerviosas y por medio de sus vasos sanguíneos, glándulas y tejido adiposo, está en constante comunicación con el ambiente externo (Chien 1982; Junqueira y col. 1996). Protege al organismo frente a la pérdida de agua por

evaporación, así como también lo protege contra las fricciones. Es la responsable, en conjunto con la luz solar, de sintetizar la vitamina D3, vitamina que es fundamental para la absorción de calcio por parte del hueso (Junqueira y col. 1996). Además, debido a la melanina que contiene, cumple funciones de protección del organismo frente a la radiación de los rayos U.V. (Chien 1982; Guy 1996; Junqueira y col. 1996).

Analizando la histología de la piel, podemos señalar que está compuesta por de tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis o tejido subcutáneo (fig.2).

BIBLIOTECA VIRTUAL

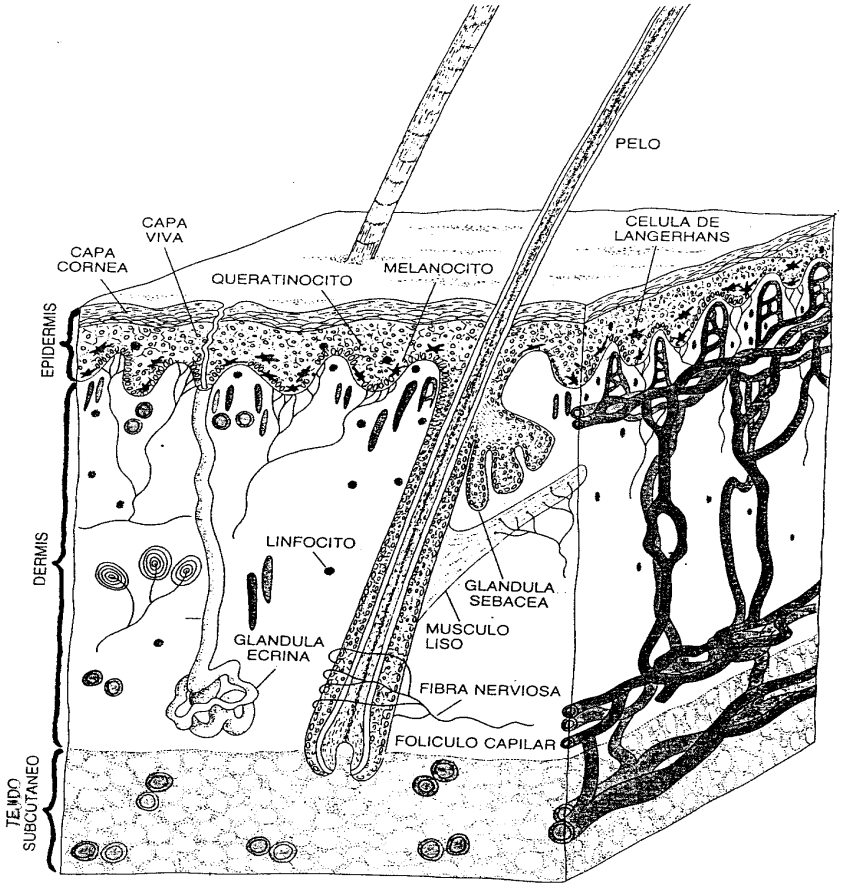


Figura 2: Diagrama de la piel (Chien 1982).

Epidermis

La epidermis es la capa más externa de la piel y está compuesta por células epiteliales estratificadas escamosas las cuales son las responsables de la integridad de esta capa. El espesor y la estructura de la epidermis es diferente para cada zona del cuerpo, siendo más gruesa y compleja en la palma de la mano y en la planta del pie. Posee terminaciones nerviosas, pero no capilares (Chien 1982; Guy y col. 1987b; Junqueira y col. 1996).

Las células de la capa basal de la epidermis se dividen y dan lugar a varias células que emigran a través de ella hacia el exterior. Las células a medida que migran, van queratinizándose, aplanándose y pierden su núcleo; se forma así la capa córnea que es una capa que se va descamando continuamente en el tiempo (Vilaplana y col. 1995).

La epidermis contiene una gran cantidad de sistemas enzimáticos cuya función está relacionada con la reproducción de las células epiteliales (Guy y col. 1987b).

Si analizamos la epidermis, desde la dermis hacia la superficie, podemos ver que ésta presenta las siguientes capas:

Estrato Basal: Presenta una intensa actividad mitótica y es responsable de la constante renovación de la epidermis. Se calcula que la epidermis humana se renueva cada 20-30 días (Junqueira y col. 1996).

Estrato espinoso: Contiene tonofibrillas y desmosonas que tienen una importante función en el mantenimiento de la cohesión de las células de la epidermis y, en consecuencia, en su resistencia al rozamiento. De hecho, se observa que cuanto mayor es la acción de las presiones y fricciones sobre la epidermis, de mayor espesor es su estrato espinoso (Junqueira y col. 1996).

Estrato granuloso: Está constituido por células aplanadas que a este nivel se convierten en células muertas (Welsh y col. 1976). Este estrato no está presente en todas las regiones del organismo.

Estrato lúcido: Se encuentra presente en la palma de la mano y en la planta del pie. Es de aspecto homogéneo con gotitas de una sustancia refringente llamada eleidina (Welsh y col. 1976).

Estrato córneo: Este estrato constituye la primera barrera a la absorción percutánea (Chien 1982). Sirve de barrera física a la luz, el calor, a los microorganismos, a la mayoría de los agentes químicos (Chien 1982; Elias 1990; Elias 1991; Friberg y col. 1990; González 1992; Guy 1996); y además controla la pérdida de agua desde el organismo (Friberg y col. 1990).

Es un estrato muy hidratado (su contenido de agua es de un 20%) que posee una función esencial en el transporte de agua y de agentes químicos y biológicos hacia y desde el organismo, Es predominantemente lipofílico por lo que es particularmente impermeable a drogas hidrofílicas (incluyendo especies cargadas) (Guy 1996). Está compuesto por pequeñas cantidades de glucolípidos, ésteres de esterol, triglicéridos, sulfato de colesterol e hidrocarburos. Está desprovisto de fosfolípidos y está enriquecido selectivamente de ceramidas, esteroles libres, y ácidos grasos libres (Elias 1990; Elias 1991). Las células que lo forman se presentan queratinizadas, carecen de núcleos u orgalenos celulares y son metabólicamente inactivas (Elias 1990; Welsh y col. 1976).

Esta capa no es homogénea en todo el organismo, existen diferencias significativas en su estructura y en su composición química en las diferentes zonas del cuerpo (Chien 1982).

Dermis

La dermis tiene un espesor de aproximadamente 2 mm y está constituida por una red de fibras elásticas y de colágeno. La estructura de esta capa es la responsable de las propiedades de elasticidad de la piel. Contiene gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos, que cumplen funciones en la regulación de la presión sanguínea y en el mantenimiento de la temperatura corporal. Por estar esta capa altamente vascularizada, el transporte de solutos a través de esta capa es relativamente rápido (Abraham y col. 1995). Además, en la dermis se encuentran estructuras derivadas de la epidermis como son los pelos, las glándulas sebáceas y sudoríparas, y las uñas (Abraham y col. 1995; Chien 1982; Junqueira y col. 1996).

Su superficie externa es extremadamente irregular, observándose salientes que acompañan a los entrantes correspondientes de la epidermis. A estos salientes se les conoce con el nombre de papilas dérmicas. Algunos autores admiten que la función de las papilas es aumentar la zona de contacto entre la dermis y la epidermis, confiriendo así una mayor resistencia a la piel ya que se observa que las papilas son más frecuentes en las zonas sometidas a presiones o rozamientos (Junqueira y col. 1996).

Tanto la dermis como la epidermis viable son zonas de alta actividad metabólica. Existe un gran número de enzimas en estas capas por lo que se producen muchas reacciones de biotransformación a este nivel. Además, en la dermis se encuentran proteínas sintetizadas por las glándulas sebáceas y los folículos pilosos (Guy y col. 1987b).

Hipodermis o tejido subcutáneo

Esta capa une de manera laxa la dermis con los órganos subyacentes. Es la capa responsable del deslizamiento de la piel sobre las estructuras en las que descansa. Por ser una barrera grasa es un buen aislante térmico proporcionando protección al organismo contra el frío (Chien 1982; González 1992).

Vasos y nervios de la piel

La piel es un órgano que recibe sensaciones del entorno y en consecuencia, está muy enervada. En la piel se distinguen dos plexos arteriales, uno situado entre el límite de la dermis y la epidermis y el otro entre las capas papilar y reticular; y tres plexos venosos, dos en la posición descrita para las arterias y uno más en la región media de la dermis. Además, en la piel se encuentran con frecuencia anastomosis arteriovenosas que tienen una importante función en los mecanismos de termoregulación del organismo (Elias 1990; Junqueira y col. 1996).

La piel contiene también nervios aferentes para las glándulas y músculos erectores y una abundante red de terminaciones nerviosas que rodean a los folículos pilosos y que tienen una importante función táctil (Junqueira y col. 1996).

Administración transdérmica de fármacos

Antiguamente se pensaba, que la vía de administración transdérmica no era factible como ruta de administración de fármacos. Sin embargo, hoy día se sabe que es una buena alternativa frente a las rutas de administración convencionales y que constituye un importante avance terapéutico frente a ellas (Chien 1982; Guy 1996).

Una de las principales ventajas que ofrece la administración transdérmica respecto de la vía oral, es que permite obtener niveles constantes del fármaco en la sangre, evitando así las reacciones adversas asociadas a las fluctuaciones en las concentraciones sanguíneas. En ciertas ocasiones, la terapia transdérmica puede reemplazar a una perfusión continua, evitándose así las incomodidades inherentes a esta vía de administración como son las hospitalizaciones y el dolor en el sitio de aplicación (Kneep y col. 1987).

Empleando esta vía de administración se evita el paso del fármaco a través del tracto gastrointestinal, por lo que fármacos que provocan irritación gástrica o que sufren un importante efecto de primer paso hepático, son buenos candidatos para incorporarse en formulaciones de uso tópico.

La vía transdérmica proporciona un régimen terapéutico simple y sin mayores incomodidades para los pacientes ya que puede emplearse a intervalos espaciados de dosificación (de 24 horas hasta incluso semanas). Además, la terapia puede ser rápidamente suprimida con la simple remoción del vehículo que contiene al fármaco (Chien 1991; Guy y col. 1987a; Kneep y col. 1987).

El principal inconveniente de la administración tópica de principios activos es la barrera que opone la piel al paso de cualquier sustancia externa, debido a esto, la vía transdérmica no puede emplearse si se requiere un efecto terapéutico inmediato ni si se requieren altas concentraciones de fármaco en la circulación sistémica (Chien 1991). Además, son sistemas algo costosos ya que sólo un pequeño porcentaje del fármaco incluido en la forma farmacéutica es absorbido por el organismo y además, porque algunos de los sistemas que se emplean por esta vía, requieren de una forma de dosificación específica asociada a un cierto grado de tecnología para su elaboración (Chien 1991; Kneep y col. 1987).

Otro inconveniente que presentan esta vía, es la susceptibilidad que tienen algunos pacientes al uso de parches transdérmicos, observándose alergias en el sitio de aplicación. Para evitar o minimizar este problema, en ciertos casos se recomienda ir cambiando el sitio de aplicación de estos sistemas.

En la práctica, los sistemas de liberación transdérmica poseen dos potenciales dificultades. En primer lugar la cantidad de fármaco que llegará a la circulación sistémica dependerá del grado de permeabilidad de la piel en el sitio de aplicación del sistema, por lo que es importante que el fabricante especifique en qué zonas del cuerpo puede ser utilizado. Y en segundo lugar, si estos sistemas se rompen al ser aplicados, se liberarán grandes cantidades de fármaco pudiendo provocarse algún daño si el fármaco incluido es muy potente o si produce algún tipo de irritación (Guy y col. 1987a).

Fundamentos de la absorción transdérmica

Para que ocurra la absorción o permeación percutánea de un fármaco, éste debe absorberse primeramente en el estrato córneo, luego debe difundir a través de la epidermis viable para poder acceder finalmente a la circulación sistémica. Por ser los capilares sanguíneos relativamente permeables y la circulación sistémica suficientemente rápida; para la mayoría de las sustancias la etapa limitante del proceso es la difusión a través de la epidermis (Chien 1982).

Como nos indica la primera ley de Fick, la difusión de una sustancia en una determinada área es proporcional al gradiente de concentración que existe entre los dos compartimentos en cuestión. Cuando se administra un fármaco a través de la piel utilizando sistemas de liberación transdérmicos, existe una gran diferencia entre la concentración de éste en el preparado farmacéutico y en el organismo; y como el sistema busca llegar al equilibrio, se produce un flujo de fármaco hacia el interior del cuerpo. Este flujo también está influenciado por otros parámetros

dependientes del fármaco, como por ejemplo, el peso molecular (a mayor peso molecular menor difusión) y el coeficiente de partición (que nos permite conocer la afinidad de una sustancia por el tejido epidérmico) (Kneep y col. 1987; Ridout y col. 1992).

En un comienzo, la penetración de moléculas a través de la piel se realiza por medio de los folículos pilosos y de los conductos sebáceos, para ser absorbidos por el epitelio folicular y las glándulas sebáceas respectivamente. Sin embargo, por representar estos conductos una muy pequeña fracción del área total de la piel (10^{-2} - 10^{-3}), no es un mecanismo que tenga gran contribución al transporte total de una sustancia; salvo en el caso de la liberación de iones, compuestos polares polifuncionales y moléculas extremadamente grandes; y en el caso de la iontoforesis, donde estos conductos son los responsables de alrededor del 50% del total de fármaco liberado (Abraham y col. 1995; Roberts 1997). Estas vías de difusión son relativamente sencillas comparadas con la penetración de sustancias a través del estrato córneo y una vez que el proceso de difusión de una sustancia a través de los folículos pilosos y conductos sebáceos ha llegado al equilibrio, la penetración a través del estrato córneo es el proceso dominante (Chien 1982).

Las sustancias a través del estrato córneo pueden penetrar mediante dos rutas, la intracelular y la transcelular. En la ruta transcelular, los solutos pasan directamente a través de las células corneales teniendo que atravesar la matriz intercelular lipídica que ellas contienen. En cambio, en la ruta intracelular, el soluto difunde alrededor de las células corneales, abriéndose camino por medio de ellas (Abraham y col. 1995). No se han encontrado transportadores activos a este nivel.

Por ser este estrato una barrera predominantemente lipofílica, es particularmente impermeable a fármacos hidrofílicos y permite la liberación de un pequeño número de compuestos: compuestos con pesos moleculares relativamente bajos (<500 daltons) y con balances de solubilidad aceite/agua adecuados (octanol/ agua entre 10 y 1000) (Guy 1996).

La estructura intercelular de la queratina que contiene el estrato córneo y el grado de hidratación que posee, tienen una importante función en el proceso de absorción percutáneo. Una baja absorción percutánea puede explicarse cuando existen altos contenidos de queratina y bajas proporciones de agua. Un estrato córneo totalmente hidratado es capaz de absorber entre 5 y 6 veces de su peso en agua (Chien 1982; Elias 1990; Walters 1989).

Si un fármaco quiere ser administrado incluido en una formulación de uso tópico convencional, debe ser muy potente, ya que el flujo de fármaco hacia la circulación sistémica suele ser bajo y es necesario que éste ejerza un efecto terapéutico a bajas dosis. Son buenos candidatos para esta vía de administración, fármacos que tienen una ventana terapéutica estrecha, que son extensamente metabolizados por mecanismos de primer paso hepático, que son degradados en el tracto gastrointestinal y/o que poseen una vida media corta (Cooper y col. 1990; Guy 1996; Kneep y col. 1987).

Por otro lado, es importante considerar las razones prácticas, cosméticas y económicas; a la hora de formular un principio activo por vía tópica. Se ha estudiado, que el dispositivo transdémico que contiene el fármaco, no debe sobrepasar los 50 cm^2 (Guy 1996). Además, se debe considerar que por ser la piel la principal barrera entre el organismo y el medio externo, no existe capacidad tecnológica para liberar más de 50 mg de fármaco por día en forma tópica (Cooper y col. 1990; Guy 1996).

Factores que afectan la permeabilidad transdérmica

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Para poder predecir la permeación de una sustancia a través de la piel, se deben considerar varios factores.

Uno de los autores que ha contribuido en la clasificación de estos factores ha sido Chien (Chien 1982), el cuál clasificó a los factores de la siguiente manera:

1. Factores dependientes de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias
2. Factores dependientes de las propiedades fisicoquímicas de los sistemas de liberación
3. Factores dependientes de las condiciones fisiológicas y patológicas de la piel

1. Factores dependientes de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias

1a. Coeficiente de partición: El coeficiente de partición aceite/agua determina la permeabilidad específica del fármaco ya que existe una dependencia lineal entre este coeficiente y la permeabilidad transdérmica. Se espera un aumento del coeficiente de permeabilidad del fármaco con un aumento de la lipofilia de éste. Un coeficiente de partición lípido/agua 1 o mayor que 1 generalmente se considera óptimo. Sin embargo, un determinado valor de coeficiente de partición puede ser modificado por medio de cambios en un grupo funcional de la molécula, sin que esto afecte la actividad terapéutica del fármaco; o por medio de modificaciones en el vehículo en que éste se administre.

1b. Condiciones de pH: El pH de la superficie de la piel y del sistema de liberación del fármaco afectan la extensión de la disociación de éste y por lo tanto, su grado de permeabilidad transdérmica.

1c. Concentración de la sustancia: Como el proceso de permeabilidad a través de la piel es un proceso principalmente de difusión pasiva, depende de la concentración de la sustancia en la superficie de la piel.

2. Factores dependientes de las propiedades fisicoquímicas de los sistemas de liberación

2a. Características del sistema de liberación: El flujo de fármaco a través de la piel estará condicionado a la forma en que éste se encuentre (disuelto o suspendido). También es importante tener en cuenta el coeficiente de partición interfacial del fármaco entre el sistema de liberación y la piel, el pH del vehículo y la capacidad de reservorio de la forma farmacéutica (Cooper y col. 1990).

2b. Composición del sistema de liberación: Este parámetro no sólo afecta el tiempo de liberación del fármaco sino que también afecta la permeabilidad del estrato córneo, modificando por ejemplo, su grado de hidratación. La penetración de ciertos fármacos a través de la piel puede facilitarse por medio de la incorporación de ciertas sustancias, como por ejemplo mediante el empleo de promotores de la absorción.

3. Factores dependientes de las condiciones fisiológicas y patológicas de la piel

3a. Efecto de reservorio de la capa córnea: Las características de penetración de algunas sustancias pueden verse alteradas por la existencia de un reservorio o depósito de fármaco en las capas profundas del estrato córneo.

3b. Composición lipídica de la superficie de la piel: La capa lipídica que existe en la superficie de la piel, que está formada por los productos de excreción de las glándulas sebáceas, contiene agentes emulsificantes que impiden la entrada de sustancias exógenas a través del estrato córneo.

3c. Hidratación de la piel: La permeabilidad de una sustancia, aumenta con el grado de hidratación de la piel.

La concentración acuosa crítica se considera del 10%, encontrándose aumentada en las pieles jóvenes a un 13% y disminuida en las pieles envejecidas, a un 7%. La disminución de la humectación de la piel puede deberse a factores extrínsecos, como son los factores ambientales y climáticos (rayos UV, temperatura, humedad, viento) y al uso de jabones y detergentes sintéticos; o bien, a factores intrínsecos como son las alteraciones del metabolismo (estados carenciales, anemias, uso de medicamentos diuréticos, etc.) (Vilaplana y col. 1995).

Se ha encontrado que una mezcla de aminoácidos y sales presentes en el estrato córneo, denominados NMF, tienen por función mantener la hidratación cutánea ya que corresponden a compuestos químicos con características higroscópicas y solubles en agua. El NMF absorbe agua de la atmósfera, incluso cuando la humedad relativa es inferior al 50%, siendo de esta forma un gran agente humectante. Debido a la presencia de este compuesto natural en la piel, se explica que la piel tenga siempre un grado de humectación aún cuando ésta esté expuesta a una humedad relativa baja (Vilaplana y col 1995).

3d. Temperatura de la piel: Un aumento en la temperatura produce un incremento en la permeabilidad de la piel ya que disminuye la energía requerida para la difusión y aumenta la solubilidad del fármaco. Un aumento de este parámetro también provoca un incremento en la vasodilatación lo que también contribuye a un aumento en la absorción percutánea.

3e. Variación regional en la composición de la piel: La permeabilidad al agua, y por lo tanto a otras sustancias, no es constante en todo el organismo, siendo específica para cada zona cutánea.

3f. Traumatismos, patologías o heridas de la piel: Las heridas producen una discontinuidad en el estrato córneo lo que lleva a un incremento de la permeabilidad de las zonas afectadas. Las heridas químicas, producidas por ácidos fuertes, bases fuertes o gases, provocan el mismo efecto (Chien 1982).

3g. Metabolismo cutáneo de fármacos: En la epidermis viable se encuentran importantes enzimas con actividades hidrolíticas, oxidativas, reductivas y metabólicas que pueden inactivar ciertos fármacos o bien, activarlos en el caso que se administren como profármacos. Estas enzimas están distribuidas en cerca de 2 m^2 de superficie corporal, por lo que su efecto puede considerarse limitado en el metabolismo de fármacos a este nivel ya que normalmente estos compuestos se aplican en una superficie infinitamente pequeña comparada con la superficie corporal total. Los mecanismos de las reacciones cutáneas observadas no están claramente identificados aún (Bucks 1984; Guy y col. 1987a; Roberts 1997).

Sistemas de liberación transdérmicos

Hoy día existe en el mercado un importante número de dispositivos transdérmicos comercializados en forma de parches. Estos sistemas pueden ser clasificados en cuatro grandes categorías:

a) Sistemas de membrana

Estos sistemas (fig. 3) cuentan con un reservorio cerrado donde está contenido el fármaco. El reservorio está cubierto en una de sus caras por una lámina impermeable y en la otra, por una membrana polimérica. Esta última corresponde a la cara del reservorio a través de la cuál será liberado el fármaco (Chien 1991; Delgado-Charro y col. 1998; Kneep y col. 1987).

El fármaco puede encontrarse dentro del reservorio formando una dispersión sólida homogénea con una matriz polimérica (poliisobutileno), suspendido en un líquido viscoso (silicona fluida), o disuelto en un solvente adecuado (etanol) (Chien 1991).

La membrana polimérica que controla la liberación del fármaco puede ser una membrana microporosa o no porosa. En la superficie externa de esta membrana existe una pequeña capa de fármaco en contacto con un polímero adhesivo, como por ejemplo silicona adhesiva, que mantiene en íntimo contacto al sistema de liberación transdérmico con la superficie de la piel (Chien 1991).

La cantidad de fármaco liberado y la velocidad de liberación de éste puede controlarse variando la composición y el espesor de la membrana polimérica empleada (Chien 1991; Kneep y col. 1987).

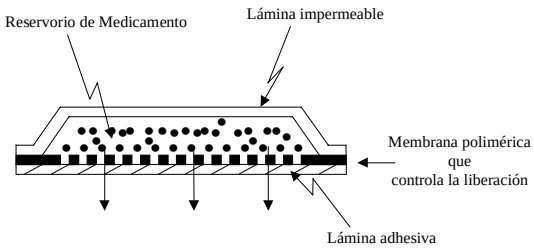


Figura 3: Representación de un sistema de liberación transdérmico tipo membrana (Chien 1991; Kneep y col.1987).

b) Sistemas de matriz

En estos sistemas (fig.4), el reservorio del fármaco está constituido por una dispersión sólida de éste en una matriz polimérica hidrofílica o lipofílica, la cual es moldeada en forma de disco a una superficie con un espesor determinado (Chien 1991; Kneep y col. 1987).

A diferencia de los sistemas de membrana, en los cuales el polímero bioadhesivo es aplicado homogéneamente en la superficie del sistema de liberación del fármaco, en estos sistemas el polímero bioadhesivo cubre sólo la circunferencia del disco que contiene el fármaco, quedando de este modo el reservorio del principio activo en contacto directo con la piel (Chien 1991).

La liberación del fármaco contenido en sistemas de matriz, ocurre por un proceso de difusión pasiva a través de la matriz polimérica (Kneep y col. 1987).

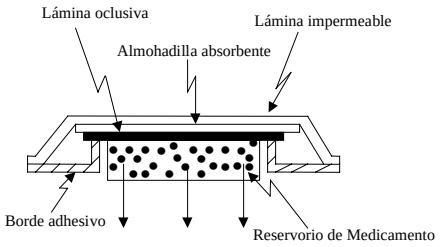


Figura 4: Representación de un sistema de liberación transdérmico tipo matriz (Chien 1991; Kneep y col.1987).

.

c) Sistemas de encapsulación microscópica

En estos sistemas (fig.5), el reservorio está formado por una dispersión microscópica del fármaco en un solvente hidrofílico. La liberación del fármaco está determinada por la solubilidad acuosa de éste y por la lipofilicidad del polímero utilizado como matriz (Chien 1991; Kneep y col. 1987).

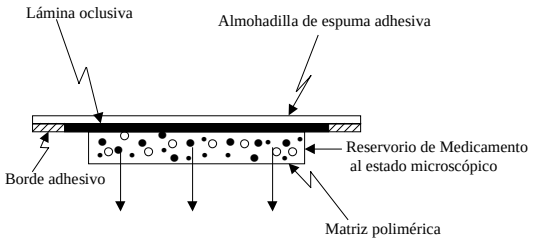


Figura 5: Representación de un sistema de liberación transdérmico de encapsulación microscópica (Chien 1991; Kneep y col.1987).

d) Sistemas reservorios de gradiente

En estos sistemas (fig.6), la composición de la dispersión polimérica del principio activo es variable, existiendo una gradiente de concentración de fármaco a través del sistema. El fármaco se

encuentra en mayor concentración en la capa polimérica más alejada de la piel, por lo que se produce una migración de éste hacia capas inferiores. En dependencia del número de capas poliméricas del sistema y de la concentración del fármaco en la capa polimérica más alejada de la piel, podemos modular la cinética de liberación del principio activo contenido en este sistema (Chien 1991).

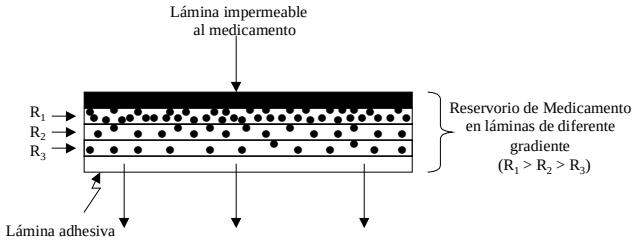


Figura 6: Representación de un sistema de liberación transdérmico con un reservorio de gradiente (Chien 1991).

Algunos de los fármacos que se expenden en estos sistemas son: nitroglicerina, escopolamina, estradiol/progesterona, clonidina, testosterona, fentanil y nicotina; y como se deduce de lo explicado anteriormente, en todos ellos la absorción del principio activo se realiza mediante procesos de difusión pasiva (Delgado-Charro y col. 1998).

Actualmente, las investigaciones de los sistemas de liberación transdérmicos están dirigidas a desarrollar nuevas tecnologías que permitan aumentar la absorción de los fármacos a este nivel (Cooper y col. 1990; Guy 1996).

Nuevas estrategias de administración trandérmica

Promotores de la absorción

Grandes esfuerzos se han dirigido al desarrollo de sustancias químicas específicas, o combinación de ellas, que puedan ser utilizadas como promotores de la absorción percutánea, es decir, sustancias que aumentan la permeabilidad de la piel por diferentes mecanismos. Estos promotores, al igual que otros excipientes utilizados en formulaciones transdérmicas, deben ser fisiológicamente inactivos, no deben ser irritantes y no deben ser tóxicos (Akimoto y col. 1997; Chien 1982; Cooper y col. 1990).

Estos agentes no sólo se emplean para aumentar la absorción percutánea de ciertos fármacos, sino que también se emplean para reducir la variabilidad interindividual en el grado de penetración de ciertas sustancias. Se han observado coeficientes de variación en la penetración de ciertas sustancias de hasta un 50% entre diferentes individuos (Guy 1996).

Como algunos de los mecanismos por los cuales estos agentes ejercen su función podemos señalar (Gao y col. 1998; Walters 1989):

1. Destrucción del estrato córneo por medio de la extracción de alguno de sus componentes. Como es de suponer, las sustancias que actúan por medio de este mecanismo no son utilizadas en la práctica.
2. Extracción de los lípidos del estrato córneo.
3. Hidratación del estrato córneo
4. Alteración en la ordenación de los lípidos del estrato córneo.
5. Aumento de la fluidez de la matriz de lípidos.
6. Interacción con proteínas intercelulares.

Se utilizan con estos fines solventes orgánicos, ya que sus propiedades de miscibilidad pueden aumentar la permeación de fármacos solubles en agua; y agentes surfactantes, ya que disminuyen la tensión superficial promoviendo la humectación de la piel. Como grupos químicos se utilizan sulfóxidos, alcoholes, polioles, alquenos, ácidos grasos, ésteres, aminas y amidas, terpenos y ciclodextrinas (Delgado-Charro y col. 1998). Algunos compuestos específicos empleados son: dimetilsulfóxido (DMSO), úrea, laurilsulfato, dioctil sulfosuccinato sódico y Azone® (1-dodecilazocicloheptano-2-uno) (Chien 1982; Cooper y col. 1990; Guy 1996; Kneep y col. 1987; Walters 1989).

Un problema importante que estos agentes poseen y que no se ha podido controlar, son los efectos irritantes que provocan. Generalmente se utiliza una combinación de compuestos anfotéricos con solventes apolares, pero producen invariablemente irritación local. Además, por ser compuestos poco específicos, producen un aumento de la absorción no sólo del fármaco, sino que también de otros componentes de la formulación; los que a su vez también pueden provocar reacciones de toxicidad (Guy 1996; Kneep y col. 1987).

Otra limitación en el uso de estos compuestos es que la mayor parte de la información disponible es a partir de datos *"in vitro"* usando modelos de piel animal, los cuales son más sensibles a las perturbaciones que la barrera cutánea humana (Cooper y col. 1990; Guy 1996).

Iontoforesis

Se conoce como iontoforesis a la técnica que permite el paso de iones a través de una membrana mediante la aplicación de corriente eléctrica. Las intensidades de corriente utilizadas y los voltajes aplicados están en el rango de 0,5 mA/cm^2 y 1-6 voltios respectivamente. La corriente

se aplica normalmente durante intervalos de tiempos prolongados. Existen importantes evidencias que demuestran que la corriente eléctrica produce un aumento en la cantidad de fármaco absorbido. Sin embargo, por medio de la iontoforesis, sólo una fracción de los cambios introducidos al sistema es utilizada para la liberación transdermal de fármacos. La mayor parte de la electricidad generada es empleada para transportar otros iones a través del circuito (especies pequeñas y particularmente móviles, como son el Na^+ y el Cl^-) (Guy 1996).

Las moléculas altamente polares, de gran peso molecular y cargadas, son buenas candidatas para ser aplicadas sobre la piel mediante mecanismos eléctricos controlados. La iontoforesis aplicada a fármacos con estas características, ofrece importantes ventajas frente a la liberación convencional de fármacos a este nivel debido a que estos compuestos no son capaces de atravesar la barrera cutánea por mecanismos de difusión pasiva (Guy 1996).

BIBLIOTECA VIRTUAL

Los sistemas iontoforéticos se utilizaron en un principio para la aplicación local de antiinflamatorios no esteroideos, anestésicos y para el tratamiento de la hiperhidrosis, una patología dermatológica. Sin embargo, actualmente se están desarrollando sistemas iontoforéticos que permiten la liberación sistémica de ciertos fármacos (Chien 1991; Ledger 1992).

Cuando se diseña un sistema de liberación transdérmica mediante iontoforesis es importante tener en cuenta la estabilidad del fármaco en el sistema, la extensión del metabolismo de éste en la piel y el posible efecto de irritación local que él puede provocar (Guy 1996).

Electroporación y Sonoforesis

La electroporación consiste en aplicar pulsos eléctricos de alto voltaje (25-2000 voltios) los cuales causan un rápido y transitorio aumento de la permeabilidad del estrato córneo al paso de sustancias de elevado peso molecular, como por ejemplo son los péptidos y oligonucleótidos, y las sustancias hidrosolubles o ligeramente liposolubles (Edwards y col. 1995; Guy 1996; Vanbever y col. 1997).

El grado de aumento en la permeabilidad "*in vitro"* tiene relación con el voltaje aplicado, y con el número y la duración de los pulsos, por lo que combinando estos parámetros adecuadamente se puede controlar el proceso. De los pocos estudios *"in vivo"* que se han realizado, no se ha descrito toxicidad asociada a la técnica de la electroporación (Guy 1996).

También se está desarrollando una interesante técnica denominada sonoforesis. Esta técnica emplea el ultrasonido para producir un aumento en la liberación de un fármaco a través de la piel. Se han estudiado frecuencias de ultrasonido que van desde 2-10 Mhz a $1W/cm^2$, pero aún sin muy buenos resultados (Guy 1996).

Iontoforesis reversa

La iontoforesis reversa no es utilizada para la liberación de fármacos a través de la piel, sino que es un mecanismo no invasivo que permite extraer información acerca de una sustancia presente en el organismo. Se utiliza más bien con propósitos clínicos (Guy 1996).

A pH neutro, la piel está cargada negativamente, por lo que es permeable principalmente a los cationes. Cuando se aplica un campo eléctrico, existe mayor movilidad de iones positivos que negativos, por lo que momentáneamente el solvente se mueve en igual dirección que los cationes. Pero el solvente no se mueve sólo y transporta consigo ciertas sustancias, como por ejemplo glucosa (la cual tiende a difundir pasivamente a través de la piel en forma escasa). Es así, como empleando esta técnica, se puede determinar la concentración de glucosa en el organismo. Sin embargo, para que se utilice un sistema de iontoforesis reversa para determinar la glucemia, se debe desarrollar un sensor que detecte pequeñas concentraciones de glucosa en forma precisa y que el sistema de calibración permita medir los niveles de glucosa cuando este sistema es reemplazado por otro o trasladado a otra zona de la piel (Guy 1996; Rao y col. 1995; Roberts 1997; Santi y col. 1996). Sistemas de este tipo están siendo estudiados en la actualidad, pero aún no se encuentran disponibles comercialmente.

Nuevas formulaciones:

Se han desarrollado una serie de vehículos para la administración de fármacos a través de la piel, este es el caso de los liposomas (que son vesículas de fosfolípidos que pueden incorporar fármacos en su interior), de los niosomas (que corresponden a surfactantes no iónicos los cuales facilitan el transporte de fármaco a través de la piel) y de las microemulsiones (que son vehículos capaces de modificar el coeficiente de partición de los fármacos en el estrato córneo y de disminuir la función barrera este estrato debido a los surfactantes que contienen). Aunque la eficacia de estos vehículos está demostrada, aún no se han determinado sus mecanismos de acción particular (Delgado-Charro y col. 1997; Schreier y col. 1994).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Parte III: Iontoforesis

Muchos fármacos, debido principalmente a sus características químicas, penetran escasamente a través de la piel y por lo tanto, al ser administrados en forma tópica no se obtienen concentraciones sanguíneas o locales adecuadas. Es así, como la técnica denominada iontoforesis representa una interesante alternativa para la administración transdérmica de estos principios activos (Srinivasam y col. 1990a).

Se conoce como iontoforesis al proceso que incrementa la penetración de iones y sustancias neutras a través de la piel por medio de la aplicación de un campo eléctrico (Moll y col. 1993; Santi y col. 1993; Srinivasam y col. 1990a). Empleando esta técnica es posible la administración tópica controlada de fármacos hidrofílicos ionizados o no ionizados y de gran peso molecular (Burnette 1989; Huang y col. 1996a).

Como una de las características beneficiosas que esta técnica ofrece, podemos señalar que la iontoforesis es un procedimiento no invasivo, indoloro y seguro.

La aplicación de un campo eléctrico a través de la piel no es una técnica moderna. La primera investigación sistemática que se llevó a cabo para dilucidar las bases electroquímicas de la

iontoforesis y las características eléctricas de la piel, fueron publicadas en 1900 por Leduc. En la actualidad, esta técnica se sigue investigando, estudiándose fundamentalmente los aspectos eléctricos y electroquímicos del proceso para poder así administrar mayor número de principios activos (Ledger 1992).

Existen muchos factores que pueden influir en la liberación de fármacos mediante iontoforesis. Los factores fisicoquímicos comprenden las cargas que poseen los fármacos, la conductividad total del sistema, el pH de la solución donante, la fuerza iónica del buffer utilizado y la concentración del fármaco (Huang y col. 1996b; Singh y col. 1994; Srinivasam y col. 1990b). Los factores eléctricos comprenden el tipo de potencial aplicado (voltaje constante o corriente constante), el modo seleccionado (corriente continua o corriente pulsátil), el tipo de electrodos utilizados, la amplitud de la corriente y la frecuencia programada de los pulsos (Delgado-Charro y col. 1995; Huang y col. 1996b; Lelawongs y col. 1990). También la incorporación de otras sustancias en forma concomitante con el fármaco, como es el caso del uso de sustancias vasoactivas, modifican la cantidad de fármaco que accede a la piel (Singh y col. 1994). Es así, como combinando adecuadamente todos estos factores, es posible modular la cantidad de fármaco que será transportada a través de la piel.

Los factores fisiológicos también tienen influencia en la cantidad de fármaco liberado durante el proceso. Algunos de ellos son: región del cuerpo donde se coloca el sistema (ya que en cada zona del cuerpo existe una determinada densidad de apéndices cutáneos), edad, sexo y raza del paciente y grado de hidratación de la piel (Delgado-Charro y col. 1998; Yoshida y col. 1992).

Como la técnica de iontoforesis utiliza corriente eléctrica, es importante considerar la máxima cantidad de corriente que puede ser aplicada sobre la piel sin causar daños y que a la vez, sea bien tolerada por los pacientes. Para estudiar este fenómeno, se tienen que tomar en cuenta, entre muchos otros factores, el tiempo de aplicación de la corriente eléctrica y el área del electrodo utilizado. Se ha determinado que la mayor densidad de corriente soportada por los tejidos sin provocar hipertermia local, es de 0,5 mA/cm^2 (Ledger 1992; Panus y col. 1997; Singh y col. 1994). Sin embargo, la tolerancia de la piel frente a niveles de corriente durante tratamientos prolongados, no ha sido establecida aún. Tampoco se han estudiado con detenimiento los cambios fisiopatológicos de la epidermis (suministro de sangre en la piel, actividad enzimática en los tejidos, pH de la piel, etc.) después de una utilización prolongada de la iontoforesis (Singh y col. 1994).

Las moléculas que sean incorporadas en sistemas iontoforéticos deberán competir en su transporte con otros iones presentes en la piel (como son el Cl^- y el Na^+) (Kasting y col. 1990). La cantidad total de fármaco transportada dependerá de la movilidad relativa de las especies presentes en el sistema y del número de transporte de cada una de ellas.

Durante la iontoforesis se ve facilitado el transporte de especies positivas a través de la piel ya que a pH fisiológico (7,4), los aminoácidos residuales de las proteínas que se encuentran en el estrato córneo, están cargados en forma negativa, y para contrarestar estas cargas fijas que posee

la piel, existe mayor movilidad de cationes que de aniones. Por esta diferencia en el transporte de los diferentes iones, se dice que el estrato córneo es una membrana permeoselectiva a los iones positivos y el ión que es transportado mayoritariamente a través de la piel es el sodio. La fracción de corriente que es transportada por este ión (llamado número de transporte) es de aproximadamente 0,6; cerca del doble del valor del número de transporte del cloruro (principal anión presente en la piel) (Yoshida y col. 1992).

Medir la efectividad de esta técnica en relación con la cantidad de fármaco que se retiene en la piel o que accede a la circulación sistémica es complejo. Cuando un fármaco se absorbe por vía tópica y es capaz de llegar a la circulación sistémica, es muy difícil cuantificarlo en sangre ya que éste sufre una enorme dilución y la concentración teórica en que debiera encontrarse está muchas veces en valores cercanos al límite de sensibilidad de los métodos comúnmente empleados. Se podría pensar entonces que una forma de cuantificar la cantidad absorbido sería determinando la cantidad de fármaco liberado por diferencia entre la concentración de éste en el dispositivo antes y después de su utilización. Sin embargo, el componente activo en el dispositivo se encuentra en muy altas concentraciones y la cantidad de fármaco liberado es despreciable frente a ella (Singh y col. 1995). En la práctica se mide la cantidad de fármaco en la circulación sistémica y en la piel empleando equipos y técnicas de cuantificación de mucha sensibilidad y precisión, siendo la cromatografía líquida de alta resolución la técnica más utilizada.

Los efectos adversos agudos asociados a esta técnica son escasos. Lo que se observa con mayor frecuencia es irritación cutánea, pero ésta es reversible y se presenta durante períodos de tiempo transitorios. También se han detectado casos de pequeñas lesiones, eritemas y quemaduras en el tejido cutáneo, pero posiblemente asociadas a un uso excesivo de corriente eléctrica (Guy 1996; Ledger 1992; Singh y col. 1994).

La iontoforesis está contraindicada en ciertos casos. No debe emplearse en personas susceptibles a la corriente eléctrica, que tienen implantes eléctricos (como por ejemplo marcapasos cardíacos) y/o que tienen hipersensibilidad al fármaco incluido en estos sistemas (Singh y col. 1994).

Estudios recientes muestran múltiples aplicaciones de la iontoforesis en estomatología, dermatología (en el tratamiento de la hiperhidrosis), oftalmología y medicina física (Singh y col. 1994). También se ha aplicado esta técnica para la penetración tópica de antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos en el tratamiento de enfermedades virales como es el caso del herpes simplex y de las enfermedades de las articulaciones (Gargarosa y col. 1995; Ledger 1992).

Así mismo, se ha utilizado la iontoforesis como técnica de diagnóstico. Este es el caso del “test dulce” que permite detectar la fibrosis quística. En este procedimiento, la pilocarpina es introducida mediante iontoforesis a través de la piel para inducir la formación de sudor. El cloruro contenido en el sudor es cuantificado y utilizado como diagnóstico de dicha patología (Ledger 1992).

Uno de los principales desafíos actuales, es el desarrollo de un sistema de liberación de insulina por mecanismos iontoforéticos. Hasta ahora, sólo se ha podido controlar la hiperglucemia en animales, pero los requerimientos de insulina de éstos son entre 10 y 100 veces menores que los requeridos por los seres humanos (Guy 1996). Además, aún no se cuenta con un estudio detallado relacionado con la estabilidad de fármacos peptídicos o proteicos sometidos a un campo eléctrico por tiempos prolongado. Estas moléculas podrían estar eventualmente expuestas a mecanismos degenerativos en la superficie de la piel por efecto de la luz, el oxígeno o de alguna bacteria que pueda degradarlos (Singh y col. 1994).

Podría pensarse que el uso de la iontoforesis pudiese reemplazar a los sistemas que utilizan promotores químicos de la penetración, eliminando así los problemas asociados a la presencia de estos agentes. Alternativamente, se ha estudiado que empleando esta técnica en forma concomitante con dichos compuestos, se provoca un sinergismo que facilita la penetración de moléculas de alto peso molecular (como es el caso de los polipéptidos) (Srinivasam y col. 1990b).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL HERNÁNDEZ

Fundamentos de la técnica de iontoforesis

Cuando un campo eléctrico es aplicado a través de un medio conductor, como es el caso de la piel, la fuerza es ejercida por las especies cargadas que existan en ese medio. Si las especies se mueven libremente, se obtiene una fuerza denominada corriente eléctrica. En los metales, la fuerza es ejercida por la conducción de electrones y en las soluciones iónicas, como por ejemplo las soluciones fisiológicas salinas, la fuerza es ejercida por los iones presentes en ella (Sage y col. 1992).

En presencia de un campo eléctrico, los electrones que se encuentran en el metal que actúa como fuente anódica (electrodo donde ocurre la oxidación) migran en dirección al par iónico que actúa como fuente catódica (electrodo donde ocurre la reducción) provocando de esta forma, un flujo de iones para mantener al sistema en equilibrio. Si hay más de una especie iónica presente, cada especie contribuirá a la corriente eléctrica dependiendo de su concentración y de su movilidad. El número total de iones que pasarán a través de una superficie determinada por unidad de tiempo (en la misma dirección) será igual a la corriente que ha sido liberada desde la fuente de alimentación eléctrica (Gillespie y col. 1990; Sage y col. 1992).

En un sistema de iontoforesis, las sustancias catiónicas que son terapéuticamente activas deberán estar contenidas dentro del reservorio anódico, ya que cuando se aplique un campo eléctrico, las cargas positivas serán repelidas desde el ánodo y migrarán en dirección al cátodo. Así mismo, las especies activas aniónicas deberán estar contenidas en el reservorio catódico, para que migren hacia el ánodo. Una cantidad apropiada de corriente eléctrica, determinada por el área y por el tiempo de exposición, se aplica entre los dos electrodos produciéndose la repulsión de la molécula cargada de fármaco desde el electrodo activo. En este caso, como ambos electrodos se encuentran separados físicamente, pero ambos en contacto con la epidermis, las especies

cargadas deben pasar a través de la piel para llegar al electrodo de carga opuesta y así cerrar el circuito eléctrico. Una de las especies cargadas que pasarán hacia la piel corresponde al fármaco. Este principio activo se transportará en mayor o menor grado dependiendo de las otras especies cargadas presentes en el compartimento donante y de sus tamaños moleculares y movilidades relativas. La cantidad o la composición de las especies cargadas en el compartimento donante se pueden modificar para facilitar el paso del principio activo hacia la piel. Sin embargo, la composición iónica de la piel es fija y como ésta posee iones de mucha movilidad, como son el cloruro y el sodio, ellos pasarán más fácilmente de la piel al electrodo de carga opuesta que el fármaco y por lo tanto, los iones presentes en la piel transportarán la carga necesaria para cerrar el circuito eléctrico (Burnette 1989; Gargarosa y col. 1995; Sage y col. 1992; Singh y col. 1994). El fármaco una vez que accede a la piel ejercerá su acción localmente o bien, llegará a la circulación sanguínea para ejercer un efecto sistémico (Green 1996).

Es importante saber cuanta electricidad es requerida para transportar una determinada cantidad de fármaco. La cantidad total de iones que pasan a través de un circuito eléctrico puede calcularse a través de la Ley de Faraday (Gillespie y col. 1990; Sage y col. 1992).

Se sabe que la carga que transporta un electrón es de $1{,}60219 \times 10^{-19}$ coulombs (C). Por consiguiente, la carga de 1 mol ($6{,}02202 \times 10^{23}$) de electrones es ($6{,}02202 \times 10^{23}$ electrones/mol) ($1{,}60219 \times 10^{-19}$ C/electrón) = 96485 C/mol. La carga de un mol de electrones (96485 C/mol) es denominada constante de Faraday (F) (normalmente se utiliza F = 96500 C/mol). Por lo tanto, la carga de n de moles de electrones (Q), puede calcularse de la siguiente manera:

$$\boxed{Q = n \cdot F}$$

Esta ley nos permite determinar qué cantidad de iones requerimos en el ánodo para transportar una determinada cantidad de principio activo a través de la piel.

Rutas de penetración de los principios activos durante la iontoforesis

La penetración iontoforética ocurre preferentemente a través de las regiones que presentan menor resistencia eléctrica, es decir, a través de los conductos de los apéndices cutáneos (folículos pilosos y glándulas sudoríparas). Hay evidencias que sugieren que los folículos pilosos y las glándulas sebáceas son caminos de absorción pasiva de sustancias iónicas y que se produce un aumento en la cantidad de moléculas que fluyen a través de ellos cuando se aplica un campo eléctrico (Cullander 1992). Sin embargo, el transporte iontoforético por medio de estos canales, no

da cuenta del fenómeno de penetración total del fármaco, ya que ellos representan sólo el 0,1% de la superficie corporal cutánea, por lo tanto, se estima que el transporte también ocurre por rutas intercelulares (Cullander 1992; Yoshida y col. 1992).

Mecanismos de transporte de los principios activos durante la iontoforesis

Los mecanismos de liberación de fármacos por medio de iontoforesis son principalmente tres (Pikal 1992; Sage y col. 1992; Santi y col. 1993):

a) La corriente eléctrica incrementa la permeabilidad de la piel.
b) El campo eléctrico, al interactuar con la piel, otorga una fuerza que permite la conducción de iones a través de ella.
c) El fenómeno de electroosmosis produce un aumento en el flujo de solvente que permite explicar el aumento del transporte de especies neutras.

Describiremos brevemente cada uno de estos mecanismos.

a) Incremento en la permeabilidad de la piel

Se ha observado que durante el proceso de iontoforesis se incrementa la permeabilidad de la piel posiblemente debido a la depolarización que sufre ésta por efecto del flujo de corriente eléctrica. El cambio en la permeabilidad está relacionada directamente con la cantidad de corriente aplicada y con el periodo de aplicación de ésta. Cuando se suspende dicha aplicación, en el caso de la experimentación *"in vivo"*, la piel vuelve a depolarizarse, pero la resistencia inicial no se recobra inmediatamente (Cullander 1992; Fang y col. 1996; Pikal 1992; Varghese y col. 1996).

b) Interacción con el campo eléctrico o electrorrepulsión

La electrorrepulsión es el resultado de la interacción que se produce entre el campo eléctrico y los iones presentes en el sistema.

El flujo de un fármaco por efecto de la electrorrepulsión puede calcularse modulando la cantidad y duración de corriente eléctrica empleada. Para calcular el flujo de una determinado principio activo, se emplea la siguiente relación:

$$J_a = t_a \frac{I}{Z_a F} = Z_a * U_a \frac{C_a}{Z_i U_i C_i} * \frac{Y}{Z_a F}$$

Donde:

J_a = flujo del compuesto "a"
t_a = número de transporte del compuesto "a"
I = intensidad de corriente aplicada
u_a = movilidad eléctrica del compuesto
Z_a = carga
c_a = concentración del principio activo
c_i, u_i y Z_i = concentraciones, movilidades y cargas de los otros iones presentes.

De esta manera, el flujo de un ión se controla regulando la cantidad de corriente eléctrica aplicada, constituyendo esto una importante ventaja de la técnica de iontoforesis. Se puede entonces, controlar el sistema de iontoforesis desde el exterior para adaptar la penetración de un principio activo a las diferentes fases del tratamiento y para adecuar los niveles de éste de acuerdo a los requerimientos particulares de cada paciente.

c) Electroosmosis

Al aplicar un campo eléctrico sobre un fármaco neutro se observa un aumento en su liberación. El mecanismo que permite explicar este fenómeno es el flujo electroosmótico, ya que este tipo de fármacos carecen de cargas que son las que podrían interactuar con la corriente eléctrica. Se sugiere entonces, que el flujo electroosmótico es el único mecanismo responsable del transporte transdérmico de sustancias neutras, de sustancias de elevado peso molecular y de principios activos cargados que poseen un número de transporte pequeño (Delgado-Charro y col. 1994; Green y col. 1993; Kim y col. 1992; Pikal 1990; Pikal 1992; Sims y col. 1991).

Se denomina efecto electroosmótico al flujo de volumen que se produce como consecuencia de la aplicación de un campo eléctrico a través de una membrana cargada. Ocurre en una extensa variedad de membranas y se produce esencialmente como resultado de la presencia de cargas inmóviles que requieren de contraiones móviles para mantener la electroneutralidad del sistema. Este movimiento es siempre en la misma dirección del flujo de los contraiones (Burnette 1989; Burnette y col. 1987; Sims y col. 1991).

La piel humana posee una carga neta fija de signo negativo debido al gran número de proteínas aminoacídicas residuales (que contienen grupos carboxílicos) presentes en ella. Este órgano puede ser considerado como una membrana de intercambio iónico, ya que los iones cargados positivamente tienen mayor facilidad para atravesarla en comparación con aniones de tamaño similar (Burnette 1989; Yoshida y col. 1992). Como resultado de este paso preferencial de iones positivos, se transfiere una mayor cantidad de energía al solvente desde los cationes hidratados del sistema, produciéndose un flujo de volumen (flujo electroosmótico) desde al ánodo al cátodo (Burnette 1989; Delgado-Charro y col. 1994; Singh y col. 1994). En consecuencia, la penetración transdérmica de especies positivas es mayor que la transdérmica de especies negativas, favoreciéndose así la liberación anódica y retardándose la liberación catódica (Green 1996; Pikal 1992)

La importancia relativa del flujo electroosmótico depende del tamaño de la especie cargada que quiera transportarse. Este fenómeno adquiere mayor importancia cuanto mayor es el tamaño del ión. Con iones grandes, como son las proteínas, el flujo electroosmótico podría ser el proceso que permite explicar su penetración a través de la piel (Pikal 1992).

Se ha mencionado que el flujo electroosmótico es el único mecanismo que permite explicar el transporte iontoforético de iones que poseen un número de transporte pequeño, pero aún no se ha definido de qué depende este parámetro.

Este número puede calcularse de acuerdo a la siguiente ecuación (Yoshida y col. 1992):

$$t_i = I_i/I_t = J_i Z_i F/I_t$$

Donde:

I_i = densidad de corriente transportada por el ión
I_t = total de corriente aplicada
J_i = flujo molar iónico en equilibrio
Z_i = carga del ión
F = constante de Faraday.

Como se deduce de la ecuación anterior, es importante considerar la valencia que presenta el compuesto. Se ha estudiado que el paso de las especies divalentes a través de la piel es menor que el paso de las especies monovalentes, demostrándose que el transporte de las especies divalentes es aproximadamente la mitad puesto que un menor número de iones puede transportar igual cantidad de carga (Burnette 1989).

Componentes de un sistema de liberación iontoforético

Los sistemas de iontoforesis actuales son formulados como parches y tienen dimensiones semejantes a aquellos empleados para la administración de fármacos por medio de difusión pasiva.

Un sistema de iontoforesis debe contar con los siguientes componentes: una fuente de alimentación eléctrica, un par de electrodos, un compartimento receptor y un compartimento que contenga al fármaco (fig.7). A continuación describiremos la función y las características de cada uno de los componentes de este sistema.

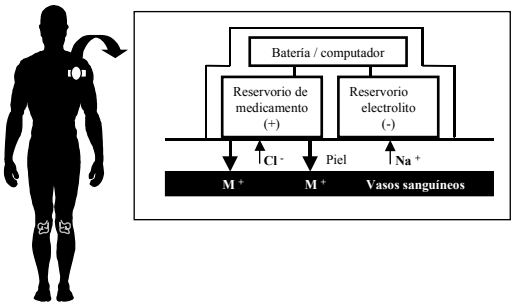


Figura 7: Representación de los componentes de un parche transdérmico de iontoforesis (Green 1996).

a) Una fuente de alimentación eléctrica o batería

Esta fuente provee la intensidad de corriente necesaria para provocar el transporte de iones entre los compartimentos donante y receptor. La fuente de alimentación anódica tiene un alto potencial y la fuente de alimentación catódica tiene un potencial menor (Sage y col. 1992).

Las baterías pueden trabajar a intensidades de corriente constante o a voltajes constantes. En iontoforesis es más adecuado trabajar a intensidades de corriente constantes ya que a voltajes constantes la corriente obtenida es dependiente de la resistencia de la piel y como este parámetro no es constante en el tiempo, se producirían flujos variables de principio activo (Hirvonen y col. 1995). Algunos autores proponen la incorporación de un sistema de seguridad a los circuitos de iontoforesis, de modo que si el voltaje del sistema excede de un cierto valor, la corriente sea

automáticamente reducida a nivel cero y se encienda una luz que dé cuenta de esta inactivación (Ledger 1992).

En la práctica, la fuente de electricidad en un sistema de iontoforesis corresponde a una batería de pequeño tamaño o a un microcomputador programable (Green 1996). Este es el componente más costoso del parche por lo que generalmente se emplean fuentes de electricidad recargables que puedan ser removidas después de una aplicación y por lo tanto, puedan volver a utilizarse (Green 1996; Singh y col. 1994).

b) Electrodos

Estos elementos transforman la corriente eléctrica en corriente iónica. En todo sistema iontoforético deben de haber a lo menos dos: un ánodo y un cátodo (Sage y col. 1992). Dependiendo del material empleado en la fabricación de los electrodos y el tipo de iones presentes en el sistema, se producirán unas reacciones electroquímicas determinadas.

Para que los electrodos puedan ser utilizados en un sistema de iontoforesis deben de cumplir con ciertos requisitos. Deben ser resistentes a altas densidades de corriente eléctrica sin sufrir pérdidas en el material con que están constituidos, deben poder actuar durante un período de tiempo prolongado (horas), no deben formar burbujas de gas y deben ser biocompatibles con la piel y con el fármaco que quiere liberarse.

Existen dos tipos de electrodos: los electrodos inertes que no participan en las reacciones electroquímicas y que por lo tanto no se consumen durante el transcurso de éstas, y los electrodos reversibles (Sage y col. 1992; Yoshida y col. 1992).

Los electrodos inertes (niquel, acero inoxidable, carbón, grafito o platino) utilizan la fuerza iónica del agua como combustible para que ocurra la reacción electroquímica requerida. La reacción electroquímica que ocurre en el ánodo es:

$$2H_2O \longrightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$$

Esta ecuación se equilibra con la transferencia de cuatro electrones a la fase metálica del cátodo. Por lo tanto, como resultado de la electrólisis del agua, se producen protones (H^+) en el ánodo e hidroxilos (OH^-) en el cátodo (Sage y col. 1992; Yoshida y col. 1992). Así, a medida que

se aplica corriente eléctrica, más hidroxilos y protones son generados produciéndose una reducción en el flujo de especies similares a ellos y por tanto, una disminución en la absorción del fármaco (Lelawongs y col. 1990).

Para reducir el efecto de los iones provenientes de la hidrólisis del agua generados mediante el uso de este tipo de electrodos, y para evitar la degradación de moléculas de soluto, se suelen incorporar soluciones buffers. Al utilizar estas soluciones se debe verificar que los iones que la componente no compitan con los otros iones presentes en el sistema. Además, es importante controlar el pH ya que una alteración en este parámetro puede provocar un daño en la superficie de la piel (Sage y col. 1992; Yoshida y col. 1992).

Cuando se utilizan electrodos reversibles no se generan protones ya que no se requiere de la hidrólisis del agua como reacción de oxidación del ánodo. Para que una reacción de oxidación ocurra con prioridad respecto a la reacción de hidrólisis del agua, ésta debe de tener las siguientes características (Sage y col. 1992) :

- Que el potencial de la reacción esté por debajo de 1.22 V del potencial de oxidación del agua
- Que las especies iónicas necesarias para la reacción de oxidación estén disponibles en las cantidades necesarias

El sistema que se utiliza por excelencia como sistema electroquímico reversible lo conforman los electrodos de Ag°/AgCl. Este par iónico otorga las características adecuadas de reversibilidad, reproducibilidad y estabilidad; además el potencial redox del sistema es lo suficientemente bajo que permite la electroneutralidad del agua.

Las reacciones que ocurren en este sistema son las siguientes:

$$\text{Anodo: } Ag^{o} + Cl^{-} \longrightarrow AgCl + 1e^{-}$$

$$\text{Cátodo: } AgCl + 1e^{-} \longrightarrow Ag^{o} + Cl^{-}$$

El cloruro de plata que se produce durante la reacción es insoluble y precipita en la superficie del ánodo. De este modo, los iones generados no compiten con los iones que transportan la corriente (Green y col. 1993; Ledger 1992; Sage y col. 1992; Yoshida y col. 1992).

En la figura 8 se presenta un esquema de un dispositivo de iontoforesis empleando electrodos reversibles de plata/cloruro de plata.

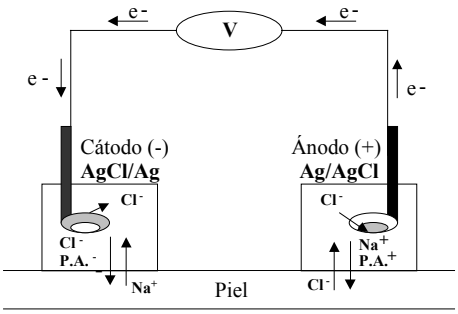


Figura 8: Esquema de un dispositivo de iontoforesis empleando electrodos Ag/AgCl. Cuando se aplica una diferencia de potencial, se fuerza el movimiento de los electrones en el circuito externo produciéndose las reacciones electroquímicas correspondientes. En el ánodo ocurre la oxidación de la plata depositándose AgCl en este electrodo y requiriéndose de iones Cl^- para esta reacción. En el cátodo se deposita Ag^0 y se liberan cloruros al medio. Paralelamente, la misma cantidad de carga será transportada en el circuito interno, es decir, en la piel (adaptado de Green y col. 1993).

Cuando se utilizan electrodos reversibles, también es importante controlar el pH, ya que la disociación del fármaco depende de este parámetro. Es por esto conveniente utilizar sistemas buffers que tenga una buena capacidad tamponante, pero que su fuerza iónica no sea excesiva ya que si existe competencia de los componentes del buffers con las moléculas de fármaco se obtiene un proceso iontoforético de baja eficiencia (Huang y col. 1996b; Lelawongs y col. 1990). El buffer ideal es aquel que contiene iones en concentraciones mínimas para que no contribuyan a la liberación de corriente y tengan la suficiente capacidad buffer para mantener el pH en valores constantes (Yoshida y col. 1992). El buffer Hepes (Pka = 7,55) es el más utilizado en estudios de iontoforesis por su alta capacidad tamponante a pH 7,4; por su baja fuerza iónica y porque es compatible con los sistemas fisiológicos (Burnette y col. 1988).

En la práctica, los electrodos que se emplean en un parche tienen forma circular ubicándose uno en el compartimento donante y otro en el compartimento receptor (Singh y col. 1994). Los electrodos se separan a una cierta distancia para que el principio activo tenga que penetrar en la piel y así se cierre el circuito electroquímico. Si los electrodos estuviesen en contacto directo, las especies cargadas presentes en el sistema no penetrarían en la piel sino que se moverían a través

del camino que opone menos resistencia, es decir, se moverían de un electrodo al electrodo de carga opuesta sin necesidad de penetrar en la piel.

c) Reservorio del fármaco

Este compartimento o reservorio es de naturaleza acuosa y corresponde al reservorio que contiene al agente terapéuticamente activo (Sage y col. 1992; Sage 1993).

Para la elección del material de este compartimento, es importante considerar que el parche se aplicará en la piel, es decir, que el material que lo constituye no debe de tener una estructura rígida y a la vez, debe poder estar en contacto con los electrodos que se incorporarán en su interior. Es así como comúnmente se emplean geles biocompatibles o almohadillas de un material adsorbente como reservorio donante de estas formas de dosificación (Green 1996).

Normalmente el pH de este compartimento es ajustado para optimizar la liberación iontoforética del fármaco y para que a la vez sea tolerable por la piel. El rango de pH de trabajo más común es el de pH de 4 a 8 (Green 1996; Yoshida y col. 1992).

Para calcular la cantidad de fármaco liberado desde un parche de iontoforesis puede utilizarse la siguiente relación (Green 1996):

$$\text{Dosis liberada (masa)} = \frac{PM \cdot I_t \cdot E_c \times t}{C_m \times F}$$

Donde:

PM = peso molecular
I_t = corriente aplicada
E_c = eficiencia de la corriente
t = tiempo de aplicación
C_m = carga molecular
F = constante de Faraday

d) Reservorio receptor

Normalmente este compartimento o reservorio corresponde a una solución salina isotónica la cual permite completar el circuito eléctrico. En ciertos casos, este compartimento contiene un fármaco cargado adicional que puede ser liberado en forma concomitante con el fármaco presente en el reservorio donante (Green 1996; Sage y col. 1992).

Montaje de un sistema de iontoforesis *"in vitro"*

a) Tipos de células de difusión

Para realizar los estudios de iontoforesis *"in vitro"* existen fundamentalmente dos sistemas: aquellos que emplean células de difusión vertical y aquellos que emplean células de difusión horizontal o lado a lado. Todas las células empleadas en estos estudios constan fundamentalmente de los mismos componentes y lo que varía es su disposición espacial.

Las células son normalmente de vidrio y están formadas por dos compartimentos. El corte de piel (que tiene un espesor de unos pocos centenares de µm) se coloca entre los compartimentos de modo que la epidermis quede en contacto con la solución donante y la hipodermis quede en contacto con la solución receptora (Sage y col. 1992).

Describiremos a continuación las características de cada célula de difusión y las características de la piel que puede ser empleada para este tipo de estudios.

Las células de difusión vertical constan de un compartimento receptor con una capacidad de 4 mL aproximadamente y de una tapa de vidrio que posee dos divisiones. Los compartimentos de la tapa corresponden al reservorio donante que contiene un electrodo, al reservorio que contiene el electrodo de carga opuesta y el tercero corresponde a un compartimento vacío entre los dos anteriores que los separa físicamente. De esta manera, cuando se aplica una cantidad de corriente eléctrica al sistema, como los electrodos están separados físicamente, para que ocurran las reacciones electroquímicas necesarias para completar el circuito, los iones presentes en el compartimento donante, entre ellos el fármaco, deben penetrar a la piel.

Las células de difusión horizontal o lado a lado están formadas por dos compartimentos de iguales dimensiones, que tienen una capacidad aproximada de 5 mL y que se unen horizontalmente mediante una pinza. Uno de ellos corresponde al compartimento donante y otro al receptor y la piel se coloca entre estos dos compartimentos (Huang y col. 1996a).

En cada uno de los compartimentos de la célula lado a lado, se encuentra un electrodo, quedando por tanto, un electrodo en contacto con el reservorio donante, y otro electrodo en contacto con el compartimento receptor. Por esta razón, estos sistemas no simulan con precisión lo que ocurrirá posteriormente *"in vivo"*, ya que un electrodo se encuentra en contacto con el estrato córneo de la piel (situación real) y otro se encuentra en contacto con la hipodermis de ésta (situación no real). En las células de difusión vertical en cambio, ambos electrodos se ubican en la epidermis cutánea, por lo que ellas teóricamente reflejan de mejor forma lo que ocurrirá posteriormente *"in vivo"*.

b) Modelo animal empleado

Han sido muchos los modelos animales que se han utilizado con el objetivo de estudiar la penetración transdérmica de fármacos "*in vitro*". Alguno ejemplos son: ratón sin pelo, cerdo, cerdo de guinea sin pelo, rata sin pelo y rata con pelo. Para experimentación "*in vivo*" se han utilizado cerdos, monos, perros y conejos. La piel humana se ha empleado tanto para estudios "*in vitro*" como "*in vivo*" (Green y col. 1993; Huang y col. 1996b; Sage y col. 1992).

La elección del animal del cual se empleará su piel depende del propósito particular de cada estudio. No existe un modelo de piel animal que pueda ser perfectamente comparable con la piel humana y que tenga las mismas características metabólicas y fisiológicas que ésta, por lo que se debe elegir aquel modelo que presente mayores similitudes en cuanto al mecanismo de transporte de la sustancia en estudio (Qvist y col. 2000). Además de la absorción percútanea que es característica de cada especie, también lo es la permeoselectividad inducida por la aplicación de corriente eléctrica (Green y col. 1993; Varghese y col. 1996).

La ventaja de emplear en los estudios de difusión transdérmica piel procedente de animales es principalmente la facilidad en su obtención y que sus antecedentes genéticos como de sexo y edad son fáciles de conocer. Por el contrario, la adquisición de piel humana es limitada y se obtiene por medio de donación por parte de los hospitales, ya sea procedente de cadáveres o de cirugías estéticas (Burnette y col. 1986; Qvist y col. 2000).

Al estudiar los diferentes tipos de piel se ha encontrado que la piel de ratón y la de cerdo son similares a la piel humana (Burnette y col. 1986). La piel de cerdo, que es la escogida para realizar este trabajo de investigación, tiene características morfológicas, histológicas y funcionales semejantes a la piel humana y la composición y el grosor de la epidermis son similares. Además, el valor de su parámetro π (parámetro que dice relación con la lipofilicidad de la piel) también es muy semejante (Fred y col. 1994; Gao y col. 1998; Ledger 1992; Touitou y col. 1998; Walter y col. 2000). Sin embargo, la cantidad de fibras elásticas que posee la dermis de la piel de cerdo es menor que la posee la piel humana y otras especies animales (Walter y col. 2000).

Un factor importante de considerar para elegir un modelo de piel animal para realizar estudios de iontoforesis son sus propiedades de electrotransporte. La permeabilidad selectiva que presente la piel es fundamental cuando el transporte de una especie a través de la piel se debe fundamentalmente a la contribución del flujo electroosmótico. Es así como la determinación del punto isoeléctrico de la piel (correspondiente al valor de pH donde la piel presenta una carga neta igual a cero) es un buen indicador para ello (Burnette y col. 1987; Kim y col. 1993). Se ha determinado que el flujo de solvente causado por electroosmosis a través de la piel de cerdo es muy similar al medido a través de piel humana y de ratón sin pelo (Luzardo - Alvarez y col. 1998). Esto nos indica que la piel de cerdo es un buen modelo animal para evaluar el flujo electroosmótico en iontoforesis.

Cuando se realiza un experimento *"in vitro"*, es importante considerar el daño que experimenta la piel por la aplicación de corriente eléctrica ya que en estos estudios no existe el proceso de regeneración natural de la piel (Green y col. 1993).

Como una forma de poder correlacionar mejor la experimentación *"in vitro"* e *"in vivo"* se ha empleado recientemente una técnica denominada *"ex vivo"*. Esta es una técnica sofisticada por medio de la cuál se logra mantener la piel bioquímicamente viable por unas horas permitiendo de esta forma determinar de manera más real la farmacocinética de absorción tópica de ciertos fármacos (Green y col. 1993).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Parte IV: Hidrogeles

Se denomina gel a un estado de la materia intermedio entre el estado sólido y el estado líquido y que se consigue cuando un sólido es capaz de retener a un líquido en su estructura molecular. En estos sistemas, el sólido y el líquido coexisten en equilibrio. El líquido impide que el sólido colapse transformándose en una masa compacta; y el sólido impide que el líquido fluya libremente.

La apariencia externa de un gel depende de su proporción líquido/sólido, encontrándose una gran variedad de consistencias (desde fluidos viscosos hasta sólidos rígidos) (Gehrke y col. 1990; Tanaka 1981).

Una clase específica de geles son los hidrogeles. Estos materiales se originan de un entrecruzamiento entre polímeros y/o monómeros, que posteriormente se hinchan en agua hasta alcanzar el equilibrio. Los compuestos poliméricos son especialmente aptos para formar hidrogeles debido a que corresponden a cadenas carbonadas largas que son flexibles y permiten su deformación y la incorporación de disolvente dentro de su estructura sólida (Bruck 1973; Kim y col. 1992).

Los hidrogeles son de naturaleza hidrofílica debido a que en su estructura presentan grupos funcionales como -OH, -COOH, $-CONH_2$, -CONH, $-SO_3H$. Sin embargo, son insolubles en agua debido a que los monómeros que lo constituyen forman una red tridimensional. Son materiales de características elásticas y blandos (Bouwstra y col. 1993).

Los hidrogeles pueden comportarse como sustancias impermeables, semipermeables o totalmente permeables a los solutos dependiendo de los estímulos externos a los que son sometidos y al tiempo transcurrido en relación con el tiempo de su equilibrio de hinchamiento (Gehrke y col. 1990).

Para sintetizar estos materiales, en muchos de los casos es necesario que ocurra una reacción de polimerización por lo que describiremos brevemente este proceso.

Polimerización

Se conoce como polimerización a una serie de reacciones que conducen a la unión de monómeros idénticos o diferentes. Son reacciones en cadena que se desarrollan a partir de moléculas activas.

Cuando un polímero está formado solamente por un tipo de unidades monoméricas se le denomina homopolímero. Sin embargo, un polímero también puede estar formado por diferentes tipos de monómeros, y en este caso recibe el nombre de copolímero. La composición de las macromoléculas generadas durante la copolimerización dependerá de la proporción relativa entre los monómeros y del tipo de ordenamiento que experimenten éstos cuando lo formen. Es frecuente encontrar que los polímeros sintetizados al principio de la reacción de copolimerización tengan una mayor proporción de uno de los monómeros que los formados al final de ésta. En la figura 9 se muestran diferentes copolímeros generados a partir de los monómeros A y B, como se observa, se pueden obtener copolímeros periódicos, aperiódicos, en bloque o injertados dependiendo del tipo de ordenamiento que experimenten los monómeros (García 1992).

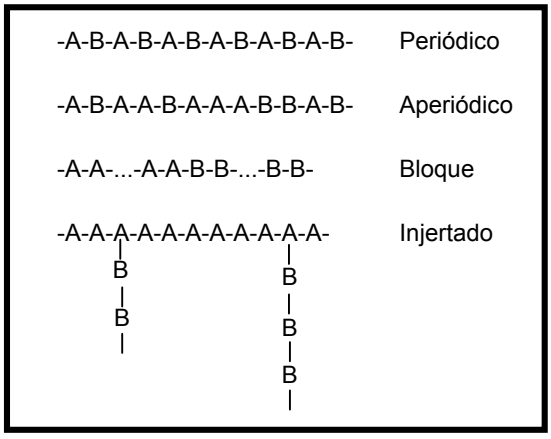


Figura 9: Tipos de copolímeros (García 1992).

Las reacciones de polimerización pueden ocurrir espontáneamente y dan origen a los denominados polímeros naturales (como por ejemplo: la goma natural, la lana, la celulosa, el algodón, las proteínas, etc.) o bien, estas reacciones pueden ser inducidas, dando origen a los denominados polímeros sintéticos (como por ejemplo: polietileno, teflón, nylon, neopreno, etc.) (Champetier y col. 1973; Morrison y col. 1985; Whitten y col. 1998). En la figura 10 se muestran algunos ejemplos de reacciones de polimerización.

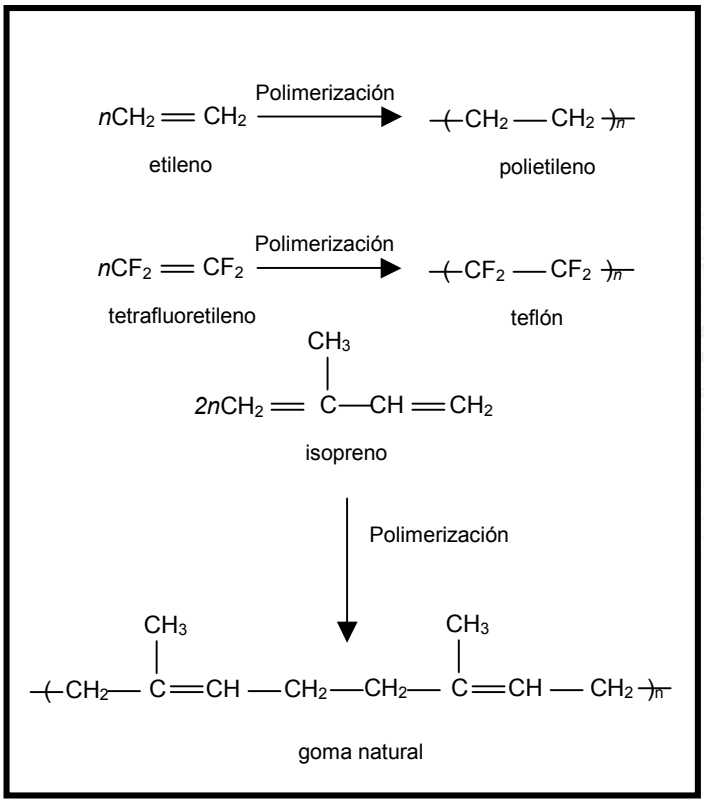


Figura 10: Ejemplos de reacciones de polimerización (Whitten y col. 1998).

Este tipo de reacciones se compone de tres fases: fase inicial de activación o iniciación, fase de propagación y fase de terminación. A continuación describiremos cada una de ellas.

a) Fase inicial de activación o de iniciación

Esta fase consiste en la formación de moléculas activas. Es un proceso relativamente lento y que necesita una cantidad de energía elevada. La reacción de iniciación puede ocurrir espontáneamente por los choques producidos entre las moléculas de monómeros, pero lo usual es que se requiera de la presencia de un iniciador. El tamaño del polímero que se obtiene es inversamente proporcional a la cantidad de iniciador añadido, es decir, cuanto más iniciador se emplea, más cadenas se forman y por lo tanto más corto es el polímero obtenido (Díaz Peña y col. 1988).

Esquemáticamente podría ilustrarse como:

$$m_1 + m_1 \longrightarrow m_1 + m_1^*, \text{ o bien}$$

$$m_1 + m_1 \longrightarrow m_2^*$$

Donde m_1^* y m_2^* son moléculas activadas. Por ejemplo si se trata de un monómero de tipo alqueno, la forma activada corresponde a la apertura del doble enlace de la molécula monomérica (Champetier y col. 1973; Morrison y col. 1985).

La iniciación puede ocurrir por la adición de ciertas moléculas que se descomponen espontáneamente generando radicales libres; ejemplo de estos iniciadores son los compuestos orgánicos de tipo peróxido. Las reacciones de polimerización también pueden iniciarse empleando mecanismos fotoquímicos, térmicos o utilizando radiaciones γ. En la iniciación fotoquímica, la molécula de monómero absorbe un fotón para dar un radical, mientras que en la iniciación térmica, la reacción se produce por choques bimoleculares entre dos moléculas de monómero (Morrison y col. 1985). La polimerización por radiaciones γ corresponde a una iniciación radical donde se generan especies reactivas ya sea por reacción con el disolvente o con el monómero. Los radicales libres generados a partir de los monómeros, corresponden a éstos sin sus correspondientes átomos de hidrógeno (Champetier y col. 1973).

En ciertas ocasiones los disolventes, por los choques de sus moléculas con las moléculas monoméricas, intervienen en la fase de activación. Si la molécula de disolvente se mantiene inalterada la reacción que ocurrirá será la siguiente:

$$m_1 + s \longrightarrow m_1^* + s$$

La velocidad total del proceso de polimerización está determinada por esta fase ya que es la fase más lenta del proceso.

b) Fase de propagación

Esta etapa corresponde al crecimiento de las cadenas macromoleculares. En esta fase, la energía de activación requerida es alrededor de diez veces menor que la requerida para la etapa de activación y debido a esto, es una reacción mucho más rápida que la anterior (Champetier y col. 1973).

La fase de propagación es una acción en cadena debida a las reacciones sucesivas de moléculas monoméricas sobre moléculas activas.

$$m_1^* + m \longrightarrow m_2^*$$

$$m_2^* + m \longrightarrow m_3^*$$

$$m_j^* + m \longrightarrow m^*_{+1}$$

La propagación polimérica por medio de la reacción entre dos moléculas activas que den origen a su vez una tercera molécula activa, también es posible. Sin embargo, esta parece ser una reacción secundaria que no modifica el curso global de la reacción.

Las uniones entre los monómeros en una reacción de polimerización pueden no efectuarse siempre en el mismo sentido, el llamado “cabeza con cola”. Ciertas unidades monoméricas pueden unirse en el sentido “cabeza con cabeza” o “cola con cola”, por lo que la estructura final del polímero está regida en una grado importante por el azar (Champetier y col. 1973).

c) Fase de terminación

Esta fase corresponde a la inactivación de las cadenas macromoleculares.

El crecimiento de las cadenas se interrumpe por diferentes mecanismos de desactivación. Por ejemplo, puede pensarse que un polímero en crecimiento una sus dos extremos activos y por lo tanto se logre su desactivación ya sea por ciclación o por formación de un doble enlace terminal mediante la migración de un átomo de hidrógeno (Champetier y col. 1973; Diaz Peña y col. 1988).

La inactivación también puede ocurrir por combinación, es decir, cuando dos moléculas se unen por sus enlaces libres terminales. Se puede representar de la siguiente forma:

$$m_i^* + m_j^* \longrightarrow m_{i+j}$$

O bien, la desactivación puede ocurrir por dismutación o desproporcionamiento, es decir, cuando existe transferencia de un átomo de hidrógeno de una macromolécula a otra. Esta reacción puede representarse de la siguiente manera:

$$m_i^* + m_j^* \longrightarrow m_i + m_j$$

Tipos de reacciones de polimerización

Las reacciones de polimerización pueden efectuarse de diferentes formas dependiendo de la naturaleza del monómero y de la utilización que se vaya a dar al polímero generado (Champetier y col. 1973).

Polimerización en bloque: El monómero está al estado líquido y polimeriza por acción del calor en presencia de un iniciador conveniente, y en ausencia de disolvente. El medio de reacción se va haciendo cada vez más viscoso pudiendo incluso llegar a solidificarse. Si el polímero formado es insoluble en el monómero que lo constituye, se puede producir la precipitación del polímero.

Polimerización en solución: El polímero obtenido puede ser soluble en el disolvente o precipitar a partir de cierto grado de polimerización. Este método exige una gran cantidad de disolvente ya que es importante controlar la viscosidad del medio. Tiene la ventaja de que la temperatura de reacción está limitada por el punto de ebullición del disolvente.

Polimerización en emulsión: Los monómeros que son insolubles en agua o muy poco solubles en ella, son emulsionados con agentes tensoactivos (jabones alcalinos, oleato amónico, aceite o alcoholes grasos sulfonados, alcohílo-naftaleno, sulfonato de sodio, etc.) Esta reacción puede requerir también de la presencia de coloides protectores (alcohol polivinílico, metilcelulosa, etc.), de reguladores de tensión superficial (alcoholes alifáticos,o aromáticos, aminas, etc.), de tampones de pH y de un iniciador soluble en el medio acuoso (agua oxigenada, persulfatos, perboratos, sistemas redox, etc.). Este método de polimerización presenta la gran ventaja de que se utiliza agua como medio de dispersión, y tiene el inconveniente de originar polímeros difíciles de separar de los productos que facilitan la emulsión y que se añaden en grandes cantidades.

Polimerización en suspensión: El monómero se dispersa en un medio acuoso en forma de gotas (de alrededor de un milímetro), utilizándose como agentes accesorios un estabilizador (gelatina, almidón, derivados celulósicos, alcohol polivinílico, sales minerales, etc.) que impide la coalescencia de las gotas y un agente tensoactivo que determina la dimensión éstas. En este caso, el iniciador debe ser soluble en las gotas del monómero.

Composición de los hidrogeles

Para sintetizar un hidrogel, se requieren básicamente cuatro componentes:

- Monómeros
- Iniciador
- Agente entrecruzante
- Agua

a) Monómeros

Los monómeros que se emplean para sintetizar hidrogeles se pueden dividir en tres categorías:

1. Monómeros con sustituyentes laterales no ionizables. Ejemplos de estos monómeros son: N-metilacrilamida, N-vinilpirrolidona, y metacrilato de 2-hidroxietilo.
2. Monómeros con grupos funcionales ionizables. Ejemplos de estos monómeros son: ácido acrílico, ácido metacrílico, acrilamida, 2-vinilpiridina. Los hidrogeles preparados a partir de estos monómeros absorben grandes cantidades de agua.
3. Monómeros cuyo grupo lateral presenta dos cargas y que pueden unirse a la cadena principal. Un ejemplo de este tipo de monómeros lo constituye el N-(3– sulfopropil) -N - metacroiloxietil – N,N – dimetilamonio sulfobetaína.

En la figura 11 se muestran algunos de los monómeros empleados para la síntesis de hidrogeles.

b) Iniciador

Como se mencionó anteriormente, en la mayoría de los casos es necesario un compuesto que facilite o promueva la reacción de polimerización. Este compuesto se conoce con el nombre de iniciador.

No existe un iniciador específico para cada reacción de polimerización, la elección del iniciador y la concentración requerida de éste se realiza de manera empírica. Un requisito indispensable para el empleo de un determinado iniciador es que éste debe ser soluble en el monómero. Además, se debe considerar que el proceso de iniciación de la reacción de polimerización con el iniciador elegido, emplee un tiempo razonable.

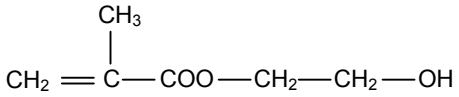
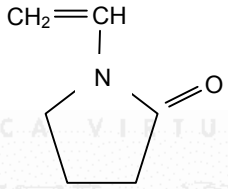
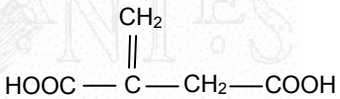
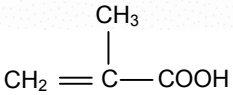
Tipo de monómero	Ejemplos
Con sustituyentes laterales no ionizables	 metacrilato de 2-hidroxietilo  N - vinil- 2- pirrolidona
Con grupos funcionales ionizables	 ácido itacónico  ácido metacrílico

Figura 11: Ejemplos de monómeros empleados para la síntesis de hidrogeles (Gehrke y col. 1990; Turner 1991; Vadillo 1992).

C) Agente entrecruzante

El agente entrecruzante permite que las cadenas poliméricas que constituyen el hidrogel, queden unidas y formen así una red tridimensional más compacta. Las fuerzas cohesivas que producen el entrecruzamiento no son sólo de carácter covalente; también están presentes interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, fuerzas dipolo-dipolo y/o enlaces por puente de hidrógeno.

En la figura 12 se muestran algunos ejemplos de agentes entrecruzantes empleados en la síntesis de hidrogeles.

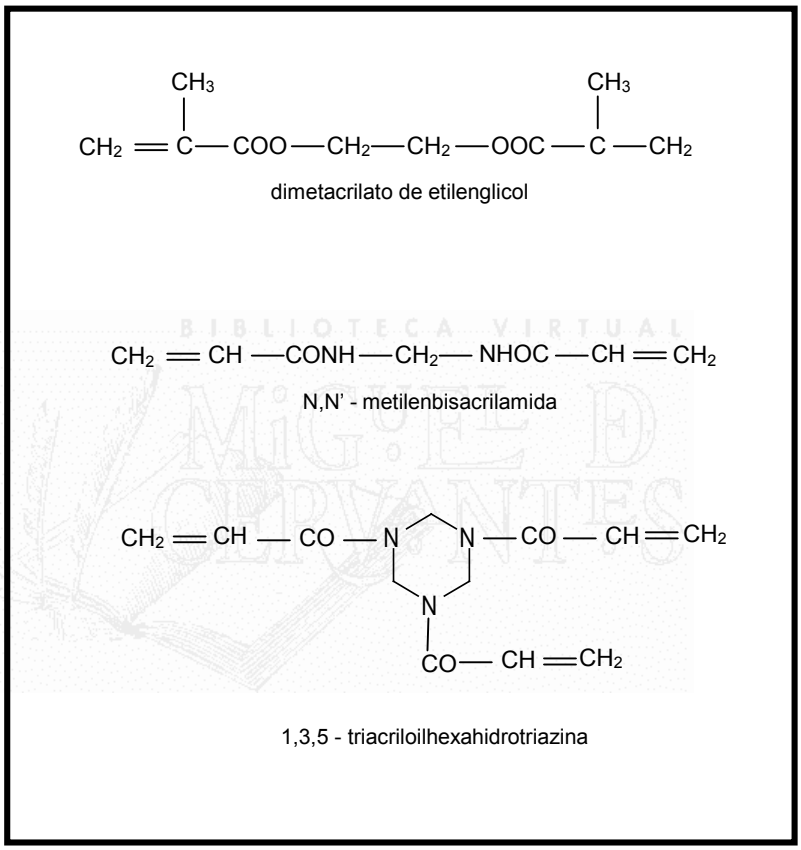


Figura 12: Ejemplos de agentes entrecruzantes empleados en la síntesis de hidrogeles (Gehrke y col. 1990; Vadillo 1992).

d) Agua

El agua se emplea tanto como medio de reacción de la polimerización como de disolvente que provoca el hinchamiento del hidrogel.

Síntesis de los hidrogeles

Existen dos rutas básicas para sintetizar hidrogeles. Una es el entrecruzamiento entre polímeros lineales y otra, es la reacción simultánea de polimerización y de entrecruzamiento. Para esta última se emplea como estructura base monómeros monofuncionales y como agentes entrecruzantes, polímeros polifuncionales.

El entrecruzamiento entre polímeros lineales puede producirse mediante el empleo de agentes químicos, el uso de radiaciones iónizantes o simplemente puede producirse una interacción física entre los polímeros presentes que permita su entrecruzamiento.

En el caso del entrecruzamiento por acción de algún agente químico, se emplea una pequeña concentración de agente entrecruzante y el entrecruzamiento se produce por la interacción entre grupos funcionales capaces de condensar con los grupos hidroxilos colgantes que poseen la mayoría de los polímeros hidrofílicos. La reacción ocurre normalmente en solución, aunque la polimerización en suspensión también puede emplearse. El disolvente de elección es el agua, pero también puede emplearse alcohol (Gehrke y col. 1990).

El entrecruzamiento de polímeros lineales mediante radiación ionizante tiene la ventaja de que no quedan impurezas residuales del proceso, como pueden restos de agente entrecruzante; pero es un procedimiento costoso. En esta técnica, los polímeros lineales son sometidos a radiaciones ionizables, produciéndose así radicales libres en la cadena polimérica. Estos radicales a su vez, pueden reaccionar y entrecruzarse entre ellos, o bien, pueden causar la ruptura del polímero en fragmentos lo que lleva a su degradación. El entrecruzamiento se realiza si la velocidad de entrecruzamiento es mayor que la velocidad de degradación del polímero. Es importante que la reacción se haga en ausencia de oxígeno ya que este gas promueve la degradación del hidrogel especialmente si el entrecruzamiento ocurre a velocidades lentas. Otro problema potencial de este tipo de reacciones, es la generación de gases (especialmente hidrógeno) los cuales pueden quedar atrapados en el interior del polímero (Gehrke y col. 1990; Turner 1991).

La formación de hidrogeles por interacción física entre polímeros es menos frecuente cuando se emplean estos sistemas como vehículos para la administración de fármacos. Sin embargo, esta técnica se emplea en otros casos, como por ejemplo, cuando se requiere del entrecruzamiento entre complejos cargados.

Técnicas de síntesis de los hidrogeles

Las técnicas principales de síntesis son: polimerización en solución, polimerización en suspensión y polimerización en emulsión (Bouwstra y col. 1993; Gehrke y col. 1990).

La polimerización en solución es la polimerización más común y simple. En este caso, el agente entrecruzante y el iniciador se disuelven en el monómero poniéndose todos los componentes de la reacción en un recipiente adecuado. Esta reacción depende de la reactividad de las especies presentes y debe realizarse en ambiente inerte (N_2 o Ar). El mayor inconveniente de este tipo de polimerización es que se debe remover el monómero que no ha reaccionado ya que existen algunos monómeros que son tóxicos y no así sus correspondientes polímeros. Por esta razón, se debe de lavar muy bien el hidrogel una vez sintetizado (con etanol o con mezclas etanol/agua, durante 12 a 24 hrs.), de modo de eliminar completamente el monómero que no ha reaccionado y el iniciador que haya quedado libre. Además, cuando se realiza la polimerización en solución, el fármaco no puede ser incorporado en el momento de la polimerización sino que debe incorporarse una vez que el hidrogel esté debidamente lavado (Bouwstra y col. 1993; Gehrke y col. 1990).

Propiedades de los hidrogeles

Los hidrogeles poseen dos características importantes: por su naturaleza química son permeables a solutos de pequeño tamaño y por tener consistencia suave y gomosa, son biocompatibles y producen mínima irritación mecánica cuando están en contacto con tejidos y/o células (Bouwstra y col. 1993).

Las propiedades físicas de los hidrogeles dependen de muchos factores: la naturaleza de los monómeros y/o polímeros que lo componen, el pH al que se encuentran, la intensidad iónica del solvente con que están en contacto, el tipo y cantidad de agente entrecruzante utilizado, el tipo de iniciador y el proceso de polimerización empleado, la luz y la temperatura (que puede cambiar apreciablemente el volumen del gel) (Andersson y col. 1997; Lee y col. 1997; Tanaka 1981; Turner 1991). Es por ello que mezclando adecuadamente monómeros hidrofílicos e hidrofóbicos, monómeros iónicos y agentes entrecruzantes de diferente tipo y concentración se podrá, entre otras cosas, ajustar la hidrofilidad del sistema (Gehrke y col. 1990).

Como se mencionó anteriormente, los hidrogeles son capaces de absorber una gran cantidad de agua (mayor al 20% de su peso) manteniendo intacta su estructura tridimensional, siendo la cantidad de agua absorbida por estos sistemas función de la hidrofobicidad del polímero que los constituye (Gehrke y col. 1990; Turner 1991). Además, siendo la captación de agua un proceso reversible y dependiente de los cambios ambientales como la temperatura y la presión.

La propiedad de absorción y desorción reversible de líquido por parte de los hidrogeles es usada para controlar la liberación de principios activos y por esto los hidrogeles son considerados como sistemas eficientes para la liberación de fármacos. Siempre que sea posible, el gel ajustará su volumen, de modo que la presión osmótica total sea nula. Si inicialmente la presión es positiva, el gel absorberá líquido y se expandirá (suponiendo que exista un exceso de fluido disponible y que no haya ningún impedimento exterior a la expansión del gel). Si la presión es negativa, el gel expulsará fluido y se contraerá. La dilatación o contracción continuará hasta que se alcance un equilibrio, en el cual las distintas presiones que actúen sobre el gel se anulen entre sí (Tanaka 1981; Turner 1991).

En la figura 13 se muestran dos posibles mecanismos de liberación de solutos desde los hidrogeles. Esta liberación puede ocurrir cuando el hidrogel se encuentra hidratado, o bien, puede ocurrir durante el proceso de deshidratación de éste (Vakkalanka y col. 1996).

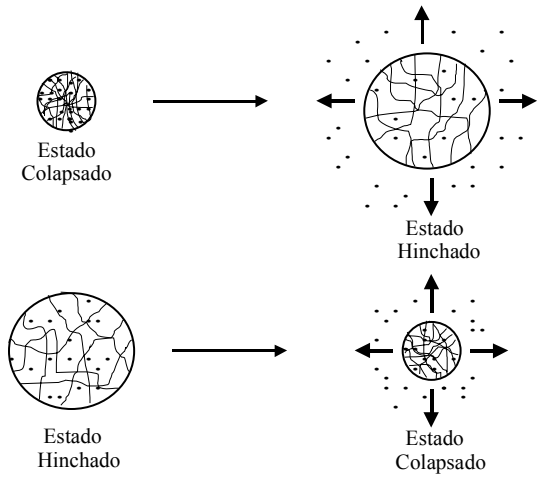


Figura 13: Dos posibles alternativas de la difusión de solutos desde un hidrogel (Vakkalanka y col. 1996).

La difusión del soluto en el interior del hidrogel, puede realizarse por medio de dos mecanismos, los denominados mecanismo del “poro” y mecanismo de “partición”. En el mecanismo del “poro”, el soluto se mueve dentro del gel sólo en las regiones que contienen agua. En el mecanismo de “partición”, el transporte del soluto es por medio de una disolución termodinámica en la fase polimérica. En la mayoría de los casos, el mecanismo del “poro” es el mecanismo prioritario, y por lo tanto, considerando sólo este mecanismo de difusión podemos interpretar lo que se observa experimentalmente (Gehrke y col. 1990).

Las ventajas de las formulaciones en hidrogeles incluyen la comodidad en su aplicación y que requieren una mínima hidratación de la piel para ser utilizados. Las formulaciones pueden ser diseñadas como parches para ser administrados una vez al día o una vez a la semana (dependiendo de las características del principio activo y del hidrogel) (Banga y col. 1993). Un inconveniente que presentan estos sistemas, es la poca pureza de los monómeros y la toxicidad que presentan alguno de ellos (Bouwstra y col. 1993).

Los hidrogeles pueden caracterizarse por diferentes parámetros. A continuación mencionaremos algunos de ellos: grado de hinchamiento, cinética de hinchamiento, biocompatibilidad y permeabilidad.

Grado de hinchamiento

Este parámetro está condicionado al grado de entrecruzamiento del hidrogel, al método de entrecruzamiento empleado, al entrecruzante utilizado (funcionalidad, composición química, etc.); así como también a la naturaleza química del gel (homogeneidad, estructura de separación de fases, etc.), a la presencia de fármaco en el solvente y a la temperatura de trabajo (Andersson y col. 1997; Gehrke y col. 1990; Kim y col. 1992; Peppas y col. 1983).

Todos los factores que impliquen un aumento de las interacciones con el agua favorecerán el hinchamiento del hidrogel. Si el volumen de agua es bajo, éste será incapaz de penetrar dentro de la matriz polimérica e iniciar el proceso de hinchamiento. Debido a que el hidrogel tiene una estructura covalente, no puede deformarse indefinidamente y existe un grado máximo de hinchamiento. Cuando no existe entrecruzamiento de la red polimérica, el hinchamiento carece de límite y la incorporación progresiva de líquido puede conducir a la disolución del polímero.

En general, se puede afirmar que al aumentar el grado de hinchamiento del gel aumenta el tamaño de los poros que éste posee. Se ha observado que cuando un polímero está cargado negativamente aumenta su capacidad de hinchamiento y que la incorporación de grupos amino cuaternarios y de grupos neutros o básicos incrementan éste parámetro (Ulbrich y col. 1995; Yu y col. 1995). Así mismo, cuando los hidrogeles poseen grupos ácidos disociados presentan bajo grado de hinchamiento (Yu y col. 1995).

Cuando se ha alcanzado el equilibrio de hinchamiento, la fracción en peso de agua del hidrogel (Wf) puede expresarse mediante la siguiente relación:

$$Wf = \frac{(\text{peso húmedo} - \text{peso seco})}{\text{Peso húmedo}}$$

Cinética de hinchamiento

Este parámetro puede modificarse con la incorporación de una determinada sustancia que sea capaz de incrementar la fuerza osmótica del agua contenida en el hidrogel. Como consecuencia de esto, el hidrogel tiene máximas propiedades de hinchamiento cuando se incorporan moléculas o fármacos con estas características y en altas concentraciones (Gehrke y col. 1990).

Biocompatibilidad

Por ser los hidrogeles materiales suaves, flexibles, que presentan mínima irritación de los tejidos y que poseen carácter inerte (son resistentes a la digestión enzimática), son recomendados para ser utilizados como implantes. Tienen la ventaja de que no requieren ser removidos después de su utilización; pero eso no implica que su biocompatibilidad esté garantizada (Gehrke y col. 1990; Kim y col. 1992). Actualmente estos sistemas tienen múltiples aplicaciones: se han utilizado como lentes de contacto, como prótesis de uréter, conductos biliares y esófago; y como sistemas de liberación controlada de fármacos (Yu y col. 1995).

Existen geles de tipo biológico como es el caso del humor acuoso que rellena el interior del ojo, el material de la córnea y el fluido sinovial que lubrica las articulaciones (Tanaka 1981).

Permeabilidad

Este parámetro es directamente proporcional al grado de hinchamiento del gel que a su vez influye directamente en la liberación del fármaco (Gehrke y col. 1990). Teniendo en cuenta que el contenido de agua de un hidrogel depende de su estructura molecular, pueden diseñarse hidrogeles con diferente tamaño de poro y que, por lo tanto, permitan el paso selectivo de diferentes iones.

Los hidrogeles como sistemas de liberación de fármacos

Los hidrogeles pueden ser diseñados para liberar un fármaco en forma específica, predeterminada, predecible y por períodos de tiempo programados (Kim y col. 1992; Vakkalanka y col. 1996). Se ha estudiado que la cinética, duración y velocidad de liberación de fármacos desde los hidrogeles depende principalmente de las propiedades estructurales del polímero que lo constituye; siendo las propiedades que más influyen en la cinética de liberación de principios activos, el grado de cristalinidad, el tamaño de los cristales, el grado de hinchamiento y el peso molecular entre los cruzamientos (Iza y col. 1998).

Cuando la estructura polimérica de los hidrogeles es lineal se obtiene una rápida liberación de los solutos que contiene y la cantidad de soluto liberado, o en sus efectos de fármaco liberado, será función de la superficie de difusión del hidrogel y de la movilidad de las macromoléculas en su interior. Si se quiere retardar la liberación de un principio activo, se debe disminuir el tamaño promedio de los poros del hidrogel. Para esto existen diferentes alternativas: favorecer la unión covalente entre las cadenas poliméricas que lo constituyen, copolimerizar polímeros de diferente naturaleza (hidrofílicos e hidrofóbicos) o bien, emplear agentes entrecruzantes entre cadenas (Doelker 1987; Korsmeyer y col. 1983; Wood y col. 1982).

Existen dos métodos generales para la incorporación de fármacos en los hidrogeles. En uno de los métodos el hidrogel monomérico es mezclado con el fármaco, el iniciador y el entrecruzante (si se utiliza) y ocurre la polimerización con el fármaco dentro de la matriz. En el segundo método el hidrogel sintetizado se pone a hinchar en una solución de principio activo formándose un gel elástico que inmoviliza de una manera no uniforme dichas moléculas, y que posteriormente es capaz de entregarlo por simple difusión (Kim y col. 1992; Lee 1984). El último método tiene la ventaja respecto del primero de que el fármaco no está sometido al proceso de polimerización y de posterior limpieza del hidrogel que podrían alterar su estabilidad (Kim y col. 1992).

Los mecanismos por los cuales un fármaco puede liberarse desde un hidrogel, cuando éste es sintetizado en presencia del principio activo son fundamentalmente tres (fig. 14). En los primeros dos casos la velocidad de liberación del fármaco está afectada por su difusión y por la velocidad de degradación del hidrogel. En el tercer caso este parámetro está controlado únicamente por la velocidad de degradación de la matriz del hidrogel (Ulbrich y col. 1995).

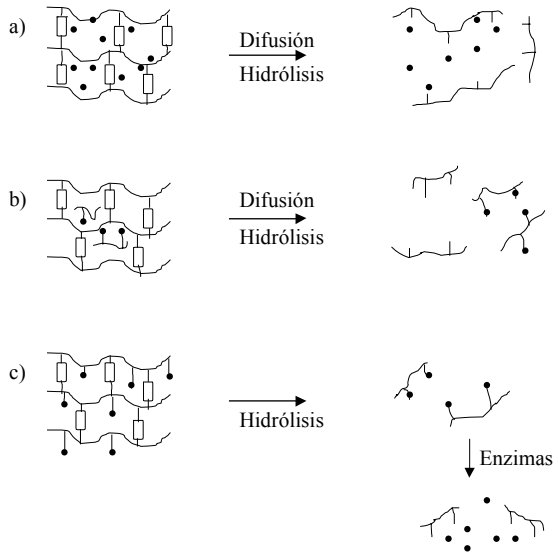


Figura 14: Esquema de la liberación de fármacos desde sistemas poliméricos (Ulbrich y col. 1995).

Aplicación de corriente eléctrica a los hidrogeles

Los hidrogeles son sistemas que contienen grandes cantidades de agua en su estructura, por lo que son buenos conductores de la corriente eléctrica. La presencia de grupos cargados permiten modular el grado de hinchamiento de estos sistemas, y por lo tanto también la cantidad de fármaco que quiere transportarse cuando se le aplica corriente eléctrica al sistema. Además, se ha observado que la fuerza eléctrica produce cambios en el hidrogel hidratado, haciéndolo más permeable y aumentando el tamaño de sus poros (Grodzinsky y col. 1990). Es importante considerar que a medida que el hidrogel se va deshidratando y se va acercando a su estado colapsado, el sistema opone mayor resistencia al paso de corriente eléctrica.

Parte V: Microemulsiones

Se denomina microemulsión a una dispersión estable de dos componentes inmiscibles, generalmente un compuesto orgánico y agua, estabilizados por un tercer componente de naturaleza anfolítica denominado surfactante. En ciertos casos estos sistemas requieren además de la presencia cosurfactante que ayude a la estabilización del sistema (Attwood 1994; Lawrence 1989; Shaw 1992; Warisnoicharoen y col. 2000).

A diferencia de las emulsiones, las microemulsiones son ópticamente transparentes y termodinámicamente estables, se forman sin necesidad de aplicar energía ni de someter al sistema a elevadas temperatura (Attwood, 1994; Lawrence, 1989; Radomska y col. 2000; Warisnoicharoen y col. 2000). Además, poseen un tamaño de gotas considerablemente inferior al de las emulsiones, siendo éste del orden de los 5-100 nm (Eccleston 1994; Malmsten 1998; Myers 1992). La gran estabilidad de estos sistemas, se debe entre otras cosas, al elevado porcentaje de surfactante que contienen.

El sistema de microemulsión que se forme, es decir, que se forme una microemulsión tipo O/W o tipo W/O, está determinado por varios factores, entre ellos el sistema de surfactante y cosurfactante empleado, la temperatura, la cantidad de electrolitos presentes, la naturaleza

química de la fase oleosa y de la proporción relativa entre sus componentes (Myers 1992). Así por ejemplo, cuando el surfactante empleado es más soluble en agua que en medio oleoso, se forman mayoritariamente microemulsiones del tipo O/W, y en cambio, cuando el surfactante es más soluble en el compuesto orgánico, mayor es la tendencia de formar microemulsiones del tipo W/O. En la figura 15 se representan las diferentes estructuras que pueden adoptar microemulsiones.

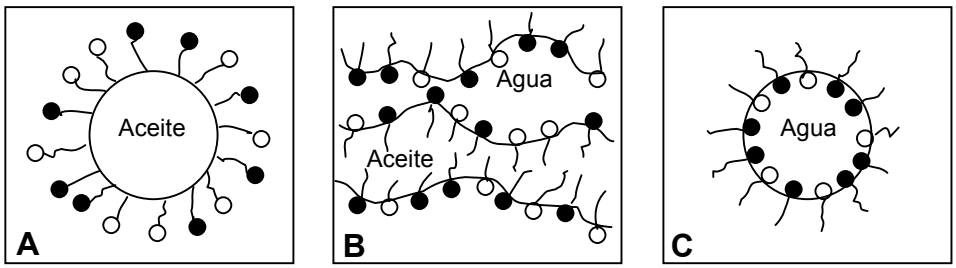


Figura 15: Representación de las diferentes estructuras de las microemulsiones. A) Microemulsiones del tipo O/W. B) Microemulsiones bicontínuas o con estructura irregular. C) Microemulsiones del tipo W/O (Attwood 1994; Eccleston 1994).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Componentes de una microemulsión

Surfactante

Los surfactantes son moléculas de naturaleza orgánica que presentan una parte de su estructura de naturaleza hidrófila (cabeza polar) y otra parte de naturaleza hidrófoba (cola apolar). Como son moléculas que presentan características polares y apolares a la vez, son capaces de distribuirse en la interfase aceite-agua consiguiendo con esto una disminución de la tensión interfacial del sistema (Attwood 1994). Estos compuestos se clasifican en: surfactantes no iónicos, iónicos (catiónicos o aniónicos) y anfóteros.

Con pequeñas cantidades de surfactantes, se logra disminuir considerablemente la tensión interfacial del sistema. Los valores de tensión interfacial W/O son normalmente del orden de unos 50 mN/m. Con la adición de un surfactante adecuado se consigue disminuir este valor a 10 mN/m lo que permite que el sistema experimente una emulsificación espontánea (Attwood 1994; Iglesias 1992; Liz-Marzán 1992).

A medida que se va adicionando surfactante a una mezcla de aceite y agua, la capa de interfase se va volviendo cada vez más compacta, reflejándose este hecho en una variación lineal y mucho más acusada de la tensión interfacial. La concentración a la que se produce esta variación se denomina *concentración de Szyszkowsky* (C_s). Cuando la concentración de

surfactante alcanza un cierto valor límite (generalmente 1 o 2 órdenes de magnitud superior a C_s), la tensión superficial adquiere de forma brusca un valor prácticamente constante. Esto es debido a que a partir de esta concentración límite, el surfactante añadido pasa en su totalidad al seno del agua, y las moléculas del mismo sufren un proceso de agregación a fin de reducir de forma efectiva el área de contacto entre sus partes hidrofóbicas y el agua. Estos agregados reciben el nombre de micelas y la concentración a la que tiene lugar su aparición se denomina concentración micelar crítica (CMC) (Adamson 1990; Liz-Marzán 1992; Shaw 1992). A concentraciones todavía más elevadas de surfactante dejan de formar micelas y aparecen fases de cristales líquidos o de geles. Incluso algunos surfactantes forman directamente cristales líquidos sin pasar por la formación de micelas.

Como en las microemulsiones el tamaño de las gotas es pequeño, la interfase aceite-agua es elevada y por lo tanto se requieren grandes cantidades de surfactante para que el sistema sea termodinámicamente estable (Attwood 1994; Radomska y col. 2000). Debido a esto, es importante considerar la toxicidad de estos compuestos cuando se emplean en preparados de uso farmacéutico (Osborne y col. 1991). En la tabla 2 se presentan algunos surfactantes que se utilizan en tecnología farmacéutica.

Naturaleza Iónica	Surfactante	HLB
No iónico	Monoestearato de propilenglicol	3,4
	Monoestearato de glicerilo	3,8
	Pluronic L122	4,0
	Span 80	4,3
	Span 60	4,7
	Span 40	6,5
	Span 20	8,6
	Tween 60	14,9
	Tween 80	15,0
	Pluronic L64	15,0
	Tween 40	15,6
	Tween 20	16,7
	Myrj 52	16,9
	Pluronic F68	17,0
Aniónico	Oleato de trietanolamina	12,0
	Lauril sulfato sódico	40,0
Catiónico	Compuestos de amonio cuaternario	18-20

Tabla 2: Surfactantes de uso común en tecnología farmacéutica (Iglesias 1992).

Cosurfactante

En ciertos casos, la disminución de la tensión interfacial provocada por la presencia de un surfactante no es suficiente para que se forme una microemulsión y se requiere de un cosurfactante para la formación y estabilización del sistema. Generalmente los cosurfactantes son alcoholes de cadenas hidrocarbonadas C_4 - C_6.

Estudio de formación de las microemulsiones

Las microemulsiones son elaboradas generalmente de manera empírica, ya que no existe una teoría adecuada que permita predecir su formación a partir de sus componentes. Estos sistemas son más difíciles de formular que una emulsión simple ya que su formación es altamente específica y están involucrados en ella, procesos de interacción espontánea entre sus constituyentes (Eccleston 1994).

BIBLIOTECA VIRTUAL

Para establecer las cantidades óptimas de cada componente de la microemulsión, es necesario elaborar un diagrama de fases del sistema, de manera de determinar las zonas de equilibrio de éste.

Como los diagramas de fases cuaternarios son difíciles de definir (se requiere demasiado tiempo para su elaboración) y de interpretar; en la práctica lo más usual es estudiar un diagrama ternario en donde dos de los cuatro componentes que forman una microemulsión, se mantienen fijos (usualmente surfactante y cosurfactante) (Eccleston 1994; Myers 1992).

Si bien, los diagramas ternarios y binarios son usados extensamente para determinar las condiciones de formación de una microemulsión, ellos no determinan la fase de equilibrio, el tipo de sistema que se forma (O/W, W/O, bicontínuo, etc.) ni las condiciones de máxima estabilidad del sistema. Ellos simplemente describen los límites entre una fase y otra e ilustran el efecto del cambio de concentración de uno de sus componentes ya sea en forma individual o colectiva (Eccleston 1994).

Clasificación de las microemulsiones

En la figura 16 se muestra un esquema de la clasificación de las microemulsiones realizada por Winsor (Eccleston 1994; Broze 1995; Winsor 1948).

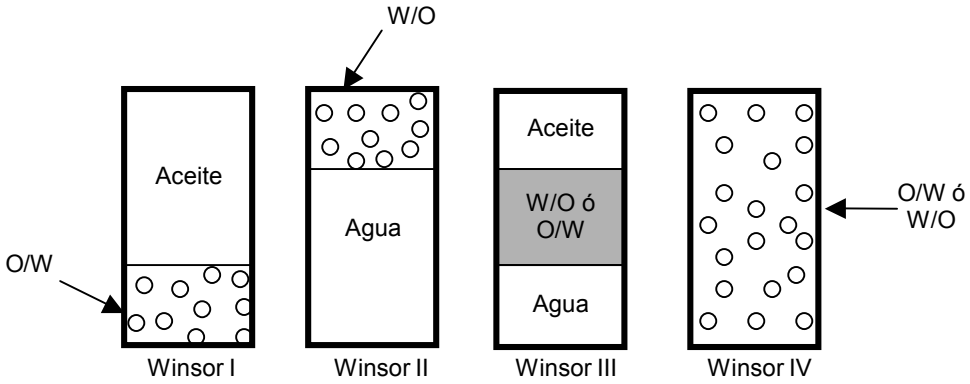


Figura 16: Esquema de la clasificación de las microemulsiones según Winsor (adaptación de Eccleston 1994).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Sistema Winsor tipo I:

Sistema en el que las gotas de compuesto orgánico se encuentran dispersas por las moléculas de surfactante en una fase acuosa formando una microemulsión O/W en equilibrio con una fase orgánica. Generalmente la microemulsión se sitúa en la fase inferior mientras que la orgánica es la fase superior, por eso también se denomina microemulsión inferior (MI).

Sistema Winsor tipo II:

En este sistema las microgotas de agua están dispersas en una fase orgánica continua formando una microemulsión W/O en equilibrio con una fase acuosa. En este caso la microemulsión se sitúa en la parte superior. Por ello también se denomina microemulsión superior (MS).

Sistema Winsor tipo III:

En este caso la microemulsión puede estar formada por una dispersión de agua en un medio orgánico (W/O) o por una dispersión del compuesto orgánico en un medio acuoso (O/W). Esta microemulsión está en equilibrio con una fase acuosa (inferior) y una fase orgánica (superior), encontrándose la microemulsión en la zona intermedia por lo que se denomina también microemulsión intermedia (MM).

Sistema Winsor IV:

En este sistema la microemulsión se encuentra como una única fase. Estructuralmente puede ser una microemulsión O/W o una W/O. Este es el tipo de microemulsión de mayor interés debido tanto a sus propiedades físico-químicas como a sus aplicaciones.

Elaboración de las microemulsiones

Las microemulsiones son fáciles de elaborar. Se forman espontáneamente por lo que no requieren de un tipo de maquinaria especial para su síntesis. Incluso en ciertos casos, ni siquiera es necesario adicionar calor al sistema.

El método usual de preparación de las microemulsiones consiste en disolver el surfactante en el aceite y añadirlo a la solución de agua con agitación. La solución se vuelve traslúcida a los pocos segundos. Cuando se utilizan cosurfactante no iónicos, éstos se suelen disolver primero en el agua. Sin embargo, el orden de mezcla de los componentes no es considerado crítico en el proceso de formación de una microemulsión (Eccleston 1994).

Aplicaciones de las microemulsiones

Las microemulsiones han sido estudiadas para su aplicación farmacéutica. Se ha observado que estos sistemas pueden provocar un aumento de la solubilidad de ciertos fármacos, lo que es importante de considerar a la hora de formular un preparado farmacéutico de un principio activo poco soluble (Baroli y col. 2000; Trotta y col. 1997; Thacharodi y col. 1994).

Para modular la liberación de un fármaco desde una microemulsión es necesario considerar ciertos parámetros como: proporción de cada fase, tamaño de las gotas, distribución del fármaco en las diferentes fases de la microemulsión y velocidad de difusión del fármaco desde cada una de las fases (Trotta y col. 1994)

Se ha estudiado el uso de las microemulsiones para diferentes vías de administración: oral, parenteral, ocular y transdérmica. Describiremos brevemente el uso de las microemulsiones por vía tópica debido a que en este trabajo de investigación esta es la vía de administración empleada.

Empleo de las microemulsiones por vía tópica

Se ha visto que las microemulsiones incrementan la penetración transdérmica local o sistémica de un fármaco por diferentes mecanismos. Primero, tienen la capacidad de solubilizar un gran número de moléculas. Segundo, provocan un cambio en la actividad termodinámica de los fármacos que contienen que modifica su coeficiente de reparto, favoreciendo así su penetración hacia el estrato córneo. Y por último, los surfactantes que las constituyen, reducen la función barrera que posee el estrato córneo. Esta última función puede ser más o menos importante en dependencia de la naturaleza del surfactante empleado (Baroli y col. 2000; Delgado-Charro y col. 1997; Osborne y col. 1991). Como consecuencia de lo observado anteriormente, las microemulsiones se han empleado como promotores de la absorción percutánea de ciertos fármacos (ej: propanolol, doxirubicina) (Eccleston 1994; Osborne y col. 1991; Thacharodi y col. 1994).

Uno de los problemas asociados al uso de microemulsiones por vía tópica, es la dificultad en su aplicación, ya que son sistemas que presentan baja viscosidad. Se ha estudiado la incorporación de ciertas sustancias (ejemplo Carbopol 934) para aumentar la viscosidad de estos sistemas, observándose resultados satisfactorios (Attwood 1994).

El transporte de fármacos desde microemulsiones, ya sea del tipo O/W ó del tipo W/O, ha mostrado ser más eficiente que el transporte desde otros vehículos tópicos, como pueden ser los geles, las lociones o las emulsiones. Una de las razones que permite explicar este hecho, es que las microemulsiones son capaces de disolver grandes cantidades de principio activo y por lo tanto actúan como un buen reservorio de fármacos. Por esta razón, en las microemulsiones se mantiene prácticamente constante la cantidad de fármaco presente en la fase continua y por lo tanto, se logra así una liberación de pseudo orden cero. Además como el fármaco que contienen se encuentra disuelto y no suspendido, la absorción del principio activo es inmediata (Eccleston 1994; Gasco 1997).

Así también se ha estudiado la incorporación de fármacos lipofílicos en la fase interna de una microemulsión O/W, observándose como una técnica ventajosa para la administración tópica de principios activos con estas características. El uso de emulsiones O/W con estos propósitos ya es una técnica ampliamente estudiada (Ktistis y col. 1998).

Si se quisieran utilizar estos vehículos de administración tópica asociadas a otras técnicas de promoción de la penetración transdérmica se podría pensar en un sinergismo que favoreciera aún más la penetración de ciertos principios activos a través de la piel. Así por ejemplo, las microemulsiones que poseen fase externa acuosa, podrían ser empleadas como vehículos para la administración iontoforética de principios activos, ya que el agua es un buen conductor de la corriente eléctrica.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Materiales y Métodos

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

1. Estudio de difusión pasiva de soluciones de MTX

Se comenzó el estudio de difusión de MTX a través de la piel empleando soluciones de este fármaco como vehículos para su administración transdérmica.

1.1 Montaje del experimento

Preparación de la piel:

La piel empleada para los estudios de difusión transdérmica, fue extraída de diferentes zonas (cuello, pata trasera, pata delantera, parte dorsal) de un cerdo de 2 - 3 días de edad sacrificado mediante dislocación cervical. Se utilizaron cerdos machos y hembras.

La piel una vez extraída del animal, se congeló a –20ºC. Aproximadamente 12 horas antes de cada experimento, la piel se descongeló, se limpió de los posibles restos de músculo y tejido subcutáneo que pudiera quedar adherido a ella y se afeitó cuidadosamente. Finalmente se cortó y se colocó entre los compartimentos donante y receptor de la célula de difusión, situándose la epidermis cutánea hacia la solución donante.

En cada experimento no se utilizó una única zona de la piel, de esta manera se pretendió evitar que los resultados estuvieran condicionados a la permeabilidad característica de cada zona cutánea.

Células de difusión empleadas y condiciones del ensayo:

Se emplearon células de difusión pasiva vertical (fig. 17, área = 4,15 cm^2) (Laboratory Glass Apparatus Inc. USA) termostatizadas a 37ºC mediante un baño de agua (Selecta, Digiterm España) y protegidas de la luz mediante papel de aluminio.

La solución receptora se mantuvo en agitación durante todo el tiempo de ensayo (agitador Variomag, Electronicruhrer multipoint HP).

Solución donante:

Se pesaron exactamente alrededor de (2,0; 2,5; 2,8 y 3,0 mg/mL) de MTX (Sigma-Aldrich química) y se diluyeron en una solución de buffer Hepes 25 mM (Sigma-Aldrich química) + NaCl 50 mM (Panreac química S.A.); ajustada a pH 7,4 mediante la adición de NaOH (Panreac química S.A.) 0,5M. Para cada experimento se emplearon 3 mL de dicha solución.

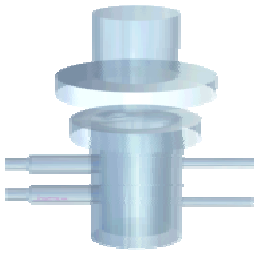


Figura 17: Células de difusión pasiva vertical.

Solución receptora:

Se preparó una solución de buffer Hepes 25 mM + NaCl 154 mM; ajustada a pH 7,4 mediante la adición de NaOH 0,5M. Para cada experimento se emplearon 4 mL de dicha solución.

Toma de muestras:

Se cuantificó la cantidad de MTX en la solución receptora a las 6 y 24 horas de estudio y la cantidad de MTX retenido en la piel una vez finalizado dicho estudio de difusión.

1.2 <u>Cuantificación del MTX</u>

Condiciones del análisis:

Para la cuantificación del MTX se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello se utilizó un cromatógrafo líquido Merck Hitachi, con una bomba modelo L-6200ª, un detector de diodos modelo L-4500, un inyector modelo AS-4000ª y una interfase modelo D-6000.

Las condiciones cromatográficas de cuantificación fueron las siguientes (Lawson y col. 1981):

- Fase móvil: Na_3P0_4 (Prolabo) 0,1 M (pH 6.7)/Metanol (Merck) 75:25.
- Columna: Lichrospher®100 RP-18 (5 µm), Merck.
- Precolumna: Lichrospher®100 RP-18 (5 µm), Merck.
- Flujo: 1 mL/min.
- Temperatura: 35ºC.
- Longitud de onda: 305 nm.
- Volumen de inyección: 20 a 100 µL.

Validación del método de cuantificación del MTX por HPLC:

Se realizaron 2 curvas de calibración en días diferentes. Para cada una de las curvas se prepararon 2 soluciones madres que luego se diluyeron adecuadamente para obtener un rango de concentraciones adecuado (2,967 - 88,75 µg/mL). Cada curva se hizo con 8 puntos.

Cada muestra se analizó por triplicado, calculándose la media y la desviación estándar para cada una de ellas.

Para cada recta se calculó la linealidad (reflejada en el valor r y por el coeficiente de variación del factor f correspondiente al cociente entre el área y la cantidad inyectada) y la proporcionalidad. Se consideró lineal una recta con un valor de r = 0,999 y con un C.V. menor al 5%. La proporcionalidad se determinó verificando si el intervalo de error del valor A (punto de intersección en el eje de las ordenadas) comprendiera el valor cero.

Finalmente se comprobó que las dos rectas eran equivalentes verificando si los límites de confianza de una estaban incluidos en los límites de confianza de la otra.

Curva de calibración:

La curva de calibración se muestra en el gráfico 1.

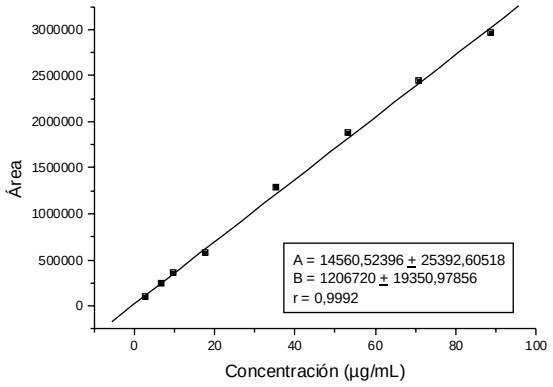


Gráfico 1: Curva de calibración de MTX empleando cromatografía líquida de alta resolución. Fase móvil: Na_3PO_4 0,1M / Metanol 75:25. Longitud de onda: 305 nm.

Preparación de las muestras:

Por trabajar con concentraciones de MTX muy pequeñas, las muestras obtenidas durante el estudio de difusión no se pudieron cuantificar directamente y requirieron ser concentradas. Además, por emplearse como método de cuantificación la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), las muestras debieron tratarse según el procedimiento que se detalla a continuación.

Solución receptora:

Se tomó todo el volumen de la solución receptora, se filtró mediante filtros de difluoruro de polivinilo (Millipore SLHVO13NL) de 0,45 µm y se evaporó a sequedad en estufa de vacío (Heraeus®) a 50ºC.

Posteriormente la muestra se diluyó en 1,5 mL de fase móvil y se centrífugo (centrífuga Sigma®2-15) por 10 minutos a 11000 r.p.m. El líquido sobrenadante se filtró empleando filtros de difluoruro de polivinilo de 0,45 µm y finalmente se cuantificó el MTX mediante HPLC.

MTX absorbido en la piel:

La piel se lavó dos veces con un volumen de 3 mL de etanol (Prolabus). El etanol de lavado se eliminó y la piel sin restos de MTX en su superficie, se introdujo en un recipiente que contenía 10 mL de dicho disolvente. El sistema se cerró, se protegió de la luz y se dejó en reposo durante 48 horas.

El etanol utilizado como líquido extractor se filtró mediante papel filtro (para separarlo de los restos de pelo y de piel) y se llevó a sequedad en estufa a vacío (50ºC).

Posteriormente la muestra se diluyó en 1,5 mL de fase móvil y se centrifugó por 10 minutos a 11000 r.p.m. El líquido sobrenadante se filtró empleando filtros de difluoruro de polivinilo de 0,45 µm para luego cuantificarse el MTX mediante HPLC

1.3 <u>Análisis de los datos</u>

Para cada uno de los experimentos realizados se contó con un mínimo de 5 - 6 replicados calculándose el promedio y la desviación estándar. El análisis estadístico de los diferentes experimentos se hizo mediante ANOVA de una vía utilizando un nivel de probabilidades del 0,05%. En el caso de comparaciones múltiples, se emplearon los tests de Student-Newman-Keuls y de Dunn's.

2. Estudio de iontoforesis de soluciones de MTX

Estos estudios se realizaron con el objetivo de determinar si el paso de corriente eléctrica a través de la piel es un método adecuado para aumentar la penetración transdérmica de MTX.

Posteriormente se estudió la influencia de ciertos factores como la cantidad de corriente eléctrica aplicada, la fuerza iónica (modificada mediante la incorporación de NaCl a la solución donante), el pH y la concentración de MTX; en la penetración iontoforética de MTX.

2.1 Determinación de la solubilidad del MTX en las diferentes soluciones donantes empleadas

Se prepararon 5 soluciones diferentes.

- Hepes 25 mM, pH 7,4
- Hepes 25 mM + NaCl 50 mM; pH 7,4
- Hepes 25 mM + NaCl 100 mM; pH 7,4
- Hepes 25 mM + NaCl 50 mM; pH 5,0
- Hepes 25 mM + NaCl 50 mM; pH 4,0

Para toda las soluciones estudiadas se pesó igual cantidad de buffer Hepes (equivalente a 25 mM) y una cantidad de NaCl variable (equivalente a 0, 50 ó 100 mM). Se ajustó el pH mediante NaOH 0,5 M para las soluciones de pH 7,4 y con HCL 0,1 M para las soluciones restantes.

Se tomaron 10 mL de cada solución y se añadió MTX en exceso de manera de tener una solución sobresaturada. Se mantuvo al sistema a temperatura ambiente, protegido de la luz y bajo agitación magnética durante 24 horas. Luego se sacó una alícuota de cada solución y se centrífugo durante 10 minutos a 11000 r.p.m. Posteriormente se filtró el líquido sobrenadante mediante filtros de difluoruro de polivinilo de 0,45 µm, y se cuantificó la cantidad de MTX disuelto mediante HPLC (método descrito en materiales y métodos 1.2).

2.2 Montaje del experimento

Preparación de la piel:

La piel utilizada fue tratada de igual manera que en el materiales y métodos 1.1.

Células de difusión empleadas y condiciones del ensayo:

Se utilizaron células de difusión lado a lado (fig. 18, área = 0,78 cm^2) (Crown Bio Scientific Inc. USA), manteniéndose el sistema (tanto solución receptora como solución donante) en agitación y protegido de la luz durante todo el experimento.

Se utilizó corriente directa y constante (0,5 ó 0,25 mA/cm^2) generada mediante un equipo Kepco Power Supply (USA), midiéndose el voltaje del sistema y de cada célula de difusión durante todo el experimento (TES 2360LCR).

Como electrodos se utilizaron el par Agº (99%, 1 mm diámetro, Sigma-Aldrich química) / AgCl (99%, Sigma-Aldrich química), preparados mediante el procedimiento descrito por Green (Green y col. 1991).

Se emplearon diferentes temperaturas para los diferentes ensayos de iontoforesis realizados. Los estudios de iontoforesis que se realizaron con el fin de compararlos con los estudios de difusión pasiva de MTX se empleó una temperatura de 37ºC, utilizando para ello un baño de agua. Para los estudios que se realizaron con el fin de caracterizar el proceso de paso de MTX a través de la piel con la aplicación de un campo eléctrico, se empleó la temperatura ambiente.

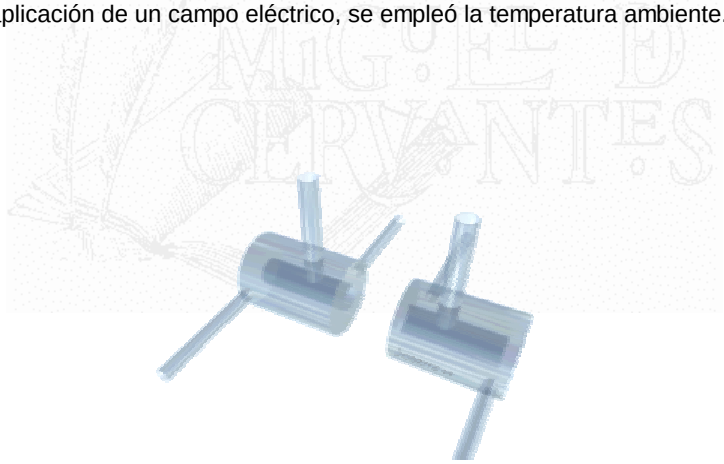


Figura 18: Células de difusión lado a lado.

Solución donante:

Estudios a pH 7,4

Se pesaron exactamente alrededor de 2,0 ó 3,0 mg/mL de MTX y se diluyeron en una solución de buffer Hepes 25 mM + NaCl en diferentes concentraciones (0, 50 o 100 mM), ajustada a pH 7,4 mediante la adición de NaOH 0,5 M. Para cada experimento se emplearon 3 mL de dicha solución.

En estos estudios, la solución donante se introdujo en el compartimento catódico.

Estudios a pH 4,0 y 5,0

Se pesaron exactamente alrededor de 0,072 mg/mL de MTX para la disolución de pH 4,0 y 0,034 mg/mL de MTX para la disolución de pH 5,0. En ambos casos, la cantidad de MTX empleada corresponde al 80% del valor de la solubilidad del MTX en dicha solución.

Se diluyó el fármaco en una solución de buffer Hepes 25 mM + NaCl 50 mM ajustada a los respectivos pH mediante la adición de HCl 0,1 M. Para cada experimento se emplearon 3 mL de cada solución.

En estos estudios, la solución donante se introdujo en el compartimento anódico.

Solución receptora:

Se preparó una solución de buffer Hepes 25 mM + NaCl 154 mM; ajustada a pH 7,4 mediante la adición de NaOH 0,5 M. Para cada experimento se emplearon 4 mL de dicha solución.

Para todos los estudios de iontoforesis realizados se empleó la misma solución receptora. Lo que varío fue que en los estudios a pH 7,4, la solución receptora se colocó en el compartimento anódico y en los estudios a pH 4,0 y 5,0 se colocó en el compartimento cátodico.

Toma de muestras:

Se cuantificó la cantidad de MTX en la solución receptora a las 4, 8 y 24 horas para aquellos estudios que se querían comparar con la difusión pasiva del MTX. Para el resto de los estudios se cuantificó la cantidad de MTX en la solución receptora a las 4, 7 y 10 horas.

También se cuantificó la cantidad de MTX retenido en la piel una vez finalizado cada estudio de difusión.

2.3 Cuantificación del MTX

Las condiciones del análisis y la preparación de las muestras se realizaron de igual manera que en materiales y métodos 1.2.

2.4 Análisis de los datos

Los datos fueron tratados de igual manera que en materiales y métodos 1.3.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

3. Síntesis y caracterización de los hidrogeles

3.1 Síntesis de los hidrogeles

Se utilizaron 2 monómeros para la síntesis de los hidrogeles: acrilamida (>99%, Merck-Schuchardt) y ácido acrílico (>99%, Fluka) (fig. 19). Como agente entrecruzante se empleó N,N'-metilenbisacrilamida (>98%, Fluka) y como iniciador de la reacción V50 (2-2'- azobis (2-aminopropano) dihidroclorato (Wako Chemicals, USA).

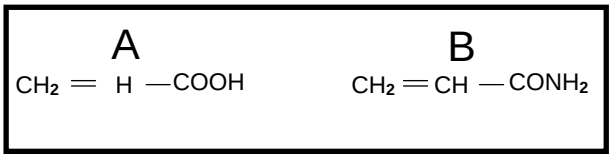


Figura 19: Estructura química de los monómeros empleados para la síntesis de los hidrogeles. A) ácido acrílico. B) acrilamida.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Síntesis de hidrogeles de ácido acrílico:

Se pesaron exactamente alrededor de 0,02g. de N,N' - metilenbisacrilamida, se colocaron en un tubo de ensayo y se disolvieron en 8 mL de agua destilada. Luego se adicionaron 3 g de ácido acrílico y se burbujeó el sistema con N_2 durante 10 minutos. En otro tubo, se colocaron 0,03 g de V50 disueltos en 2 mL de agua destilada burbujeándose el sistema con N_2 durante 2 minutos. Luego se vertió el tubo con el iniciador disuelto sobre el tubo con el monómero. Se selló el sistema con un septum y se burbujeó con N_2 durante 2 minutos. Posteriormente se colocó el tubo en un baño de agua fría para evitar la formación de burbujas producto del calor generado durante la polimerización. Finalmente se retiró el hidrogel del tubo que lo contenía y se puso a hinchar en agua destilada hasta asegurar su máximo hinchamiento (1 semana). En el período de hinchamiento de los hidrogeles, se cambió constantemente el agua destilada que estaba en contacto con ellos. De este modo, se eliminaron las posibles moléculas de monómeros que quedaron sin reaccionar y los restos de otros productos de reacción (Katime y col. 1999; Katime y col. 2000).

Síntesis de hidrogeles de ácido acrílico: acrilamida 1:1:

Se pesaron exactamente alrededor de 0,02g. de N,N' - metilenbisacrilamida y 1,5 g de acrilamida, se colocaron en un tubo de ensayo y se disolvieron en 8 mL de agua destilada. Luego

se adicionaron 1,5 g de ácido acrílico y se burbujeó el sistema con N_2 durante 10 minutos. En otro tubo, se colocaron 0,03 g de V50 disueltos en 2 mL de agua destilada burbujeándose el sistema con N_2 durante 2 minutos. Luego se vertió el tubo con el iniciador disuelto sobre el tubo con los monómeros. Se selló el sistema con un septum y se burbujeó con N_2 durante 2 minutos. El tratamiento posterior de los hidrogeles así sintetizados se realizó de igual manera que el descrito para los hidrogeles de ácido acrílico (Katime y col. 1999; Katime y col. 2000).

Secado y obtención de pastillas de hidrogel:

Los hidrogeles una vez hinchados, se cortaron obteniéndose así pequeños cilindros. Se secaron a temperatura ambiente hasta completa deshidratación y finalmente se limaron hasta obtener unos hidrogeles de superficie completamente lisa y homogénea.

3.2 Estudios de hinchamiento

Estos estudios tienen como finalidad determinar el aumento de tamaño y de peso de los xerogeles reticulados y el tiempo en que demoran en alcanzar su grado de hinchamiento máximo.

Luego se estudió el grado de hinchamiento de los xerogeles de ácido acrílico y ácido acrílico: acrilamida 1:1 a diferentes pH.

Para esto se puso cada hidrogel (n = 6) en contacto con 30 mL de una solución tampón de Hepes 25 mM de diferentes pH: 6,0; 7,4 y 8,0 (pHmetro Crison, Micro pH 2001).

Cada hidrogel se estudió en forma individual y para esto se colocó cada uno en forma individual en un recipiente cerrado y de dimensiones tales que no hubiera impedimento físico para su hinchamiento.

El estudio se realizó a temperatura constante equivalente a 37 $\pm$ 1ºC (baño termostatizado Unitronic 320, OR; Selecta).

Se tomaron muestras a las 0 - 0,25 - 0,5 - 0,75 - 1 - 1,5 - 2 - 2,5 - 3 - 5 - 7 - 8 - 9 - 24 - 32 - 48 - 72 - 96 - 144 y 168 horas.

A los diferentes tiempos de muestreo, se determinó el grado de hinchamiento (Gh) del hidrogel empleando para ello una balanza analítica (Denver Instruments AA-200).

$$Gh = \frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso seco}}$$

Para determinar el porcentaje de aumento de volumen y de altura de los hidrogeles se realizaron las medidas de sus dimensiones iniciales (micrómetro Mitutuyo, MDC 25p; Japan) y finales (regla graduada).

Finalmente, se estudió el efecto de la adición de NaCl en la cinética de hinchamiento del hidrogel. Para esto los hidrogeles se hincharon en una solución de Hepes 25 mM + NaCl 154 mM; pH 7,4. La secuencia de toma de muestras y el cálculo del grado de hinchamiento se realizó de igual manera que para los estudios de hinchamiento sin la presencia de NaCl.

Análisis de los datos:

Los datos fueron tratados de igual manera que en materiales y métodos 1.3.

3.3 Determinación del pH en el interior del hidrogel

A los hidrogeles, una vez alcanzado el equilibrio de hinchamiento en las diferentes soluciones estudiadas, se les midió el pH en su interior. Para ello se cortaron por la mitad y se midió este parámetro mediante papel pH ya que por la consistencia de estos sistemas, no es posible medirlo en forma más exacta.

3.4 Estudios de captación de MTX en los hidrogeles

Protocolo del experimento:

Se colocaron 6 xerogeles de cada tipo (ácido acrílico y ácido acrílico/ acrilamida 1:1) a hinchar individualmente y protegidos de la luz en un recipiente cerrado, que contenía 30 mL de una solución de 61,14 µg/mL de MTX en Hepes 25 mM + NaCl 154 mM, ajustada a pH 7,4 mediante la adición de NaOH 0,5 M.

El estudio se realizó a temperatura ambiente y se consideró que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de hinchamiento eran las 168 horas.

Al iniciar y al finalizar el estudio cada hidrogel se pesó y se determinaron sus dimensiones (altura y diámetro).

Se cuantificó el volumen de la solución que quedó en cada recipiente luego de completado el proceso de hinchamiento de los hidrogeles y se valoró dicha solución. De esta forma, se pudo comparar la cantidad teórica de MTX captado por estos sistemas y la cantidad real encontrada en

su interior, de esta manera se pudo estudiar si la penetración de la solución de MTX dentro del hidrogel es homogénea o si se concentra en uno de sus componentes (solvente o soluto).

Posteriormente, cada hidrogel se trasladó a un recipiente que contenía 40 mL de Hepes 25 mM (pH 7,4) dejándose durante168 horas a temperatura ambiente y protegidos de la luz. En esta parte del estudio se quería determinar si el MTX que quedaba atrapado en la red polimérica de los hidrogeles era capaz de ser posteriormente cedido al medio.

Preparación de las muestras:

Soluciones de carga de MTX después de finalizado el estudio de captación

Se tomaron 5 mL de cada solución y se evaporaron a sequedad en estufa a vacío a 50ºC. Posteriormente la muestra se diluyó en 3 mL de fase móvil, se filtró empleando filtros de acetato de celulosa de 0,45 µm y finalmente se cuantificó el MTX mediante HPLC (método descrito en materiales y métodos 1.2).

Soluciones receptoras del MTX contenido en los hidrogeles

El tratamiento de las muestras fue realizado de igual manera que para las soluciones de carga de MTX, con la única diferencia que se tomó un volumen inicial de solución de 15 mL.

Análisis de los datos:

Los datos fueron tratados de igual manera que para los estudios de hinchamiento (materiales y métodos 3.2).

3.5 Estudios de distribución de MTX dentro de los hidrogeles

Protocolo del experimento:

Para estudiar si la distribución del MTX dentro del hidrogel, uno de los 6 hidrogeles utilizados e hinchados en la solución de MTX, se dividió en 4 partes.

Cada porción de hidrogel debidamente pesada, se introdujo durante 168 horas en un recipiente cerrado y protegido de la luz, que contenía 15 mL de solución de Hepes 25 mM, pH 7,4.

Preparación de las muestras:

Soluciones receptoras del MTX contenido en los hidrogeles

El tratamiento de las muestras fue realizado de igual manera que para las soluciones de carga de MTX (materiales y métodos 3.4), con la única diferencia que se tomó un volumen inicial de solución de 9 mL.

Análisis de los datos:

Los datos fueron tratados de igual manera que en materiales y métodos 1.3.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

4. Paso transdérmico de metotrexato a partir de hidrogeles utilizando la técnica de iontoforesis

4.1 Montaje del experimento

Incorporación del MTX en el interior de los hidrogeles:

Para los dos tipos de hidrogeles estudiados (ácido acrílico y ácido acrílico/ acrilamida 1:1) la incorporación del MTX en su interior se realizó de igual manera.

Se emplearon 6 hidrogeles para cada experimento. Cada uno de ellos se puso en contacto con 30 mL de una solución tampón Hepes 25 mM + NaCl 50 mM que contenía 120 ó 200 µg/mL de MTX. Se depositaron en un recipiente cerrado y protegido de la luz durante 1 semana (tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de hinchamiento de los hidrogeles).

Se determinó la cantidad teórica de MTX que contenía cada porción de hidrogel. Para ello se empleó una balanza analítica y se midieron las dimensiones iniciales y finales de los hidrogeles. De esta forma, por diferencia de peso y conociendo la densidad de la solución de carga, se pudo determinar qué cantidad de solución incorporaban estos sistemas y por lo tanto, cuanto MTX quedaba en su interior.

Preparación de la piel:

La piel utilizada para estos experimentos siguió la misma metodología explicada en materiales y métodos 1.1. La única diferencia fue que para estos estudios, como el vehículo de administración del MTX es de características semisólidas, fue necesario humectar la epidermis con unas gotas de solución receptora.

Células de difusión empleadas y condiciones del ensayo:

Se utilizaron células de difusión pasiva vertical. Se mantuvo el sistema protegido de la luz y la solución receptora se mantuvo en agitación durante todo el tiempo de ensayo. Se trabajó a temperatura ambiente.

Se utilizó corriente directa y constante equivalente a 0,5 mA/cm^2, midiéndose el voltaje del sistema y de cada célula de difusión durante todo el tiempo del experimento.

Como ánodo se empleó un alambre de plata (99,99% pureza, de 1 mm diámetro, Sigma-Aldrich Química S.A.) que se introdujo en una de las salidas del compartimento receptor. Como cátodo se utilizó un disco de plata recubierto en cloruro de plata (Green y col. 1991) del mismo diámetro del hidrogel empleado.

Compartimento donante:

En estos estudios se utilizó el hidrogel cargado con MTX como vehículo donante.

Para esto, se cortó el hidrogel cargado con el fármaco con un sacabocados de 1,8 cm de diámetro y se puso sobre la epidermis.

Compartimento receptor:

Como solución receptora se empleó buffer Hepes 25 mM + NaCl 154 mM, ajustado a pH 7,4 con la adición de NaOH 0,5M. Para cada experimento se emplearon 4 mL de dicha solución.

Toma de muetras:

Se cuantificó la cantidad de MTX en la solución receptora a las 10 horas y la cantidad de MTX retenido en la piel luego de finalizado el estudio.

4.2 Cuantificación del MTX

Condiciones del análisis:

Para la cuantificación del MTX se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó un cromatógrafo líquido Merck Hitachi, con una bomba modelo L-6200ª, un detector de diodos modelo L-4500, un inyector modelo AS-4000ª y una interfase modelo D-6000.

Las condiciones cromatográficas de cuantificación fueron las siguientes (Cercós-Fortea y col. 1997):

- Fase móvil: ácido fosfórico 0,05M (98%, Sigma-Aldrich química) (pH 2,7)/ acetonitrilo (Merck) 84:16.
- Columna: Lichrospher®100 RP-18 (5 µm), Merck.
- Precolumna: Lichrospher®100 RP-18 (5 µm), Merck.
- Flujo: 1 mL/min.
- Temperatura: 35ºC.
- Longitud de onda: 303 nm.
- Volumen de inyección: 100 µL.

Validación del método de cuantificación del MTX por HPLC:

Se realizaron 2 curvas de calibración en días diferentes. Para cada una de las curvas se prepararon 2 soluciones madres que luego se diluyeron adecuadamente para obtener un rango de concentraciones adecuado (2,79 - 88,6 µg/mL). Cada curva se hizo con 8 puntos.

La validación de la metodología de cuantificación empleada se realizó de igual manera que en el materiales y métodos 1.2.

Curva de calibración:

La curva de calibración se muestra en el gráfico 2.

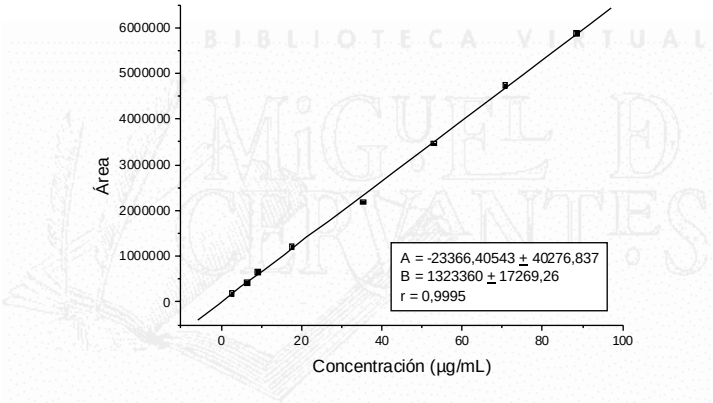


Gráfico 2: Curva de calibración de MTX empleando cromatografía líquida de alta resolución. Fase móvil: ácido fosfórico 0,05M / acetonitrilo 84:16. Longitud de onda: 303 nm.

Preparación de las muestras:

La concentración de las muestras (tanto para solución receptora como para el MTX retenido en la piel), se realizó de igual manera que el descrito en materiales y métodos 1.2. La única diferencia para estos ensayos fue que el volumen de reconstitución de la muestra fue de 1 mL de fase móvil y se empleó la metodología de cuantificación de este fármaco que se describe en materiales y métodos 4.2.

4.3 <u>Análisis de los datos</u>

Los datos fueron tratados de igual manera que en materiales y métodos 1.3.

5. Microemulsiones

5.1 Preparación de las microemulsiones

Se utilizaron 2 tipos de microemulsiones. Una de ellas constituida por el sistema Labrasol®: Plurol® isoesteárico (S+C)/ oleato de etilo (O)/ solución salina (W) (Delgado-Charro y col. 1997); y la otra constituida por el sistema: Tween 80: Span 80: 1,2-octanodiol (S+C)/ miristato de isopropilo (O)/ agua (W) (Baroli y col. 2000).

Sistema labrasol:plurol isoesteárico (S+C)/ oleato de etilo (O)/ solución salina (W):

Como surfactante de este sistema se utilizó Labrasol® (Gatefossé, España), que es el nombre comercial que recibe una mezcla de glicéridos y poliglícidos de los ácidos caprílico (C_8) y cáprico (C_{10}) que actúan como surfactante no iónico de cadena larga y de muy baja toxicidad. Como cosurfactante se utilizó Plurol® isoesteárico (Gatefossé, España) que es el nombre comercial que recibe el isostearato de poliglicerol. Como fase oleosa se utilizó oleato de etilo (70%, Sigma-Aldrich química) y para la elaboración de la solución salina 134 mM se empleó NaCl ajustada a pH 7,4 mediante una solución de NaOH (Prolabo, grado p.a.) 0,5 M.

Se elaboraron 5 microemulsiones utilizando este sistema. La proporción de cada uno de los componentes fue escogida según el diagrama de fases representado en la figura 20 de manera de obtener en todos los casos microemulsiones estables.

Las proporciones de cada uno de los componentes de las 5 microemulsiones seleccionadas se muestran en la tabla 3.

Abreviatura	% Oleato de Etilo	% Labrasol: Plurol (3:1)	% Solución salina (pH 7,4)
OE1	10	80	10
OE2	10	50	40
OE3	10	40	50
OE4	20	55	25
OE5	30	44	26

Tabla 3: Proporción de los componentes de las microemulsiones del sistema Labrasol®: Plurol® isoesteárico (S+C) /oleato de etilo (O) / solución salina (W) elaboradas.

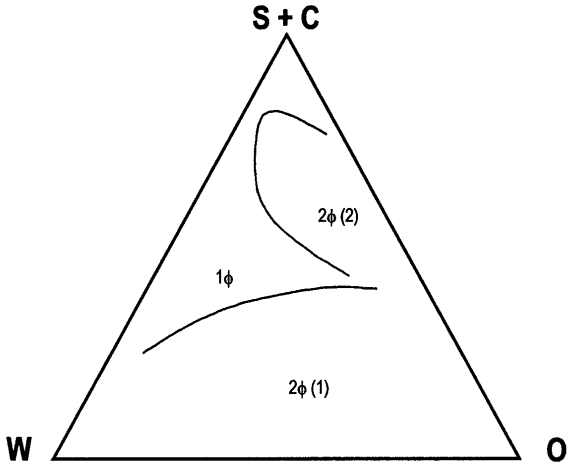


Figura 20: Diagrama de fases del sistema Labrasol®: Plurol® isoesteárico (S+C) /oleato de etilo (O) / solución salina (W). 1ϕ = microemulsión, 2ϕ = 2 fases.

Inicialmente se preparó la mezcla Labrasol®: Plurol® isosteárico en una relación volumétrica igual a 3:1 y la solución salina de concentración 134 mM (ajustada a pH 7,4 mediante NaOH 0,5M).

Para la preparación de las microemulsiones se midió el volumen de cada componente en una probeta graduada y luego se agitó el sistema hasta completa homogeneización. Posteriormente se introdujo el sistema en un baño de agua a 37ºC hasta su estabilización.

Sistema Tween 80: Span 80: 1,2-octanodiol (S+C)/ miristato de isopropilo (O)/ agua (W):

Para este sistema se escogieron como mezcla de surfactante/ cofurfactante a los componentes Tween 80 (Sigma-Aldrich química) : Span 80 (Sigma-Aldrich química): 1,2-octanodiol (98%, Sigma-Aldrich química) en una relación en peso de 3:1:1,2. Como fase oleosa se utilizó miristato de isopropilo (98%, Sima-Aldrch química) y como fase acuosa agua destilada.

Se elaboraron 3 microemulsiones utilizando este sistema. La proporción de cada uno de los componentes fue escogida según el diagrama de fases representado en la figura 21 de manera de obtener en todos los casos microemulsiones estables.

Las proporciones de cada uno de los componentes de las 3 microemulsiones seleccionadas se muestran en la tabla 4.

Abreviatura	% Miristato de Isopropilo	% Tween 80: Span 80: 1,2 Octanodiol (3:1:1,2)	% Agua
EM1	10	75	15
EM2	25	60	15
EM5	45	40	15

Tabla 4: Proporción de los componentes de las microemulsiones del sistema Tween 80: Span 80: 1,2-octanodiol (S+C) / miristato de isopropilo (O) /agua (W) elaboradas.

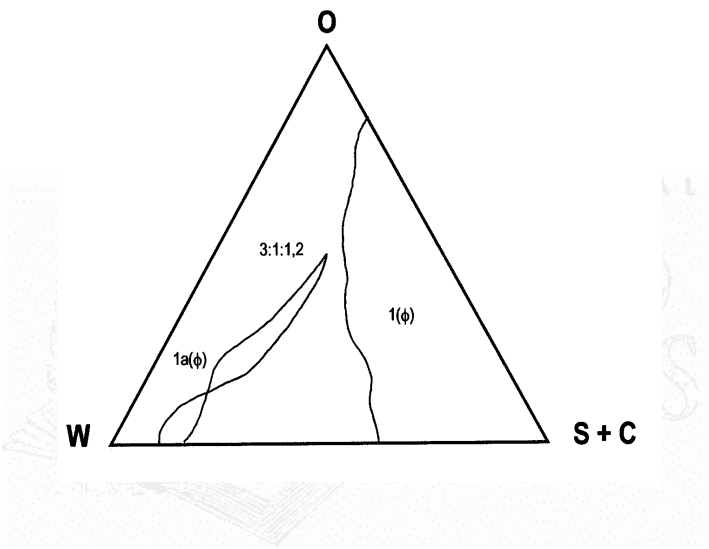


Figura 21: Diagrama de fases del sistema Tween 80: Span 80: 1,2-octanodiol (S+C) / miristato de isopropilo (O) /agua (W). 1ϕ = Microemulsión.

Inicialmente se preparó la mezcla de surfactante y cosurfactante en la relación en peso que se mencionó anteriormente.

Para la preparación de las microemulsiones se midió el volumen de cada componente en una probeta graduada y luego se agitó el sistema hasta completa homogeneización. Posteriormente se introdujo el sistema en un baño de agua a 37ºC hasta su completa estabilización.

5.2 Cuantificación del MTX para los estudios de solubilidad

Condiciones del análisis:

La cuantificación del MTX contenido en las microemulsiones se realizó mediante espectrofotometría UV (espectofotómetro Shimadzu, UV-240) empleando una longitud de onda de 304 nm.

Para poder cuantificar el MTX contenido en las microemulsiones, fue necesario romper estos sistemas mediante la adición de etanol (Panreac química S.A., grado p.a.).

Curva de calibración:

La curva de calibración se muestra en el gráfico 3.

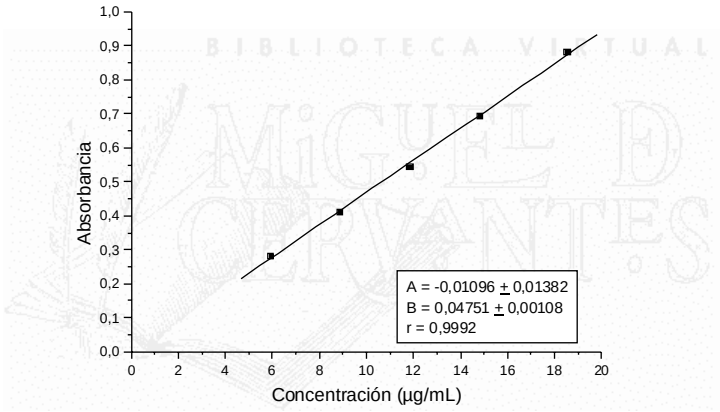


Gráfico 3: Curva de calibración de MTX empleando espectrofotometría UV. Longitud de onda: 304 nm.

Validación del método de cuantificación del MTX por espectofotometría UV:

Se realizaron 2 curvas de calibración en días diferentes. Para cada una de las curvas se prepararon muestras en un rango de concentraciones entre 6 - 19 µg/mL. Cada curva se hizo con 5 puntos.

Para cada recta se calculó la linealidad (reflejada en el valor r) y la proporcionalidad. Se consideró lineal una recta con un valor de r = 0,999. La proporcionalidad se determinó verificando

si el intervalo de error del valor A (punto de intersección en el eje de las ordenadas) comprendiera al valor cero.

Finalmente se comprobó que las dos rectas eran equivalentes verificando si los límites de confianza de una estaban incluidos en los límites de confianza de la otra.

5.3 Estudios de solubilidad del MTX en las microemulsiones

Estos estudios tienen como finalidad determinar la cantidad máxima de MTX que son capaces de solubilizar estos sistemas.

Se elaboraron 10 mL de cada microemulsión y se dejaron estabilizar a 37ºC por 24 horas. Luego se les adicionó MTX en exceso y se mantuvo al sistema con agitación magnética y protegida de la luz durante todo el tiempo del ensayo.

A cada tiempo de muestreo (24, 48, 72, 96 y 163 horas), se sacó un pequeño volumen de la microemulsión (aproximadamente 1 mL) y se centrífugo a 11000 r.p.m. por 15 minutos. Se filtró el líquido sobrenadante mediante filtros de difluoruro de polivinilo (0,45 µm) y el MTX se cuantificó según método descrito en materiales y métodos 5.2

5.4 Estudio de difusión pasiva de microemulsiones de MTX

Se realizó el estudio de difusión pasiva de microemulsiones de MTX con las 5 microemulsiones elaboradas (3 con el sistema labrasol:plurol isoesteárico/ oleato de etilo/ solución salina; y 2 con el sistema Tween 80: Span 80: 1,2 Octanodiol/ miristato de isopropilo/ agua).

Montaje del experimento:

Preparación de la piel:

La piel utilizada para estos estudios se trató de igual manera que aquella empleada para los estudios de difusión pasiva de soluciones de MTX (materiales y métodos 1.1).

Células de difusión empleadas y condiciones del ensayo:

Se utilizaron células de difusión pasiva vertical, termostatizadas a 37ºC mediante baño de agua manteniendo el sistema bajo agitación y protegido de la luz durante todo el experimento.

Compartimento donante:

En estos estudios se utilizaron las microemulsiones que contenían MTX como vehículos donantes de este fármaco. Para cada experimento se emplearon 3 mL de microemulsión.

La preparación de las microemulsiones utilizadas como donantes fue la siguiente: se preparó cada tipo de microemulsión y se dejó estabilizar durante 24 horas a 37ºC. Luego se pesó la cantidad necesaria de MTX (correspondiente al 50% y 80% de la saturación de este compuesto en cada microemulsión) y se agitó el sistema (a 37ºC y protegido de la luz) por 48 hrs.

Compartimento receptor:

Como solución receptora se empleó buffer Hepes 25 mM + NaCl 154 mM, ajustado a pH 7,4 mediante la adición de NaOH 0,5M. Para cada experimento se emplearon 4 mL de dicha solución.

Toma de muestras:

Se cuantificó la cantidad de MTX en la solución receptora a las 6 y 24 horas y la cantidad de MTX retenido en la piel una vez finalizado el estudio de difusión.

5.5 Cuantificación del MTX para los estudios de difusión

Las condiciones del análisis y la preparación de las muestras se realizaron de igual manera que en materiales y métodos 4.2.

5.6 Análisis de los datos

Los datos fueron tratados de igual manera que en materiales y métodos 1.3.

Resultados y Discusión

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

1. Estudio de difusión pasiva de soluciones de MTX

1.1 Montaje del experimento

La elección de los cerdos empleados en este trabajo de investigación, se realizó fundamentalmente basándonos en la edad del animal (2 – 3 días de vida). Una vez elegidos los cerdos, se verificó que la piel estuviera en perfecto estado, sin alguna herida o rasguño que pudiese alterar la permeabilidad de este órgano. No se consideró el peso de los animales como criterio de elección de los mismos, debido a que no siempre hay una relación directa entre la edad y el peso del animal.

Con respecto a las células de difusión empleadas (ver materiales y métodos 1.1), se debe tener precaución en el llenado de éstas ya que es fácil que apetezcan burbujas en el sistema. Para evitar la presencia de burbujas, que impiden que el contacto de la piel con la respectiva disolución sea homogéneo, se debe sacar el aire del compartimento receptor e introducir la disolución en dicho compartimento en forma simultánea.

En la solución donante se incluyó una cantidad de NaCl (50 mM) con el fin de poder comparar en forma directa, los resultados obtenidos para los estudios de difusión pasiva de soluciones de MTX con los estudios de iontoforesis de dichas soluciones. Teóricamente, por estar el MTX cargado negativamente a pH 7,4 e introducirse por tanto en el compartimento catódico, no se requeriría NaCl en la solución donante. Sin embargo, se observó experimentalmente que al adicionar una pequeña cantidad de esta sal, el voltaje del sistema disminuía y por lo tanto era posible tomar muestras a tiempos mayores, asegurándonos así, que la piel en estudio estuviera en buen estado durante todo el tiempo de experimentación.

La primera muestra se tomó a las 6 horas porque a tiempos inferiores no era posible cuantificar MTX en la solución receptora. Como la piel va cambiando sus características en el tiempo cuando se aplica corriente eléctrica (Pikal 1992), se consideró adecuado tomar la última muestra a las 24 horas.

1.2 Recta de calibrado

Los parámetros determinados para cada curva de calibración realizada se muestran en la tabla 5.

Curva	C.V. Factor f (área/cantidad inyectada)	r	Ecuación de la recta: cantidad MTX (µg) vs área
1	3,61	0,9992	A = 14560,52 ± 25392,61 B = 1206720 ± 19350,98
2	4,18	0,9991	A = 7250,70 ± 28514,64 B = 1239700 ± 21730,19

Tabla 5: Parámetros de validación de las curvas de calibración de MTX realizadas mediante HPLC. Fase móvil: Na_3PO_4 0,1M / metanol 75:25.
Longitud de onda: 305 nm.

Por medio de los parámetros antes calculados, podemos concluir que ambas rectas son lineales, proporcionales y equivalentes entre ellas. Se puede afirmar por tanto, que el método de valoración de MTX escogido es adecuado para su cuantificación.

El límite de detección del método empleado fue de 2 µg/mL.

1.3 Determinación de MTX en la solución receptora y en la piel

La cantidad de MTX cuantificada en la solución receptora y en la piel, se muestra en la tabla 6.

Conc. MTX (mg/mL) Sol. donante	Cantidad MTX 6 hrs. (µg/cm^2) Sol. receptora	Cantidad MTX 24 hrs.(µg/cm^2) Sol. receptora	Cantidad MTX extraída de la piel (µg/cm^2)
2,0	0	0	2,38 ± 0,46 (n = 6)
2,5	0	0	4,55 ± 0,86 (n = 6)
2,8	0	0,63 ± 0,36	6,21 ± 0,50 (n = 5)
3,0	1,24 ± 2,59	2,43 ± 4,18	4,52 ±1.33 (n = 6)

Tabla 6: Cantidad de MTX en la solución receptora y en la piel para los diferentes estudios de difusión pasiva de soluciones de MTX (Tª: 37ºC).

Los resultados muestran la escasa penetración que posee el MTX para atravesar la piel por mecanismos de difusión pasiva.

Sólo se detecta MTX en la solución receptora cuando se trabaja con concentraciones ≥ 2,8 mg/mL. Después de 24 horas de estudio, la cantidad de MTX cuantificado en la solución receptora, fue de 0,63 ± 0,36 µg/ cm^2 y 2,43 ± 4,18 µg/cm^2 para las concentraciones de 2,8 y 3,0 mg/mL de MTX en la solución donante respectivamente. Estos dos valores no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Se observa que la cantidad de MTX que queda retenido en la piel se modifica ligeramente con pequeños cambios de su concentración en la solución donante (2,0 – 3,0 mg/mL). Observamos que en general, a mayor concentración del fármaco en la solución donante, mayor concentración de éste en la piel. Se alcanzan valores que van desde 2,38 $\pm$ 0,46 a 6,21 $\pm$ 0,50 µg/cm^2, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre todos los casos estudiados.

Si suponemos que la cantidad de MTX acumulada en el tiempo, presenta un comportamiento lineal, podemos afirmar que la cantidad de MTX cuantificada en nuestro estudio, es mayor a la encontrada por Weinstein G. D. (Weinstein y col. 1989). En el estudio de Weinstein se investigó la difusión pasiva de soluciones de MTX al 2% utilizando piel humana, encontrándose que la cantidad de MTX que penetra a través de la piel después de 48 horas era de alrededor de 5 µg/cm^2.

La cantidad de MTX cuantificada en la piel empleando estudios de difusión pasiva, podría no ser suficiente para su utilización en el tratamiento local de la psoriasis. Debido a que aún no se conoce la concentración de MTX requerida al nivel de la piel para el adecuado tratamiento de esta patología, hemos investigado si la utilización de otras técnicas o vehículos pueden aumentar la penetración transdérmica de este fármaco. Es así como se estudió la técnica de iontoforesis (Singh y col. 1995) y se emplearon las microemulsiones, que actúan como promotores de la absorción transdérmica (Chatterjee y col. 1997).

MIGUEL DE CERVANTES

2. Estudio de iontoforesis de soluciones de MTX

La iontoforesis ha sido propuesta como una técnica adecuada para aumentar la penetración de algunos fármacos, entre ellos, el MTX. Se realizó un estudio que combinaba la técnica de iontoforesis con el uso de promotores de la absorción como DMSO (dimetilsulfóxido), DMF (dimetilformamida), DMA (dimetilacetamida) y Azone (1-dodecilcicloheptano 2- ona) en la penetración transdérmica de MTX. Se encontró que la iontoforesis empleando Azone como promotor de la absorción, produce un aumento de alrededor de 72 veces en el coeficiente de permeabilidad del MTX en comparación con la difusión pasiva. Sin embargo, estos autores no caracterizaron la penetración iontoforética de MTX en ausencia de agentes promotores de la absorción (Singh y col. 1995).

En un inicio, en este trabajo de investigación se realizó un estudio de iontoforesis con el fin de compararlo con el estudio de difusión pasiva (concentración de MTX: 2,0 mg/mL, concentración de NaCl: 50 mM, temperatura: 37ºC, corriente eléctrica: 0,5 mA/cm^2). Una vez que comprobamos experimentalmente que mediante la iontoforesis se producía un aumento en el transporte de MTX a través de la piel, se caracterizó esta técnica. Para ello se estudió la influencia de ciertos factores, como la concentración de fármaco, la cantidad de corriente eléctrica aplicada, la fuerza iónica y el pH, en el transporte iontoforético del MTX.

2.1 Determinación de la solubilidad del MTX en las diferentes soluciones donantes empleadas

Este estudio tiene como objetivo principal determinar en qué intervalo de concentraciones de MTX podemos trabajar, es decir, qué cantidades máximas de MTX podemos emplear asegurándonos que este principio activo esté completamente disuelto.

La solubilidad del MTX en las diferentes soluciones donantes, se muestra en la tabla 7.

Composición Solución donante	Solubilidad MTX (mg/mL)
Hepes 25 mM, pH 7,4	4,0 ± 0,22
Hepes 25 mM + NaCl 50 mM, pH 7,4	3,1 ± 0,35
Hepes 25 mM + NaCl 100 mM, pH 7,4	2,4 ± 0,28
Hepes 25 mM * NaCl 50 mM, pH 5.0	0,09 ± 0,05
Hepes 25 mM * NaCl 50 mM, pH 4,0	0,04 ± 0,02

Tabla 7: Solubilidad del MTX en las soluciones donantes empleadas (n=4).

Se observa que el MTX es bastante más soluble en soluciones álcalis que ácidas (Merck 1996). Además, su solubilidad se modifica con la presencia de NaCl en el medio: a mayor cantidad de NaCl, menor solubilidad del fármaco.

De acuerdo a los estudios de solubilidad realizados, se escogieron dos concentraciones de MTX para preparar las soluciones donantes: 2,0 y 3,0 mg/mL. Sin embargo, cuando se añade una cantidad equivalente a 100 mM de NaCl a la solución donante, no es posible disolver 3,0 mg/mL de MTX ya que la solubilidad del MTX en ese medio es de sólo 2,4 mg/mL. Por esto, al trabajar con una cantidad de sal equivalente a 100 mM, sólo se trabajó con una concentración de 2,0 mg/mL de MTX.

2.2 Montaje del experimento

Como se señaló en el capítulo de materiales y métodos (punto 2.2), en estos estudios se usaron células de difusión horizontal. Estas células presentan la ventaja de que prácticamente no se forman burbujas al introducir las disoluciones en los correspondientes compartimentos. Sin embargo, se debe tener precaución en el sellado de las mismas ya que es más factible que en este tipo de montaje hayan filtraciones. Para evitar esto, en nuestros experimentos sellamos la célula donante y la célula receptora con silicona y posteriormente las ajustamos entre si con pinzas.

El sistema así montado permitió realizar los estudios planificados con una resistencia eléctrica mínima. El voltaje, que es una medida indirecta del estado de la piel (Green y col. 1993; Pikal 1992), no sobrepasó los 10 mV en ningún momento del experimento.

Como en los estudios de iontoforesis lo que controla el paso de fármaco es la corriente eléctrica, la temperatura a la cuál se realizan los experimentos no es un parámetro que ejerza una influencia significativa en la cantidad de fármaco que pasa a través de la piel. Por esta razón, y para facilidad del montaje del experimento, los estudios de caracterización del transporte iontoforético de MTX, se realizaron a temperatura ambiente. Sin embargo, los experimentos que se realizaron para comparar iontoforesis con difusión pasiva se realizaron a 37ºC para no incorporar nuevos parámetros que impidiesen la comparación de estos experimentos directamente.

Como en los estudios de iontoforesis se detecta mayor cantidad de MTX en la solución receptora, la secuencia de toma de muestras se realizó a intervalos de tiempo menores (4, 7 y 10 horas) y con un tiempo total de experimentación también menor en comparación con los estudios de difusión pasiva. Estos tiempos se eligieron de acuerdo a un criterio fundamental: que la cantidad de MTX presente en la solución receptora esté dentro del rango de concentraciones que nuestro método de cuantificación permite detectar.

2.3 Comparación de estudios de difusión pasiva y de iontoforesis

Como se mencionó anteriormente, se realizaron algunos estudios de iontoforesis en las mismas condiciones que los estudios de difusión pasiva (temperatura: 37 ºC, toma de muestras: 4, 8 y 24 horas, solución receptora: buffer Hepes 25 mM; pH 7,4 + NaCl 50 mM) y utilizando una concentración de MTX en la solución donante igual a 2,0 mg/mL. En los estudios de iontoforesis en estas condiciones, se detecta MTX a partir de las 4 horas desde el comienzo del experimento, alcanzándose valores de MTX acumulado a las 24 horas de 336,4 $\pm$ 47,0 µg/cm^2.

Comparando el transporte de MTX mediante iontoforesis con cualquiera de los estudios de difusión pasiva realizados, se detectan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

2.4 Caracterización del transporte iontoforético del MTX

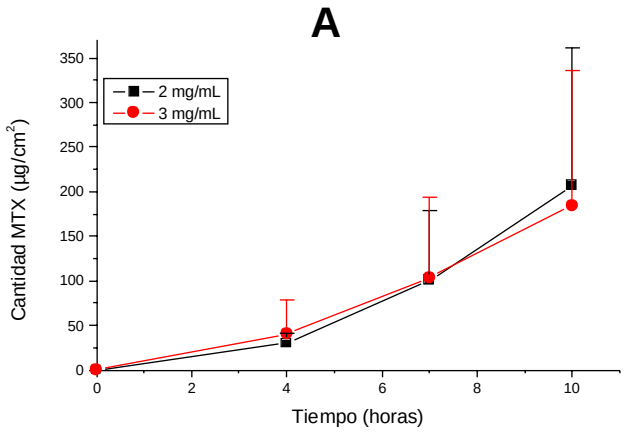
- ***Influencia de la concentración de MTX en la liberación iontoforética de este fármaco:***

La influencia de la concentración de MTX fue estudiada sólo en el intervalo de concentraciones de 2,0 – 3,0 mg/mL (4,4 – 6,6 mM) debido a la escasa solubilidad que presenta este fármaco en los medios donantes utilizados (tabla 7).

En los gráficos 4 y 5 se muestra la cantidad de MTX detectada en la solución receptora a los diferentes tiempos de muestreo.

Cuando se trabaja en ausencia de NaCl (gráfico 4), y lo que se varía es la cantidad de corriente eléctrica aplicada al sistema, observamos que la cantidad de MTX cuantificada en la solución receptora es prácticamente la misma. Resultados análogos son obtenidos cuando incorporamos NaCl 50 mM a la solución donante (gráfico 5). En ninguno de estos casos anteriores se encuentran diferencias estadísticamente significativas al variar la concentración de 2,0 a 3,0 mg/mL

A pesar de que en alguno de los casos estudiados se aprecia una tendencia a encontrar mayor cantidad de MTX en la solución receptora con un aumento de su concentración en la solución donante, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas posiblemente se deba al estrecho intervalo de concentraciones empleado y a la alta variabilidad observada entre los ensayos.



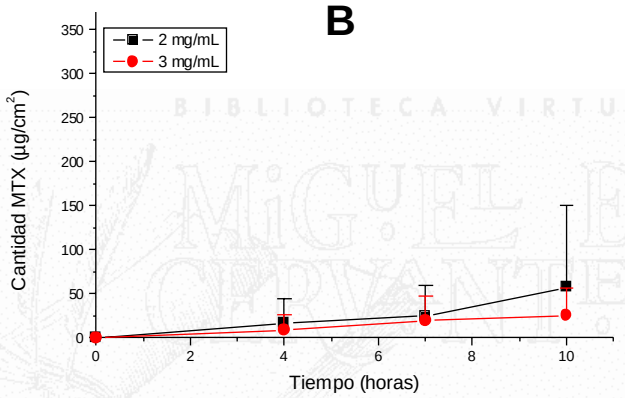
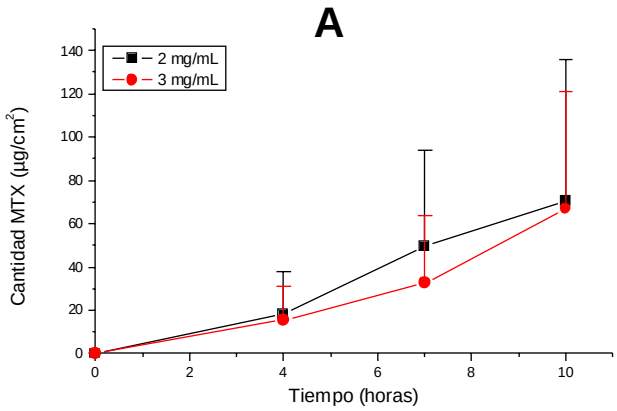


Gráfico 4: Influencia de la concentración de MTX en la penetración iontoforética de este fármaco. Cantidad de NaCl en la solución donante: 0 mM. (n = 6). A) Corriente aplicada equivalente a 0,5 mA/cm^2. B) Corriente aplicada equivalente a 0,25 mA/cm^2.

Estos resultados están de acuerdo con los realizados por Kasting (Kasting y col. 1989) en ausencia de otros iones en la solución donante y con los realizados por Padmanabhan y colaboradores (Padmanabhan y col. 1990) empleando como fármaco a la hidromorfina y trabajando en un en el intervalo de concentraciones de 0,01 – 0,08 M.

Normalmente en los estudios de difusión transdémica utilizando modelos de piel animal se encuentra una alta variabilidad en los resultados obtenidos. En nuestro caso, tenemos adicionalmente otros factores que aumentan esta variabilidad: se emplearon tanto cerdos hembras como machos y los estudios se realizaron empleando toda la piel del animal, ya que se quería evitar que los resultados estuvieran condicionados a la permeabilidad característica de cada zona cutánea.



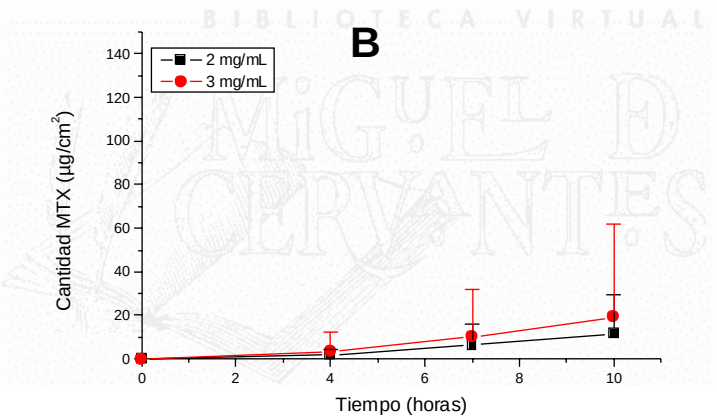


Gráfico 5: Influencia de la concentración de MTX en la penetración iontoforética de este fármaco. Cantidad de NaCl en la solución donante: 50 mM. (n = 6). A) Corriente aplicada equivalente a 0,5 mA/cm^2. B) Corriente aplicada equivalente a 0,25 mA/cm^2.

- ***Influencia de la fuerza iónica del medio en la liberación iontoforética del MTX:***

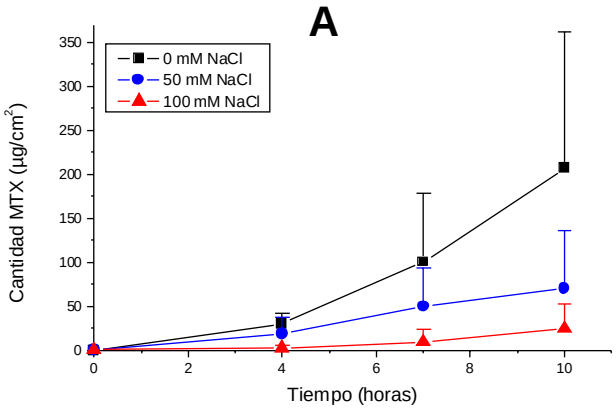
El estudio de la fuerza iónica en la liberación iontoforética de MTX se realizó mediante la incorporación de NaCl a la solución donante. Para esto se escogieron tres concentraciones diferentes de esta sal: 0, 50 y 100 mM.

En los gráficos 6 y 7 se muestra la cantidad de MTX detectada en la solución receptora a los diferentes tiempos de muestreo.

Se observa que la penetración de MTX disminuye con un incremento de la fuerza iónica, sin embargo, esta diferencia es estadísticamente significativa sólo cuando se trabaja con una concentración de 2,0 mg/mL de MTX en la solución donante y cuando se emplea una densidad de corriente equivalente a 0,5 mA/cm^2.

Estos resultados concuerdan con lo esperado teóricamente ya que en un sistema de iontoforesis, todos los iones presentes en el sistema compiten por transportar la carga. En nuestro caso, la mayoría de la carga es transportada por los iones más móviles: el sodio (desde el ánodo) y el cloruro (desde el cátodo). Así, el transporte iontoforético de MTX se incrementa con la ausencia de iones más móviles que él en el cátodo, sin embargo, está condicionado a la cantidad de iones sodio presentes en el ánodo (ya que estos son los iones encargados de cerrar el circuito eléctrico).

El número de transporte del MTX calculado para los diferentes experimentos realizados, prácticamente no se ve modificado con un cambio en la fuerza iónica. El número de transporte aparente del MTX es de 6×10^{-4} en los experimentos que contienen 2,0 mg/mL de MTX; 0,5 mA/cm^2 y 100 mM de NaCl y sólo se incrementa a 5×10^{-3} en ausencia de esta sal.



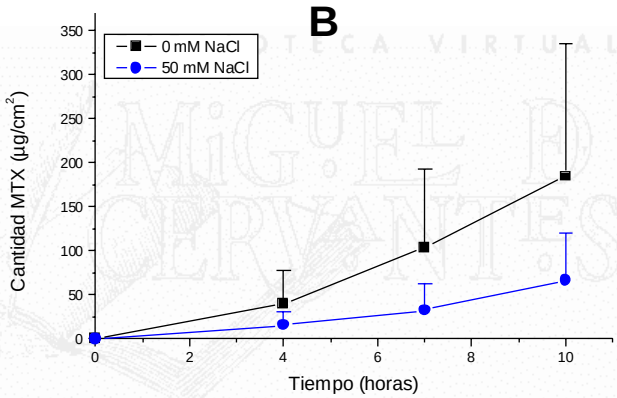
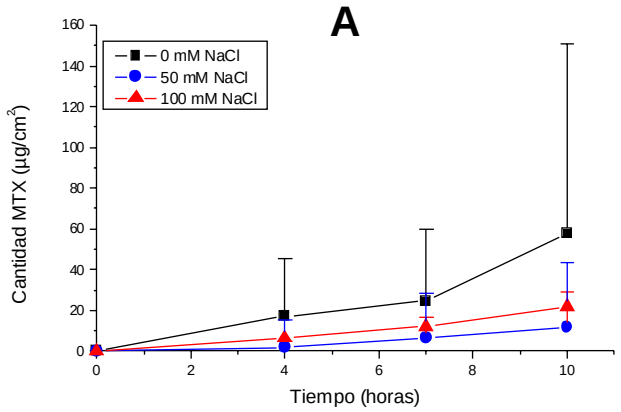


Gráfico 6: Influencia de la fuerza iónica en la penetración iontoforética del MTX. Corriente eléctrica empleada: 0,5 mA/cm^2. (n = 6). A) Concentración de MTX en la solución donante: 2,0 mg/mL B) Concentración de MTX en la solución donante: 3,0 mg/mL



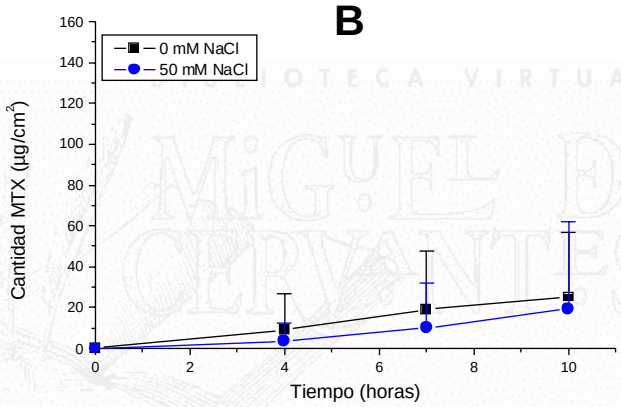


Gráfico 7: Influencia de la fuerza iónica en la penetración iontoforética de MTX. Corriente eléctrica empleada: 0,25 mA/cm^2. (n = 6). A) Concentración de MTX en la solución donante: 2,0 mg/mL B) Concentración de MTX en la solución donante: 3,0 mg/mL

- ***Influencia de la corriente eléctrica en la liberación iontoforética del MTX:***

Para analizar la influencia de la corriente eléctrica en el paso de MTX a través de la piel, se utilizaron dos valores de corriente eléctrica. Primero se escogió la máxima cantidad de corriente que es tolerada por los pacientes sin producir daño en la piel y que corresponde a una corriente de 0,5 mA/cm^2. Luego se estudió que pasaría si se disminuía la cantidad de corriente aplicada a la mitad, por esto se trabajó con una corriente equivalente a 0,25 mA/cm^2.

En los gráficos 8 y 9 se muestra la cantidad de MTX detectada en la solución receptora a los diferentes tiempos de muestreo.

El flujo iontoforético de una sustancia a través de la piel es producto de la sumatoria de los flujos electrorrepulsivo y electroosmótico. Se asume que en iontoforesis, el flujo por difusión pasiva es despreciable frente a los otros flujos (Guy y col. 2000).

$$J_{total} = J_{electrorrepulsión} + J_{electroosmótico}$$

Como el flujo electrorrepulsivo está relacionado con la cantidad de corriente, se espera un incremento en la penetración de MTX con un incremento en la corriente eléctrica aplicada.

El flujo electrorrepulsivo de un ión *i* está dado por la expresión:

$$J_{elecrorrepulsivo} = (t_n \cdot I) / z \cdot F$$

donde t_n corresponde al número de transporte del correspondiente ión, *z* su valencia, *F* la constante de Faraday e *I* la corriente eléctrica aplicada (Yoshida y col. 1992).

En nuestro estudio, aunque se aprecia un aumento en la penetración de MTX con un incremento en la cantidad de corriente eléctrica, este aumento es estadísticamente significativo sólo para la serie de experimentos en que se trabaja con una concentración de MTX de 3,0 mg/mL y una concentración de NaCl de 0 ó 50 mM, o bien, cuando se trabaja con una concentración de MTX de 2,0 mg/mL y una concentración de NaCl de 50 mM.

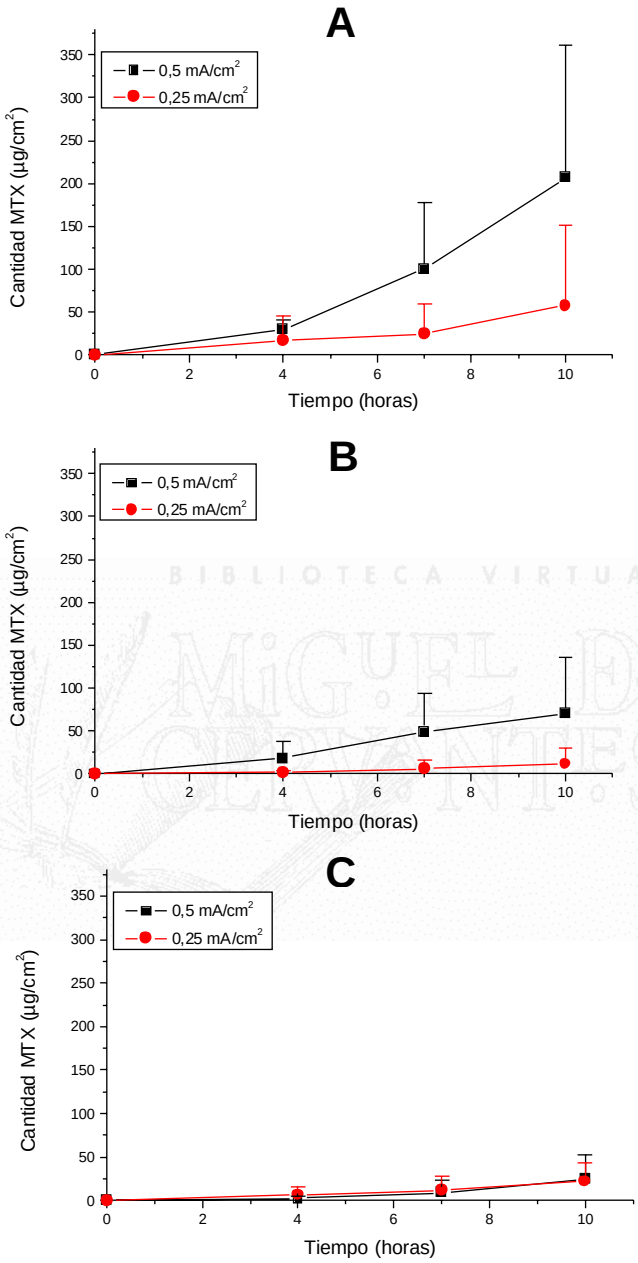


Gráfico 8: Influencia de la corriente eléctrica en la penetración iontoforética de MTX. Concentración MTX: 2,0 mg/mL. (n = 6). A) Concentración de NaCl en la solución donante: 0 mM B) Concentración de NaCl en la solución donante: 50 mM C) Concentración de NaCl en la solución donante: 100 mM.

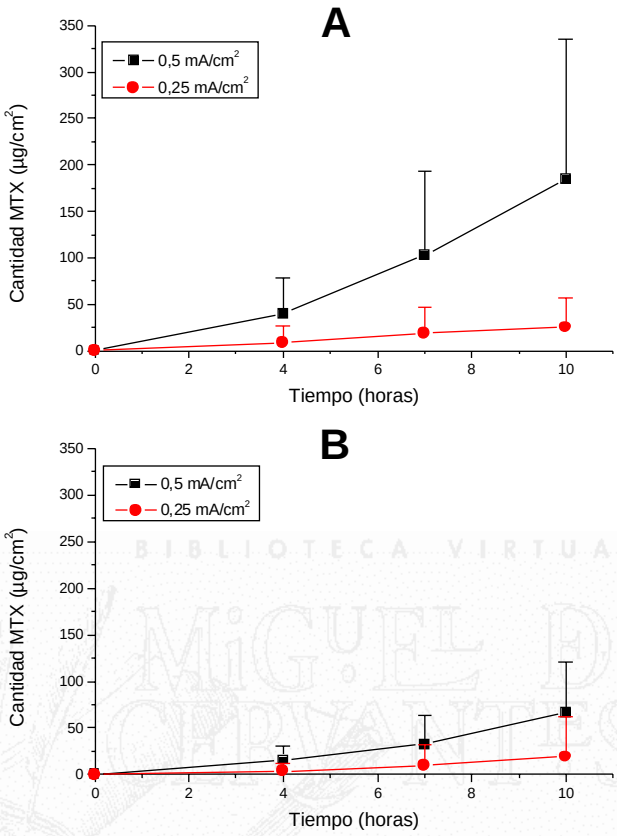


Gráfico 9: Influencia de la corriente eléctrica en la penetración iontoforética de MTX. Concentración MTX: 3,0 mg/mL. (n = 6). A) Concentración de NaCl en la solución donante: 0 mM B) Concentración de NaCl en la solución donante: 50 mM.

- ***Influencia del pH en la liberación iontoforética del MTX:***

Se estudió la influencia del pH en la penetración iontoforética de MTX. Para esto se trabajó con soluciones de MTX de pH 4,0 y 5,0. A estos valores de pH, los grupos aminos del MTX se encuentran predominantemente ionizados (≥ 80%), la molécula se encuentra cargada positivamente y por lo tanto, la liberación iontoforética del MTX en estas condiciones, debe de hacerse desde el ánodo.

En teoría, la liberación anódica presenta ventajas respecto de la liberación catódica ya que el flujo electroosmótico tiene dirección ánodo – cátodo (Pikal 1992). Además, se ha observado que la contribución del flujo electroosmótico es muy relevante para fármacos con número de transporte pequeños (como es el caso de nuestro fármaco) (Pikal y col. 1990; Burnette 1989).

Sin embargo, en nuestro estudio, pese a que teóricamente la liberación anódica está favorecida respecto a la liberación catódica, no se detectó MTX en la solución receptora en esta serie de experimentos. Esto puede explicarse debido a la baja solubilidad que presenta el MTX en medio ácido. Cuando se emplean soluciones ácidas, la solubilidad del MTX es de alrededor de 0,1 mg/mL comparado con una solubilidad de alrededor de 2 – 4 mg/mL (tabla 7) observada cuando se emplean soluciones básicas.

2.5 Determinación de MTX en la piel

Comparando los estudios de iontoforesis con los estudios de difusión pasiva (gráfico 10), observamos que empleando la técnica de iontoforesis obtenemos alrededor de 8 veces más cantidad de MTX en la piel (concentración de MTX: 2,0 mg/mL, corriente de 0,5 mA/cm^2) luego de 24 horas.

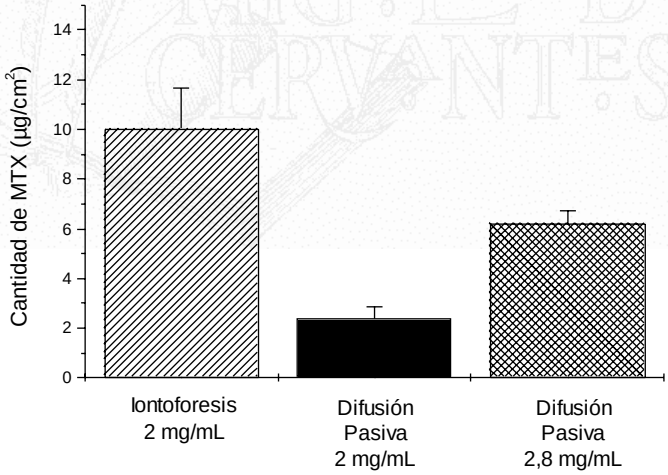


Gráfico 10: Comparación en la cantidad de MTX extraído en la piel a las 24 horas para estudios de difusión pasiva y de iontoforesis. Valores promedio ± D.S. (n = 5 – 6). Tª: 37ºC.

Para los estudios de caracterización de la penetración iontoforética de MTX a través de la piel, la cantidad de MTX cuantificada en la piel luego a las 10 horas, fue de 1 - 10 µg/cm^2 para los diferentes experimentos realizados (tabla 9).

El análisis estadístico de estos resultados sugiere que la cantidad de MTX extraída en la piel aumenta con un incremento de la corriente eléctrica, un incremento de la concentración de MTX y una disminución de NaCl en la solución donante. Sin embargo no se observa un claro comportamiento de lo descrito anteriormente. Por ejemplo, una alta densidad de corriente aplicada conduce a una mayor cantidad de MTX en la piel sólo en los experimentos que utilizan una concentración de MTX equivalente a 3,0 mg/mL.

MTX Sol. donante (mg/mL)	NaCl Sol. donante (mM)	Corriente eléctrica aplicada (mA/cm^2)	MTX en la piel a las 10 hrs. de estudio ($\mu g/cm^2$)
2	0	0.5	6.92 ± 3.15
2	50	0.5	3.73 ± 2.64
2	100	0.5	7.11 ± 8.97
3	0	0.5	10.86 ± 6.10
3	50	0.5	4.76 ± 1.71
2	0	0.25	5.27 ± 2.45
2	50	0.25	5.36 ±4.33
2	100	0.25	8.90 ± 10.39
3	0	0.25	1.43 ± 1.42
3	50	0.25	0.69 ± 1.70

Tabla 9: Cantidad de MTX en la piel para los diferentes estudios de iontoforesis. (Tª = ambiente, n = 6).

Valores similares han sido obtenidos por Lu y col. (Lu y col. 1997) usando la piel de las orejas de conejos y un gel que contiene 0,5 – 1,0% de MTX y 4% de N,N – dietil-n-toluenoamida (DEET).

Los niveles de MTX alcanzados en la piel después de los estudios de iontoforesis sugieren que esta técnica podría ser apropiada para facilitar el paso de MTX a través de la piel. Sin embargo, por no conocerse en la actualidad las concentraciones terapéuticas necesarias de MTX para su uso en el tratamiento local de la psoriasis, no podemos afirmar que la cantidad de MTX retenida en la piel sea suficiente para el adecuado tratamiento local de esta patología.

- ***Resumen:***

Los valores para cada uno de los experimentos realizados se recogen en la tabla 8.

Es interesante comparar nuestros resultados con los obtenidos empleando técnicas que aumentan la penetración, como es el caso de las microemulsiones y el uso de agentes promotores de la absorción. En un estudio realizado en piel de ratón sin pelo empleando una microemulsión de lecitina en agua/PEG (70:30), pH 5,0; saturada de MTX (solubilidad : 2,5 mg/g); la penetración de MTX fue de 5 ± 1 $\mu g/(cm^2 \cdot hr)$ (Trotta y col. 1996). En otro estudio (Weinstein y col. 1989), empleando piel humana y usando una solución al 2% de MTX y promotores de la absorción

(dodecilmetilsulfóxido y Azone), la cantidad acumulada de MTX fue de 10 – 40 µg/cm^2 a las 48 horas, (es decir, 0,2 – 0,8 µg/cm^2 hr), valores menores que los obtenidos en nuestro estudio.

[MTX] (mg/mL)	[NaCl] (mM)	Corriente eléctrica (mA/cm^2)	[MTX] acumulado		
			4 h. (µg/cm^2)	7 h. (µg/cm^2)	10 h. (µg/cm^2)
2	0	0.5	29.9 ± 11.8	100.4 ± 78.0	207.0 ± 154.6
2	50	0.5	18.4 ± 19.6	49.6 ± 44.4	70.3 ± 65.6
2	100	0.5	2.5 ± 3.1	9.0 ± 14.2	24.5 ± 28.7
3	0	0.5	40.0 ± 38.2	103.4 ± 89.8	184.6 ± 151.2
3	50	0.5	15.6 ± 15.4	32.5 ± 31.0	66.7 ± 54.1
2	0	0.25	17.1 ± 28.1	24.7 ± 35.0	57.8 ± 93.1
2	50	0.25	1.9 ± 2.6	6.4 ± 9.9	11.6 ± 17.8
2	100	0.25	6.5 ± 8.9	12.2 ± 15.9	21.9 ± 21.4
3	0	0.25	9.0 ± 18.0	19.2 ± 28.2	25.2 ± 31.6
3	50	0.25	3.6 ± 8.9	10.2 ± 21.9	19.3 ± 42.8

Tabla 8: Cantidad de MTX en la solución receptora para los diferentes estudios de iontoforesis. Tª: ambiente (promedio ± S.D, n= 6).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

3. Obtención y caracterización de los hidrogeles

3.1 Síntesis de los hidrogeles

La utilización de hidrogeles en los últimos años ha adquirido mucho interés debido a que ellos presentan adecuadas características de hinchamiento y de biocompatibilidad. Además, son sistemas que permiten la inclusión de ciertos principios activos permitiendo así modular su cinética de liberación.

Estudios previos han demostrado que los hidrogeles de ácido acrílico y ácido acrílico / acrilamida 1:1 poseen una consistencia adecuada y que pueden ser utilizados como vehículos en estudios de iontoforesis (Katime y col. 1999; Katime y col. 2000).

En este estudio, la obtención de los hidrogeles de ácido acrílico y ácido acrílico / acrilamida 1:1 no presentó dificultades. Su síntesis fue sencilla y reproducible.

3.2 Estudios de hinchamiento

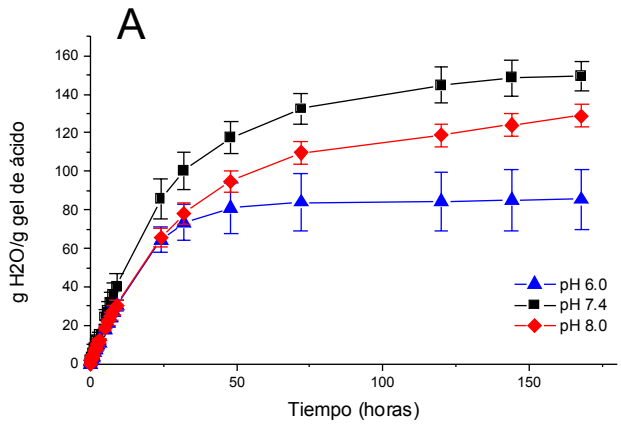
El hinchamiento consiste en el aumento de volumen que experimenta un xerogel debido a la captación de solvente.

Se estudió el proceso de absorción de solvente por parte de los hidrogeles calculando el grado de hinchamiento Gh. Los resultados se expresaron en gramos de agua absorbidos por gramo de hidrogel.

En el gráfico 11 se representan las cinéticas de hinchamiento de los dos hidrogeles estudiados (ácido acrílico y ácido acrílico / acrilamida 1:1) a los diferentes pH de estudio.

Se observa que la cinética de captación de agua es similar para los dos hidrogeles sintetizados, observándose sin embargo, que aquellos constituidos únicamente por ácido acrílico captan una mayor cantidad de líquido. Posiblemente esto se deba a que los grupos carboxílicos ionizados que posee este ácido presentan mayor repulsión que los grupos amida presentes en la acrilamida; y por lo tanto, hay mayor espacio en el caso del ácido para la incorporación de disolvente en su red polimérica.

Existen diferencias estadísticamente significativas en el proceso de hinchamiento para los diferentes pH en un mismo hidrogel y entre los diferentes hidrogeles para pH 7,4. A pH 6,0 y 8,0 no se detectan estas diferencias entre los dos hidrogeles sintetizados.



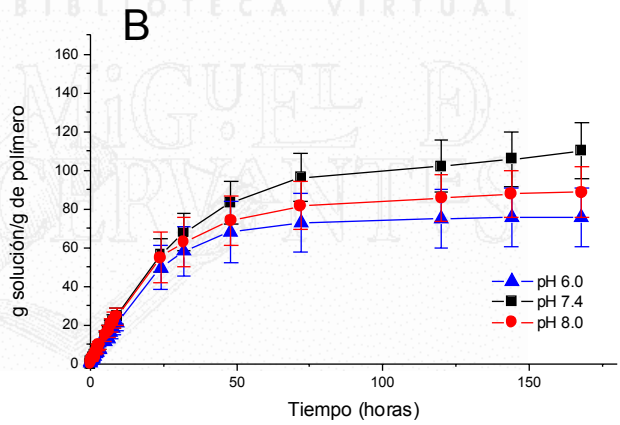


Gráfico 11: Influencia del pH en la cinética de hinchamiento de hidrogeles de. A) ácido acrílico B) ácido acrílico/ acrilamida 1:1. Solución de hinchamiento: Hepes 25 mM.

En los dos tipos de hidrogeles estudiados se alcanza el equilibrio de hinchamiento aproximadamente a las 80 horas. Además, aunque la captación de agua es semejante para los diferentes pH, es máxima a pH 7,4 y mínima a pH 6,0. Se ha observado que el grado de hinchamiento del ácido acrílico depende del grado de ionización de los grupos carboxílicos que lo constituyen. A pH 2,0 (pKa ácido acrílico = 4,0), la mayoría de los grupos carboxílicos están no ionizados, no existe repulsión entre ellos y por lo tanto la conformación polimérica es compacta. Sin embargo, cuando el pH se incrementa de 2,0 a 5,8 se aumenta la proporción de grupos funcionales ionizados y por lo tanto la repulsión entre ellos, obteniéndose una conformación más expandida del hidrogel. En estas condiciones de pH, el hidrogel es capaz de incorporar una mayor

cantidad de disolvente dentro de su red polimérica. Si se sigue incrementando el pH hasta 8,6 no se observan cambios significativos el grado de hinchamiento del hidrogel, observándose que no varía el grado de captación de disolución de estos sistemas (Akerman y col. 1998; Vakkalanka y col. 1996). En nuestro caso, no observamos mayores diferencias en la captación de agua a pH 7,4 y 8,0; esto nos indica que probablemente los grupos carboxílicos estén su mayoría ionizados a pH 7,4 y no existe un aumento en su grado de ionización al incrementar el pH hasta 8,0. Además, como en este estudio se emplearon hidrogeles reticulados, éstos no son capaces de incorporar líquido dentro de su estructura en forma indefinida ni son capaces de pasar al estado líquido. Los hidrogeles reticulados incorporan líquido en su estructura hasta que llegan al grado máximo de elasticidad de los polímeros que los constituyen (Gehrke y col. 1990).

Al adicionarle NaCl a la solución de carga de los hidrogeles, se mantiene una cinética de hinchamiento similar. Se logra el equilibrio de hinchamiento a tiempos semejantes, pero se reduce en un 70% la captación de agua por parte de estos sistemas (gráfico 12). Esto posiblemente se deba al cambio a que el grado de hinchamiento de los hidrogeles depende de la presión osmótica generada por los iones presentes (Kulicke y col. 1992). Así cuando se le adiciona NaCl a la solución de carga de los hidrogeles, estos sistemas captan menos disolución debido a un compromiso entre las presiones osmóticas generadas por el hidrogel y por la solución de carga.

Se encuentran diferencias estadísticamente significativas al adicionar NaCl para ambos sistemas de hidrogeles estudiados.

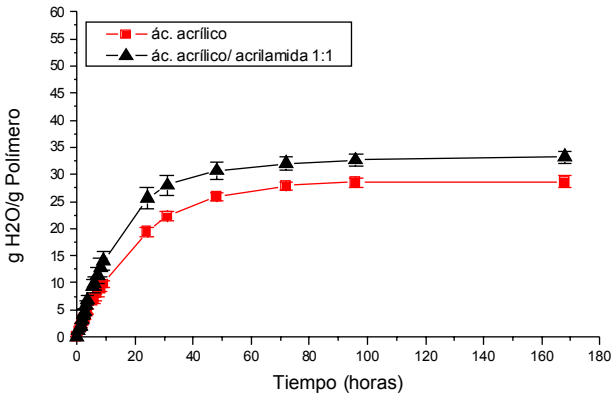


Gráfico 12: Cinética de hinchamiento de hidrogeles de ácido acrílico y ácido acrílico / acrilamida en una solución de Hepes 25 mM (pH 7,4) + NaCl 154 mM.

A partir de los resultados obtenidos, podemos afirmar que existen diferencias en el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles. Las diferencias encontradas dependen del pH

utilizado, del polímero que los constituye y de la presencia de sales (NaCl) en la disolución de carga.

Además de la cinética de hinchamiento, estos sistemas se caracterizaron físicamente. En la gráfica 13 y en la figura 22 podemos observar el cambio en el volumen y en la altura que experimentan los hidrogeles sintetizados. En ambos casos, se observa un gran aumento en los parámetros físicos estudiados, siendo siempre mayor el porcentaje de aumento para los hidrogeles sintetizados con ácido acrílico.

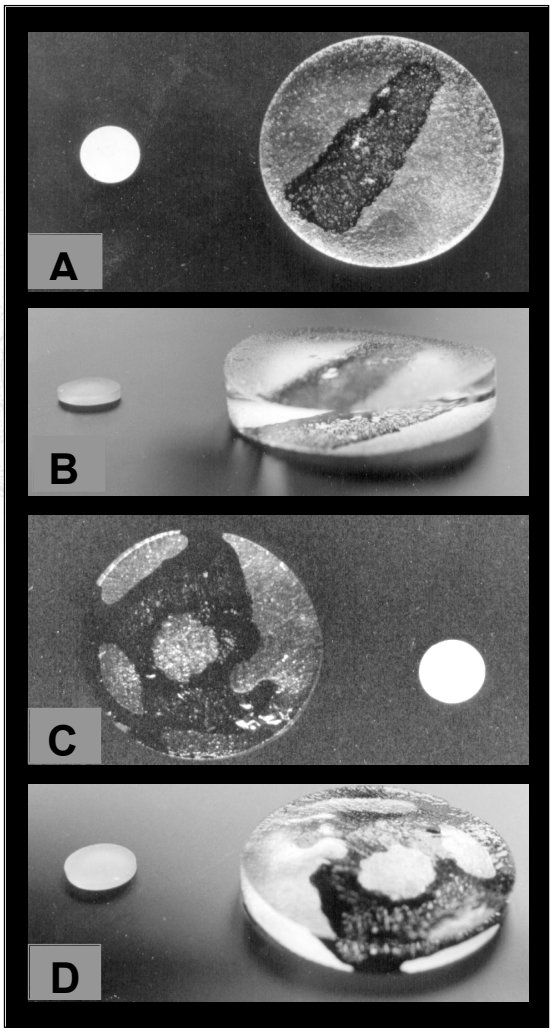


Figura 22: Fotografías de xerogeles e hidrogeles. A) y B) ácido acrílico; C) y D) ácido acrílico / acrilamida 1:1

Al analizar estadísticamente los resultados relacionados con el aumento de las dimensiones de los hidrogeles sintetizados, observamos que existen diferencias estadísticamente significativas para los diferentes pH en un mismo hidrogel y entre los diferentes hidrogeles para los diferentes pH. Sin embargo, cuando se adiciona NaCl a la solución de hinchamiento de los hidrogeles no se encuentran diferencias estadísticamente significativas.

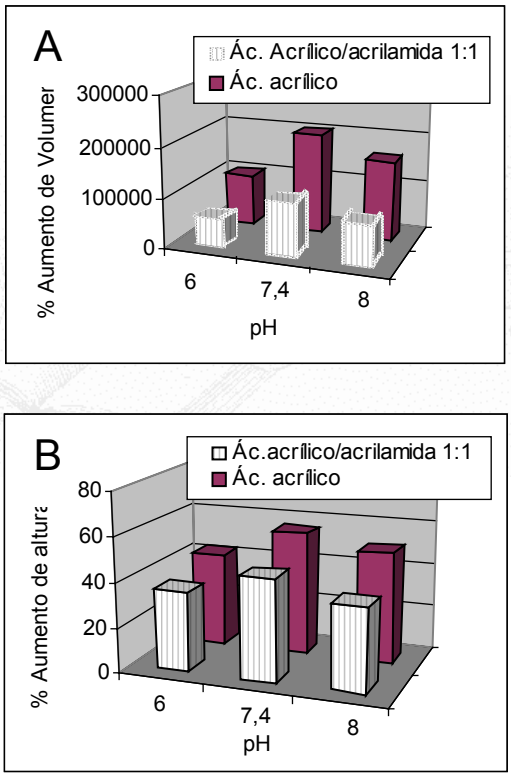


Gráfico 13: Porcentaje de aumento en las dimensiones de hidrogeles hinchados en solución de Hepes 25 mM, pH 7,4. A) % de aumento de volumen. B) % de aumento de altura.

3.3 Determinación del pH en el interior de los hidrogeles

Se midió este parámetro para determinar si el pH de carga de los hidrogeles tiene relación con el pH que estos sistemas alcanzan en su interior. Esto es importante para establecer si el fármaco que vamos a introducir en ellos es estable tanto en la disolución de carga como en el interior del vehículo que lo va a contener.

Se observa que el pH en el interior de los hidrogeles (tabla 10) es, en la mayoría de los casos, mayor para aquellos hidrogeles constituidos por ácido acrílico/ acrilamida 1:1, si bien esta diferencia es escasa (media unidad de pH). En todos los casos se encuentra el pH en valores cercanos a 6,0.

Hidrogel	pH de hinchamiento	pH en el interior
ácido acrílico	6,0	5,0
	7,4	6,0
	8,0	6,5
ácido acrílico/ acrilamida 1:1	6,0	5,5
	7,4	6,5
	8,0	6,5

Tabla 10: pH en el interior de los hidrogeles sintetizados

Los valores de pH encontrados en el interior de los hidrogeles difieren en una o una y media unidad respecto del pH de carga de estos sistemas. Sin embargo, el pH alcanzado en el interior de estos sistemas los hace adecuados para ser utilizados como vehículos para la administración transdérmica de MTX.

3.4 Estudio de captación de MTX en los hidrogeles

En el gráfico 14 se observa la cantidad de MTX encontrada en la disolución de carga de los dos hidrogeles sintetizados antes y después de alcanzar el equilibrio de hinchamiento. Para esto fue necesario cuantificar el volumen de disolución al iniciar y al finalizar el proceso de hinchamiento de los hidrogeles. En ambos casos, se cuantifica una cantidad de MTX menor que la esperada teóricamente, esto indica que la disolución del fármaco no penetra homogéneamente a través de los hidrogeles y que el disolvente tiene mayor facilidad para penetrar dentro de la estructura polimérica que el soluto.

Las cantidades de MTX encontradas para ambos hidrogeles son del mismo orden, siendo algo superiores para los hidrogeles sintetizados con ácido acrílico/ acrilamida 1:1. Esto podría deberse a que la red polimérica formada por los copolímeros es más compacta en relación con la formada

por el ácido acrílico, y por lo tanto hay un menor espacio entre las cadenas para que difunda el principio activo.

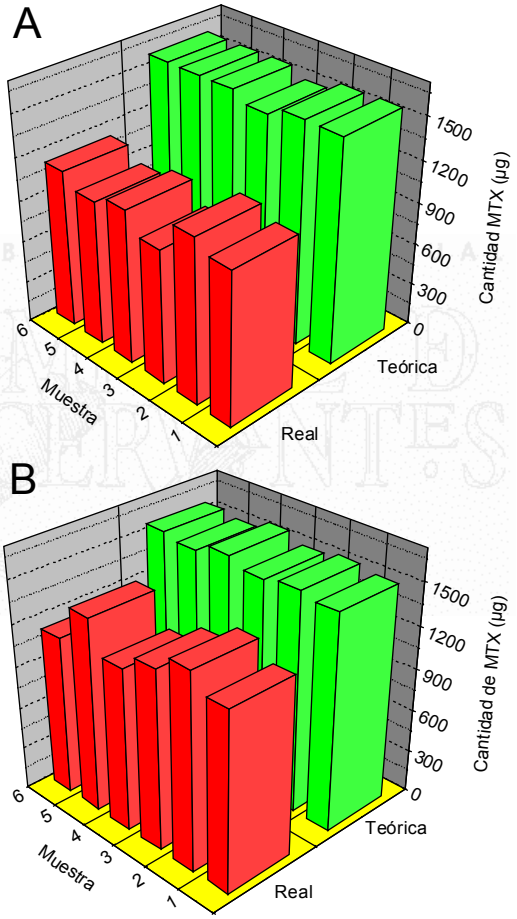


Gráfico 14: Cantidad de MTX encontrada en la solución de carga de los hidrogeles. A) Hidrogel ácido acrílico B) Hidrogel ácido acrílico/ acrilamida 1:1.

Al analizar la cantidad de MTX que es capaz de retener la red polimérica del hidrogel (gráfico 15), también se observa una menor cantidad de fármaco que la esperada teóricamente. Al realizar un balance de masas entre el MTX adicionado y el cuantificado en el hidrogel, vemos que la recuperación de este fármaco es de alrededor del 90%. Esto nos indica que hay alrededor de un 10% de este fármaco que no es cedida al medio y que queda atrapada dentro de la red polimérica.

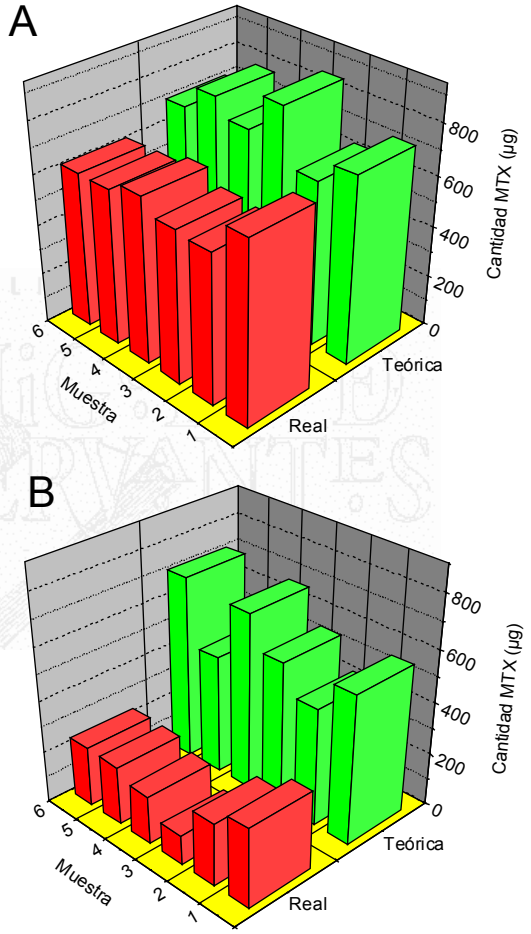


Gráfico 15: Cantidad de MTX en el interior de los hidrogeles. A) Hidrogel ácido acrílico. B) Hidrogel ácido acrílico/ acrilamida 1:1.

3.5 Estudio de distribución del MTX dentro de los hidrogeles

En los dos hidrogeles sintetizados se observa una distribución homogénea del MTX en su interior (gráfico 16).

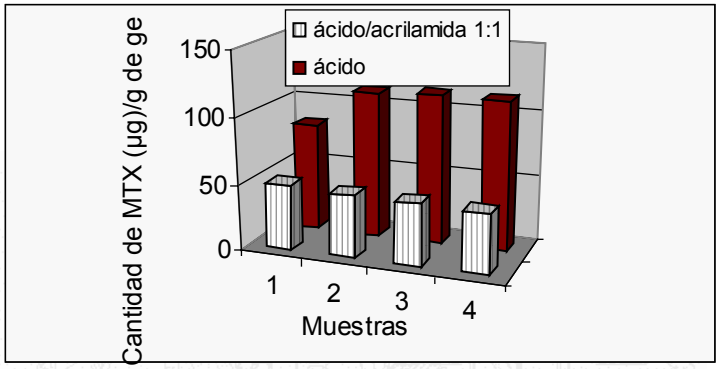


Gráfico 16: Distribución de MTX en el interior de los hidrogeles sintetizados.

Con los resultados obtenidos, podemos afirmar que el MTX se distribuye homogéneamente dentro del hidrogel. Se puede calcular entonces, qué cantidad de fármaco hay en una porción determinada de hidrogel suponiendo homogeneidad del sistema.

4. Paso transdérmico de metotrexato a partir de hidrogeles utilizando la técnica de iontoforesis

4.1 Montaje del experimento

La mayor dificultad en el montaje de este sistema fue la introducción del alambre de plata por uno de los conductos que comunican con el compartimento receptor. Es importante introducir el alambre de plata, controlando que no hayan filtraciones de la disolución receptora hacia el exterior del sistema. Además, es necesario tener una cantidad suficiente de plata que permita el paso de corriente eléctrica durante las 10 horas de estudio. Para esto, se enrolló el alambre de plata en el interior del compartimento receptor de modo de obtener la mayor cantidad de plata disponible. El sistema así montado nos permitió realizar los experimentos necesarios, pero no pudimos tomar más de una muestra por experimento debido a que se detectaban cantidades de MTX a tiempos menores de las 10 horas y tampoco fue posible introducir mayor cantidad de plata al sistema para poder tomar más de una muestra por experimento.

A pesar de ser los hidrogeles más resistentes al paso de corriente eléctrica que las disoluciones; los voltajes medidos durante todo el tiempo de ensayo se mantuvieron dentro de valores permitidos (<10mV). Esto nos indica que los hidrogeles son adecuados para ser utilizados como vehículos en el transporte iontoforético del MTX.

La introducción de MTX en el interior de los hidrogeles fue sencilla y no presentó dificultades. No se pudieron cargar los hidrogeles con soluciones de mayor concentración que 200 µg/mL ya que si esta concentración se aumenta, la disolución no penetra homogéneamente en el interior del hidrogel y queda parte del MTX depositado en forma sólida sobre su superficie.

Se calculó la cantidad teórica aproximada de MTX que contenían estos sistemas al comenzar el estudio de difusión (tabla 11). Para ello, se pesaron dichos vehículos al inicial y al finalizar el proceso de hinchamiento, calculándose además, la densidad de la solución de carga. La cuantificación de MTX en el interior del hidrogel es importante ya que tenemos que asegurar que durante todo el tiempo de experimentación exista suficiente cantidad de MTX en el donante para asegurar así condiciones sink.

Tipo de hidrogel	Cant. MTX hidrogel (µg) (conc. solución carga 120 µg/mL)	Cant. MTX hidrogel (µg) (conc. solución carga 200 µg/mL)
ácido acrílico	328	542
ácido acrílico/ acrilamida 1:1	311	514

Tabla 11 Cantidad de MTX en el interior de los hidrogeles para los estudios de iontoforesis.

En esta serie de experimentos, fue necesario adicionar unas gotas de solución receptora a la piel antes de comenzar el estudio. Los hidrogeles obtenidos son bastante compactos y para que su contacto con la piel sea homogéneo, es importante la humectación previa de este órgano.

4.2 Cuantificación de MTX

Los parámetros determinados para cada curva de calibración realizada se muestran en la tabla 12.

Por medio de los parámetros antes calculados, podemos concluir que ambas rectas son lineales, proporcionales y equivalentes entre ellas. Se puede afirmar que el método de valoración de MTX escogido es adecuado para su cuantificación.

Curva	C.V. factor f (área/cantidad inyectada)	r	Ecuación de la recta: cantidad MTX (µg) vs área
1	1,87	0,9995	A = -22435,99 ± 42076,14 B = 1326750 ± 18040,74
2	1,42	0,9995	A = -23366,41 ± 40276,84 B = 1323360 ± 17269,26

Tabla 12: Parámetros de validación de las curvas de calibración de MTX realizadas mediante HPLC. Fase móvil: ácido fosfórico 0,05M (pH 2,7) / acetonitrilo 84:16. Longitud de onda: 303 nm.

El límite de detección del método empleado fue de 2 µg/mL.

4.3 Determinación de MTX en la solución receptora

En el gráfico 17 se muestra la cantidad de MTX cuantificada en la solución receptora después de pasar una corriente equivalente a 0,5 mA/cm^2 durante 10 horas en los sistemas hidrogeles estudiados.

La cantidad de MTX retenido en la piel (tabla 13) es bastante menor a la cantidad obtenida para soluciones de MTX. Es importante considerar, que los valores obtenidos para ambos estudios no son comparables directamente ya que en los estudios con soluciones se emplearon soluciones donantes de mayor concentración en MTX. Además, el MTX contenido en el interior de los hidrogeles tiene mayor dificultad para su movilización, ya que debe atravesar una red polimérica para poder liberarse.

Tipo de hidrogel	Cant. MTX. Sol. recep. 10 hrs. (µg/cm^2) (conc. solución carga 120 µg/mL)	Cant. MTX. Sol. recep. 10 hrs. (µg/cm^2) (conc. solución carga 200 µg/mL)
ácido acrílico	1,52 ± 0,41	1,69 ± 0,42
ácido acrílico/ acrilamida 1:1	0,98 ± 0,32	1,39 ± 0,29

Tabla 13: Cantidad de MTX en la solución receptora para estudios de iontoforesis en hidrogeles. (Tª = ambiente, n = 6).

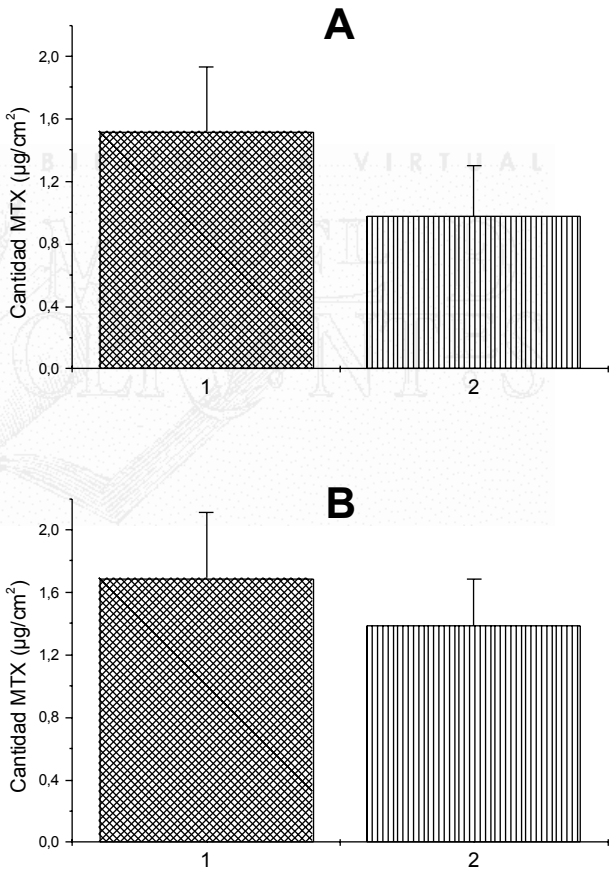


Gráfico 17: Cantidad de MTX en la solución receptora a las 10 horas. 1: Hidrogel de ácido acrílico. 2: Hidrogel de ácido acrílic/: acrilamida 1:1. A) Solución de carga 120 µg/mL de MTX. B) Solución de carga 200 µg/mL de MTX.

El número de transporte aparente calculado para los diferentes experimentos realizados con hidrogeles, se mantiene prácticamente constante. Se alcanzan valores que van desde 1,2 x 10^{-5} hasta 2,0 x 10^{-5}. Se observa que con el uso de hidrogeles se disminuye en alrededor un orden de magnitud este valor en comparación con los estudios de soluciones de este fármaco.

Sin embargo, vemos que la iontoforesis aplicada a hidrogeles aumenta la penetración del MTX con relación a la difusión pasiva de este fármaco. En hidrogeles se determina una pequeña cantidad de MTX en la solución receptora después de 10 horas de comenzado el estudio en comparación con la difusión pasiva donde prácticamente no se detecta MTX en la solución receptora.

Observamos que la composición del hidrogel no es un parámetro que determine la cantidad de MTX que penetra a través de la piel ya que sólo se detectan diferencias significativas entre ambos tipos de hidrogeles cuando se cargan estos sistemas con una solución de 120 µg/mL. Tampoco la concentración de la solución de carga parece ser un factor que determine la cantidad de este fármaco que pasa a través de la piel ya que sólo se detectan diferencias significativas en el caso de los hidrogeles de ácido acrílico/ acrilamida 1:1.

4.4 Determinación de MTX en la piel

La cantidad de MTX cuantificada en la piel después de 10 horas de estudio, estuvo entre los valores 0,3 y 3,4 g/cm^2, valores individuales, no valores promedio (tabla 14).

Tipo de hidrogel	Cant. MTX piel. (µg/cm^2) (conc. solución carga 120 µg/mL)	Cant. MTX piel. (µg/cm^2) (conc. solución carga 200 µg/mL)
ácido acrílico	1,56 ±1,13	1,30 ± 0,61
ácido acrílico/ acrilamida 1:1	2,59 ± 0,64	1,52 ± 0,78

Tabla 14: Cantidad de MTX en la piel para estudios de iontoforesis con hidrogeles. (Tª = ambiente, n = 6).

El análisis estadístico de los resultados no nos permite generalizar el comportamiento de estos sistemas, ya que la cantidad de MTX que queda en la piel sólo depende de la composición del hidrogel en el caso de los hidrogeles de ácido acrílico/ acrilamida 1:1 y de la cantidad de MTX en la solución de carga, para los hidrogeles que se cargan con una solución de 120 µg/mL.

Desgraciadamente, no se pudo llevar a cabo un estudio más profundo del paso iontoforético de MTX empleando hidrogeles como vehículos. La concentración de MTX en la solución de carga de estos sistemas estaba limitada: trabajando con concentraciones inferiores a 120 µg/mL estaríamos

trabajando por debajo del límite de detección del método de cuantificación empleado, trabajando con concentraciones mayores a 200 µg/mL se observa precipitación del MTX en la superficie del gel lo que nos indica que la penetración de la disolución de carga no es homogénea. Además, no fue posible introducir una mayor cantidad de plata al sistema, esto nos hubiese permitido tomar más de una muestra por experimento y de este modo, caracterizar mejor el transporte iontoforético de MTX empleando hidrogeles. Otro parámetro que se pudiese haber estudiado es la influencia de la cantidad de corriente aplicada, sin embargo en nuestro caso, estamos trabajando con la máxima cantidad de corriente permitida y la cantidad de MTX cuantificada está cercana al límite de cuantificación de la técnica empleada. En conclusión, habría sido interesante estudiar la influencia de ciertos parámetros como la concentración de fármaco y la corriente eléctrica empleada en la penetración iontoforética de MTX contenido en hidrogeles, pero por las características del montaje empleado y por el límite de detección de nuestro método de cuantificación, esto no fue posible.

Con los resultados obtenidos, podemos concluir que posiblemente los hidrogeles de ácido acrílico y ácido acrílico/ acrilamida 1:1 sean buenos vehículos para incorporar el MTX y permitir su penetración iontoforética a través de la piel. Son sistemas estables frente al paso de la corriente eléctrica y que permiten la difusión de este fármaco a través de su red polimérica. Sin embargo, sería importante diseñar un montaje que permitiera trabajar con una mayor área de contacto entre en hidrogel y la piel. Así se podrían estudiar más detalladamente los factores que influyen en el transporte de este fármaco.

5. Microemulsiones

5.1 Preparación de las microemulsiones

Las microemulsiones empleadas en este estudio fueron previamente caracterizadas por nuestro grupo de investigación (Liz-Marzán 1992, Delgado-Charro y col. 1997, Baroli y col. 2000). Una característica importante de estos sistemas es que emplean surfactantes y cosurfactantes no irritantes y susceptibles de ser usados en forma tópica.

Desgraciadamente tuvieron que emplearse dos sistemas de microemulsiones diferentes para poder estudiar la influencia del tipo de microemulsión empleada (O/W ó W/O). El sistema EM es capaz de formar los dos tipos de microemulsiones, sin embargo, la zona de microemulsiones del tipo O/W es sumamente estrecho y si se varía la composición del sistema en forma mínima, el sistema se desestabiliza. El sistema OE sólo presenta zonas de estabilidad para microemulsiones del tipo O/W.

Para este estudio, se elaboraron 8 microemulsiones diferentes, todas ellas escogidas en zonas de estabilidad de sus correspondientes diagramas de fases. La formación y estabilización de las microemulsiones, para todos los casos estudiados, fue casi instantánea.

Al adicionar MTX a las microemulsiones ya formadas no se produjo opalescencia de las mismas, lo que nos indica que estos sistemas mantienen su estabilidad cuando se les incorpora el fármaco.

5.2 Cuantificación del MTX en las microemulsiones

Los parámetros determinados para cada curva de calibración realizada se muestran en la tabla 15.

Por medio de los parámetros antes calculados, podemos concluir que ambas rectas son equivalentes y que por lo tanto, el método de valoración de MTX escogido es adecuado para su cuantificación.

Curva	r	Ecuación de la recta: cantidad MTX (µg) vs área
1	0,9992	A = -0,01096 ± 0,01382 B = 0,04751 ± 0,00108
2	0,9995	A = -0.01341 ± 0,00632 B = 0,0428 ± 0,00052

Tabla 15: Parámetros de validación de las curvas de calibración de MTX realizadas en espectrofotómetro utilizando como solvente etanol. Longitud de onda: 304 nm.

5.3 Estudio de solubilidad del MTX en las microemulsiones

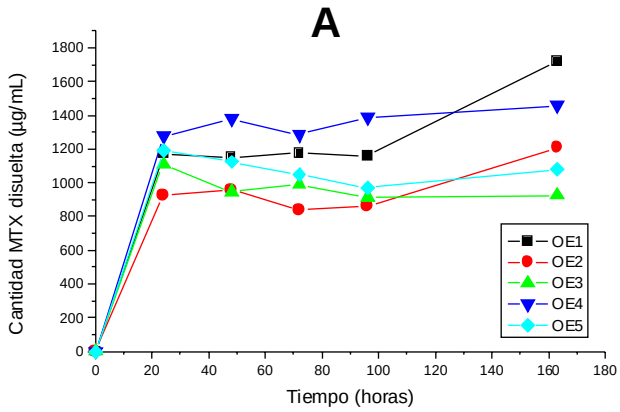
Este estudio tenía por finalidad determinar qué cantidad máxima de MTX podíamos disolver en cada una de las microemulsiones empleadas.

En el gráfico 18 se muestra la cinética de disolución del MTX para los dos sistemas de microemulsiones estudiados. No se incluyeron en las gráficas las correspondientes desviaciones estándares para claridad de los mismas, pero se incluyen en la tabla de solubilidad (tabla 16).

Observamos que se alcanza el equilibrio de disolución del MTX a las 48 horas aproximadamente (con excepción de algunos sistemas que aumentan levemente el poder de disolución de este fármaco a partir de las 96 horas). Los valores de solubilidad del MTX, para cada una de las formulaciones estudiadas, se muestra en la tabla 16.

Microemulsión	Solubilidad MTX (µg/mL)
OE1	1275,81 ± 249,26
OE2	958,60 ± 147,73
OE3	977,50 ± 79,87
OE4	1357,87 ± 76,39
OE5	1083,38 ± 81,90
EM1	669,60 ± 168,72
EM2	595,23 ± 57,203
EM3	335,92 ++ 78,61

Tabla 16: Solubilidad del MTX en las diferentes microemulsiones estudiadas (n=6).



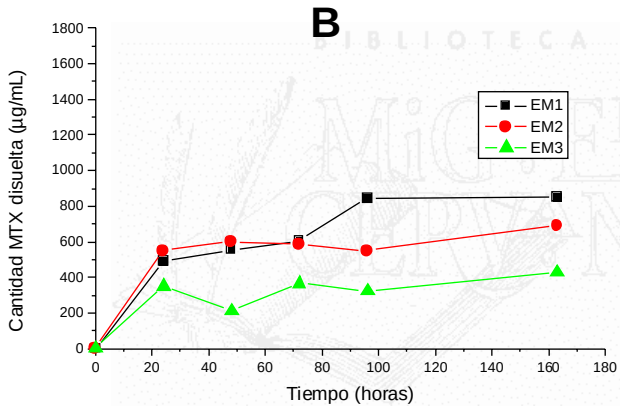


Gráfico 18: Cinética de disolución de MTX contenido en microemulsiones. A) Sistema labrasol: plurol isoesteárico (S +C)/ oleato de etilo (O)/ solución salina (W). B) Sistema Tween 80: Span 80: 1,2-octanodiol (S+C)/ miristato de isopropilo (O)/ agua (W) (Tª = 37ºC, n= 4).

El sistema que emplea oleato de etilo como fase oleosa (OE) posee mayor poder de solubilización del MTX comparado con el sistema que emplea miristato de isopropilo (EM), para cualquiera de los casos estudiados. Esto podría deberse a que las microemulsiones formadas en ambos sistemas son de diferentes características: las primeras son del tipo O/W y las segundas, del tipo W/O y el MTX por ser un compuesto hidrosoluble, tiene mayor afinidad por la fase acuosa y por constituir esta fase, la fase externa de las microemulsiones que emplean oleato de etilo, se logra solubilizar una mayor cantidad de fármaco.

No se detectan diferencias significativas en la cantidad de MTX disuelta para cada uno de los sistemas estudiados (OE y EM), es decir, las proporciones entre los distintos componentes de la microemulsión no determinan de forma apreciable, un cambio en la solubilización de este fármaco.

A pesar de que las microemulsiones son sistemas que pueden aumentar la solubilidad de ciertos principios activos (Eccleston 1994; Kim y col. 1997), en nuestro caso no observamos este fenómeno. Las soluciones de fármaco empleadas en este estudio, permiten disolver casi el doble de MTX en comparación con las microemulsiones.

5.4 Estudio de difusión pasiva de microemulsiones de MTX

Tanto el tratamiento de la piel utilizada como el montaje del experimento no presentaron mayores dificultades. La obtención de la piel se realizó de igual manera que en experimentos anteriores y el montaje del experimento fue el mismo que el empleado para los estudios de difusión pasiva de soluciones de MTX (materiales y métodos 5.4).

- ***Determinación del MTX en la solución receptora:***

Para realizar los estudios de difusión pasiva de MTX desde microemulsiones, se escogieron aquellas microemulsiones que permitieran disolver una mayor cantidad de principio activo. También se consideró importante en la elección de estos sistemas, el porcentaje de las fases que las constituyen para evaluar si la proporción de las fases es un parámetro que influye en la penetración del MTX a través de la piel.

Del sistema que emplea oleato de etilo, se escogieron las formulaciones OE1, OE3 y OE4. Las dos primeras microemulsiones contienen igual cantidad de fase oleosa (10%) y sólo cambia la proporción entre los otros componentes (fase acuosa y surfactante/ cosurfactante). La formulación OE4 contiene el doble de fase oleosa en relación con las microemulsiones OE1 y OE3. La elección de estas microemulsiomes se realizó con el fin de ver como influye la proporción de las fases acuosa y del surfactante/ cosurfactante y a la vez, como influye la proporción de fase oleosa en la cesión del principio activo.

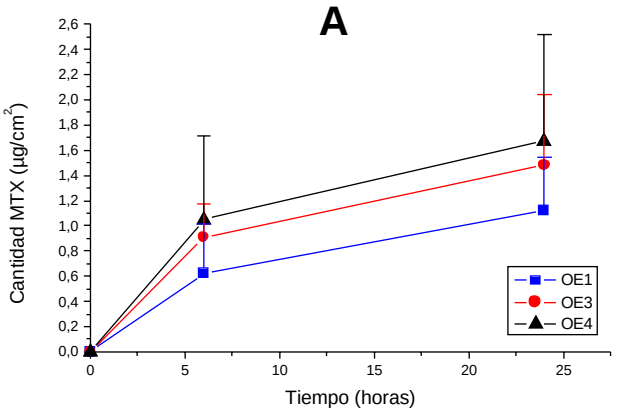
Del sistema que emplea miristato de isopropilo, se escogieron las formulaciones EM1 y EM2 básicamente porque son las microemulsiones que tienen mayor capacidad de solubilización del MTX. En este caso, las microemulsiones escogidas se encuentran en el diagrama de fases sobre la misma línea respecto a la proporción de fase acuosa (15%). Estos sistemas se escogieron para estudiar la influencia de la proporción de los otros componentes que la constituyen (el componente que representa la fase oleosa y el surfactante/ cosurfactante).

Se hicieron dos ensayos de difusión pasiva con cada formulación, lo que se varió en ellos fue la concentración de MTX en la microemulsión donante. Como todas las microemulsiones disuelven diferente cantidad de principio activo, se decidió trabajar con porcentaje de saturación respecto de la solubilidad de cada formulación. Para estos estudios se escogieron las saturaciones del 80 y 50%.

En los gráficos 19 y 20 se muestra la cantidad de MTX cuantificado en la solución receptora en los estudios de difusión pasiva para microemulsiones con un 80% y 50% de saturación respecto del MTX respectivamente.

Aunque el empleo de microemulsiones como vehículos de administración transdérmica produce un incremento en la penetración de MTX a través de la piel respecto de la difusión pasiva de soluciones de este fármaco; la penetración es inferior a la alcanzada empleando la técnica de iontoforesis aplicada a dichas soluciones.

Si ahora comparamos estos sistemas con la iontoforesis desde hidrogeles de MTX, se aprecian diferencias sólo para la microemulsión EM2. Es importante considerar, que nuevamente la comparación no es directa entre ambos experimentos realizados, ya que los tiempos de muestreo para ambos experimentos son diferentes. Para hacer el análisis estadístico comparamos la única medida hecha para los hidrogeles y que corresponde a las 10 horas de muestreo con la cantidad de MTX acumulada luego de 24 horas para las microemulsiones.



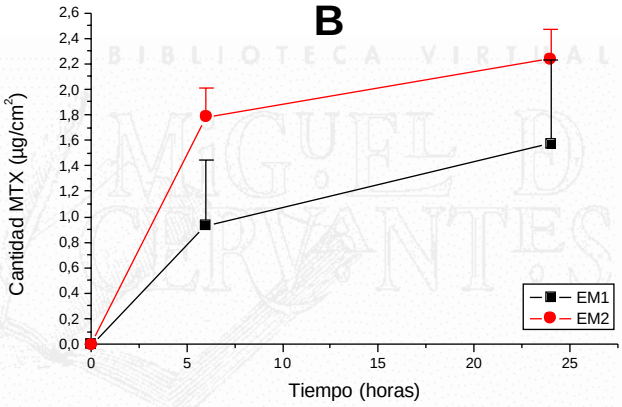


Gráfico 19: Cantidad de MTX en la solución receptora para estudios de difusión pasiva de microemulsiones saturadas al 80% de MTX. A) Microemulsiones de labrasol: plurol isoesteárico/ oleato de etilo/ agua. B) Microemulsiones de: Tween 80: Span 80: 1,2-octanodiol/ miristato de isopropilo/ agua. (Tª = 37ºC, n= 6).

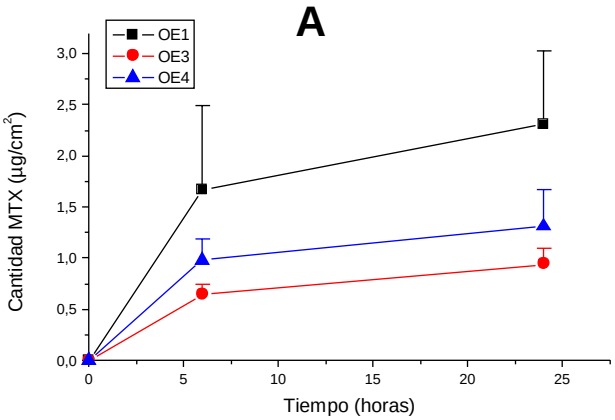


Gráfico 20: Cantidad de MTX en la solución receptora para estudios de difusión pasiva de microemulsiones saturadas al 50% de MTX. A) Microemulsiones de labrasol: plurol isoesteárico/ oleato de etilo/ agua. B) Microemulsiones de: Tween 80: Span 80: 1,2-octanodiol/ miristato de isopropilo/ agua. (Tª = 37ºC, n= 6).

El resumen de la cantidad de MTX cuantificada en la solución receptora para los diferentes estudios realizados, se muestra en la tabla 17.

Tipo de microemulsión	Saturación de MTX respecto de la solubilidad	MTX a las 6 horas ($\mu g/cm^2$)	MTX a las 24 horas ($\mu g/cm^2$)
OE1	80%	0,62 ± 0,40	1,12 ± 0,42
OE1	50%	1,67 ± 0,82	2,31 ± 0,71
OE3	80%	0,91 ± 0,26	1,48 ± 0,56
OE3	50%	0,64 ± 0,11	0,94 ± 0,15
OE4	80%	1,05 ± 0,66	1,67 ± 0,85
OE4	50%	0,98 ± 0,21	1,31 ± 0,36
EM1	80%	0,93 ± 0,51	1,57 ± 0,66
EM1	50%	0,34 ± 0,27	0,72 ± 0,28
EM2	80%	1,78 ± 0,23	2,24 ± 0,23
EM2	50%	0,41 ± 0,22	0,58 ± 0,23

Tabla 17: Cantidad de MTX en la solución receptora para los diferentes estudios de difusión pasiva de microemulsiones. (Tª: 37ºC; promedio ± D.S.; n = 6).

Analizando los resultados que emplean microemulsiones al 80% de saturación, observamos que no se detectan diferencias en el grado de penetración del MTX a través de la piel. No existen diferencias ni entre los dos sistemas de microemulsiones estudiados (OE y EM) ni entre las diferentes formulaciones para un mismo sistema. Sin embargo, al trabajar con microemulsiones saturadas al 50% en MTX, si se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas estudiados. Se debe considerar que se está trabajando con grados de saturación, lo que no significa que las microemulsiones empleadas tengan igual concentración de MTX. Lo observado podía deberse a que el paso de MTX a través de la piel presente un comportamiento lineal en un cierto rango de concentraciones, pero que a concentraciones superiores se pierda esa linealidad. Desgraciadamente, por tener que emplear dos sistemas de microemulsiones distintos, que difieren tanto en su fase oleosa como en el surfactante y cosurfactante utilizado, es prácticamente imposible estudiar más detalladamente este hecho trabajando en zonas de estabilidad de las microemulsiones correspondientes. Lo ideal hubiera sido poder estudiar un sistema de microemulsiones en donde dependiendo de la proporción de sus componentes tuviéramos microemulsiones del tipo O/W ó W/O y que la zona de estabilidad de ambos tipos de microemulsiones permitiera cambios importantes en su composición, sin producir desestabilización del mismo.

Estudiando por separado cada microemulsión elaborada, es decir, la OE1, la OE4, etc. Se observa que en todas ellas, exceptuando la OE5, se aprecian diferencias en la cantidad de MTX que pasa a través de la piel comparando las microemulsiones al 80 y al 50% de saturación.

Existen estudios que comparan las microemulsiones O/W ó O/W con otros vehículos para la administración transdémica de fármacos, como son las lociones, suspensiones, geles o emulsiones (Linn y col. 1990; Trotta y col 1997, Gasco y col. 1991). Se observa que las microemulsiones tienen mayor capacidad de liberar principios activos hacia la piel. Esto posiblemente se deba, entre otras cosas, a que el fármaco contenido en una microemulsión está disuelto y por lo tanto, su absorción es más rápida y efectiva. En nuestro caso, observamos un incremento significativo en el paso de MTX desde microemulsiones respecto a la difusión pasiva de soluciones de este fármaco, pero es menor que el cuantificado para estudios de iontoforesis con soluciones (Weintein y col. 1989). Posiblemente el transporte iontoforético de MTX contenido en soluciones sea mayor al encontrado en las microemulsiones porque nuestra molécula posee una solubilidad menor en las microemulsiones respecto de las soluciones empleadas.

Otro estudio evalúa la difusión de MTX desde microemulsiones W/W (Trotta y col. 1996), utilizando piel de ratón sin pelo. En ellos determinaron que la penetración de MTX a través de la piel fue de alrededor de 4 – 5 $\mu g/cm^2$ por hora. Por ser estos valores bastante superiores a los encontrados en nuestro estudio, al parecer la difusión del MTX, por ser un compuesto hidrosoluble, se ve favorecida cuando está incorporado en vehículos acuosos. En nuestro caso, aunque las diferencias no siempre sean estadísticamente significativas, siempre se observa que existe mayor transporte de MTX desde las microemulsiones de fase externa acuosa (microemulsiones tipo OE).

- ***Determinación del MTX en la piel:***

La cantidad de MTX encontrada en la piel para los diferentes estudios realizados con microemulsiones se muestra en los gráficos 21 y 22. El resumen de los resultados obtenidos se muestra en la tabla 18.

En la cantidad de MTX cuantificada en la piel, observamos un comportamiento semejante al obtenido en el análisis de la cantidad de MTX cuantificada en la solución receptora. No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en las microemulsiones al 80% de saturación de este principio activo y si se observan en la mitad de los casos para la saturación del 50%. Sin embargo, para cada formulación elaborada, se aprecian diferencias en la cantidad de MTX retenido en la piel para las diferentes grados de saturación de MTX empleados.

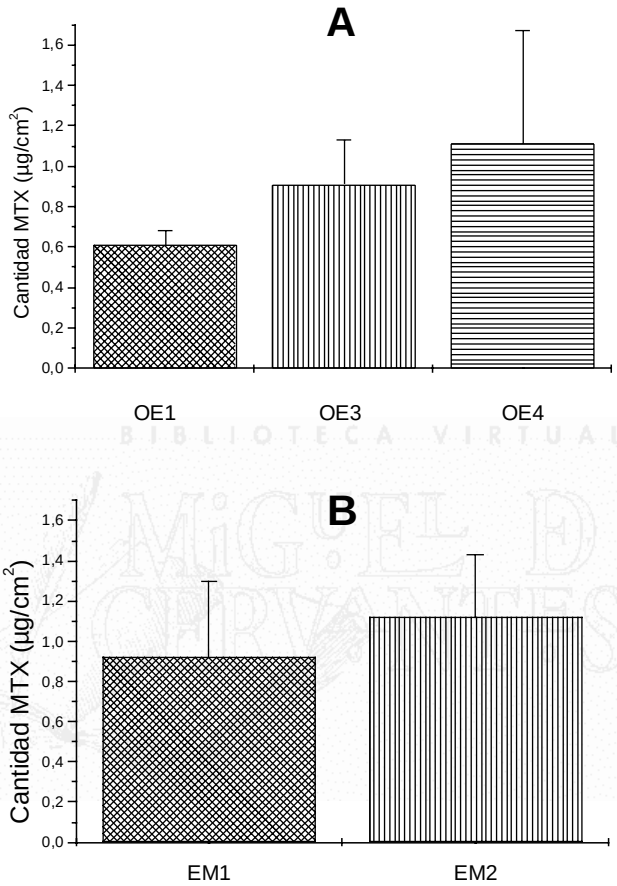
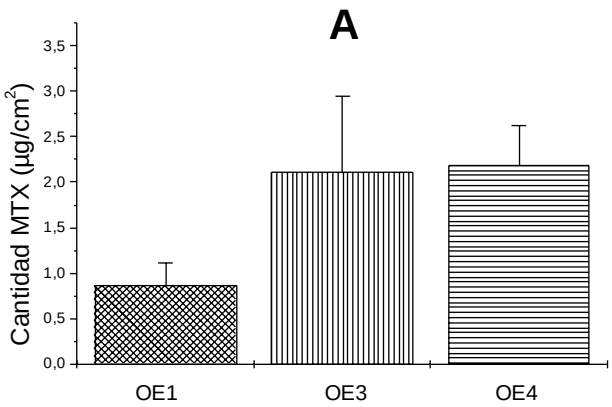


Gráfico 21: Cantidad de MTX en la piel para estudios de difusión pasiva de microemulsiones saturadas al 80% de MTX. A) Microemulsiones de labrasol: plurol isoesteárico/ oleato de etilo/ agua. B) Microemulsiones de: Tween 80: Span 80: 1,2-octanodiol/ miristato de isopropilo/ agua. (n= 6).



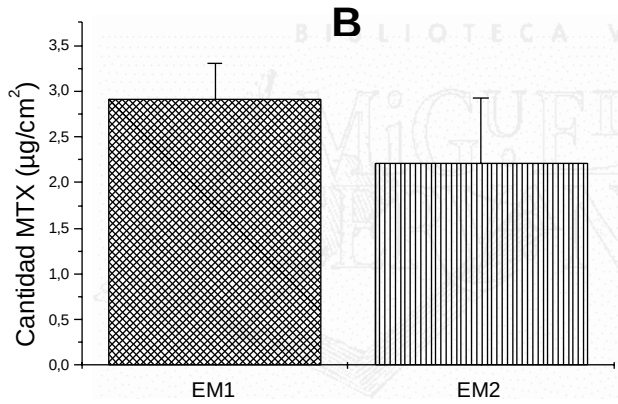


Gráfico 22: Cantidad de MTX en la piel para estudios de difusión pasiva de microemulsiones saturadas al 50% de MTX. A) Microemulsiones de labrasol: plurol isoesteárico/ oleato de etilo/ agua. B) Microemulsiones de: Tween 80: Span 80: 1,2-octanodiol/ miristato de isopropilo/ agua. (n= 6)

Tipo de microemulsión	Saturación de MTX respecto de la solubilidad	MTX en la piel (µg/cm^2)
OE1	80%	0,61 ± 0,07
OE1	50%	0,86 ± 0,25
OE3	80%	0,91 ± 0,22
OE3	50%	2,11 ± 0,83
OE4	80%	1,11 ± 0,56
OE4	50%	2,19 ± 0,44
EM1	80%	0,92 ± 0,38
EM1	50%	2,91 ± 0,39
EM2	80%	1.12 ± 0,31
EM2	50%	2,21 ± 0,72

Tabla 18: Cantidad de MTX en la piel para los diferentes estudios de difusión pasiva de microemulsiones. (Tª: 37ºC; promedio ± D.S.; n = 6).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Las cantidades de MTX cuantificadas en estos estudios son semejantes a las obtenidas para los estudios de iontoforesis de hidrogeles, sin embargo, son bastante menores a las obtenidas para la iontoforesis de soluciones de este principio activo.

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Conclusiones

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

1. El MTX, cuando se emplean soluciones como vehículos de administración transdérmica, penetra escasamente a través de la piel por mecanismos de difusión pasiva.

2. La técnica de iontoforesis, aplicada tanto a soluciones como a hidrogeles que contienen MTX, producen un aumento en la penetración transdérmica de este fármaco.

3. Estudiando los factores que influyen en la penetración iontoforética de MTX, empleando soluciones como vehículos de administración transdérmica, observamos que la fuerza iónica, modificada por la presencia de NaCl en la solución donante, y la corriente eléctrica aplicada al sistema; son parámetros que determinan el grado de penetración de este fármaco. Existe mayor penetración de MTX en ausencia de NaCl y empleando la mayor cantidad de corriente eléctrica permitida (0,5 mA/cm^2). Observamos en cambio, que la concentración de MTX en la solución donante (en el rango de concentraciones de 4,4 y 6,6 mM), no es un parámetro que determine la cantidad de MTX transportado.

4. No se observa liberación anódica de MTX, posiblemente debido a la baja solubilidad que presenta este fármaco en medio ácido.

5. La penetración iontoforética de MTX, empleando hidrogeles como vehículos de administración transdérmica, no depende del tipo de monómero o polímero que lo constituye (ácido acrílico o ácido acrílico / acrilamida 1:1) ni de la concentración de la solución de carga empleada (en el rango de concentraciones de 120 ó 200 µg/mL).

6. Si se emplean microemulsiones como vehículos de administración transdérmica de MTX, se produce un aumento de la penetración de este fármaco respecto de la difusión pasiva desde soluciones; sin embargo, este incremento en la penetración es menor al observado empleando la técnica de iontoforesis.

7. La concentración de MTX para los estudios de difusión pasiva empleando microemulsiones parece no tener una influencia determinante en la cantidad de MTX que penetra en la piel ya que sólo se observan diferencias estadísticamente significativas al trabajar con 50% de saturación de estos sistemas. La penetración transdérmica de MTX tampoco parece depender del tipo de microemulsión empleada (O/W ó W/O), ya que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre las microemulsiones EM y OE, ni de la composición relativa de las fases para una misma microemulsión.

8. Una cantidad de MTX siempre queda retenido en la piel para todos los estudios realizados.

9. El incremento en la penetración de MTX obtenido en este estudio hace posible la administración de este fármaco por vía tópica. Sin embargo, por no conocerse las concentraciones locales necesarias para su uso en el tratamiento local de la psoriasis, no podemos afirmar que el aumento de las concentraciones tópicas alcanzadas son las adecuadas para ejercer el efecto terapéutico requerido. No obstante, tanto las técnicas como los vehículos de administración transdérmica empleados en este estudio, son versátiles y pueden ser modificados y diseñados para lograr un aumento aún mayor de la penetración cutánea de este principio activo.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Bibliografía

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

Abraham, M. H.; Chadha, H.; y Mitchell; R. C. 1995. The factors that influence skin penetration of solutes. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*. 47 (8 - 16).

Adamson, A.W. 1990. *"Physical Chemistry of Surfaces"*. Jonh Wiley & Sons, Inc. U.S.A. 5ta Edición. Pág: 539 – 548.

Akerman, S.; Viinikka, P.; Svarfvar, B.; Jarvinen, K.; Kontturi, K.; Nasman, J.; Urtti, A. y Paronen, P. 1998. Transport of drugs across porous ion exchange membranes. *Journal of Controlled Release.* 50 (153 - 166).

Akimoto, T.; Aoyagi, T.; Minoshima, J. y Nagase, Y. 1997. Polymeric percutaneous drug penetration enhancer synthesis and enhancing property of PEG/PDMS block copolymer with a cationic and group. *Journal of Controlled Release*. 49 (229 - 241).

Andersson, M.; Axelsson, A. y Zacchi, G. 1997. Diffusion of glucose and insulinin a sewelling N-isopropylacrylamide gel. *International Journal of Pharmaceutics*. 157 (199 - 208).

Attwood, D. 1994. *"Colloidal Drug Delivery Systems".* Capítulo 2: Microemulsions. Kreuter, J. (ed). Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 31 - 71.

Banga, A. K. y Chien, Y. W. 1993. Hydrogel-based iontotherapeutic delivery devices for transdermal delivery of peptide/protein drugs. *Pharmaceutical Research*. 10 (5) (697 - 702).

Baroli, B.; López-Quintela, A.; Delgado-Charro, M. B.; Fadda, A. M. y Blanco-Méndez, J. 2000. Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen. *Journal of Controlled Release* 69 (209 - 218).

Bookbinder, S. A.; Espinoza, L. R.; Fenske, N. A.; Germain, B. F. y Vasey, F. B. 1984. Methotrexate: its use in the rheumatic diseases. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2 (185 - 193).

Bouwstra, J. A. y Junginger, H. E. 1993. *"Encyclopedia of Pharmaceutical Technology"*. Hydrogels. Swarbrick, J. y Boylan, J.C. (eds), Marcel Dekker, New York. Pág: 441 - 460.

Breithaupt, H.; Kuenzlen, E. y Goebel, G. 1982. Rapid high-pressure liquid chromatographic determination of metotrexate and its metabolites 7-hydroxymethotrexate and 2-4-diamino-N-methylpteroic acid in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 121 (103 - 113).

Broze, G. 1995. *"Solubilization in surfactant aggregates"*. Capítulo 15: Solubilization and detergency. Sherril, D.C. y Scarmeharn, J.F. (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 497 - 503.

Bruck, S. D. 1973. Aspects of three types of hydrogels for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research*. 7 (387 - 404).

Bucks, D. A. W. 1984. Skin structure and metabolism: Relevance to the design of cutaneous therapeutics. *Pharmaceutical Research*. 1 (148 - 153).

Burnette, R. R. y Marrero, D. 1986. Comparison between the iontophoretic and passive transport of tryrotropin releasing hormone across excited nude mouse skin. *Journal of Pharmaceutical Science*. 75 (8) (738 - 743).

Burnette, R. R. y Ongpipattanakul, B. 1987. Characterization of the permselective properties of excited human skin during iontophoresis. *Journal of Pharmaceutical Science*. 76 (10) (765 - 773).

Burnette, R. R. y Ongpipattanakul, B. 1988. Characterization of the pore transport properties and tissue alteration of excited human skin during iontophoresis. *Journal of Pharmaceutical Science*. 77 (2) (133 - 137).

Burnette, R. R. 1989. *"Transdermal Drug Delivery".* Capítulo 11: Iontophoresis. Hadgraft, J. y Guy R. H. (eds). Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 245 - 291.

Cercós-Fortea, T.; Casabó, V. G.; Nácher, A.; Cejudo-Ferragud, E.; Polache, A. y Merino, M. 1997. Evidence of competitive inhibition of methotrexate absorption by leucovorin calcium in rat small intestine. *International Journal of Pharmaceutics*. 155 (109 - 119).

Champetier, G. y Monnerie, L. 1973. *"Introducción a la química molecular".* Capítulo 2: Síntesis de macromoléculas. Espasa-Calpe, S.A., Madrid. Pág: 30-92.

Chatterjee, D. J.; Li, W. Y. y Koda, R. T. 1997. Effect of vehicles and penetration enhancers on the in vitro and in vivo percutaneous absortion of methotrexae and edatrexate through hairless mouse skin. *Pharmaceutical Research*. 14 (8) (1058 - 1065).

Chatterji, D. C. y Gallelli, J. F. 1978. Thermal and photolytic decomposition of methotrexate in aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical Science*. 67 (4) (526 - 531).

Chien, Y. W. 1982. *"Novel Drug Delivery Systems".* Capítulo 5: Transdermal controlled release drug administration. Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 149 - 215.

Chien, Y. W. 1991. Transdermal systemic drug delivery recent development and future prospects. *STP Pharma Sciences*. 1 (1) (5 - 23).

Chládek, J.; Martínková, J.; Simková, M.; Vanecková, J.; Koudelková, V. y Noczicková, M. 1998. Pharmacokinetics of low doses of methotrexate in patients with psoriasis over the early period of treatment. *European Journal Clinical Pharmacology*. 53 (437 - 444).

Cooper, E. R. y Patel, D. C. 1990. *"Topical Drug Delivery Formulations".* Capítulo 1: Practical considerations for topical drug formulations with and without enhancers. Osborne, D. W. y Amann, A.H. (eds). Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 1 - 12.

Cuéllar R. S. 1998. *"Introducción a la Química de Medicamentos (segunda parte)".* Editado por: Departamento Técnico del Consejo General de Colegios oficiales de Farmacéuticos. Pág: 287 - 288.

Cullander, C. 1992. What are the pathways of iontophoretic current flow through mammalian skin? *Advanced Drug Delivery Reviews.* 9 (119 - 135).

Delgado-Charro, M. B. y Guy, R. H. 1994. Characterization of convective solvent flow during iontophoresis. *Pharmaceutical Research*. 11 (7) (929 - 935).

Delgado-Charro, M. B. y Guy, R. H. 1995. Iontophoretic delivery of naforelin across the skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 117 (165 - 172).

Delgado-Charro, M. B.; Iglesias-Vilas, G.; Blanco-Méndez, J.; López-Quintela, M. A.; Marty, J. P. y Guy, R. H. 1997. Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 43 (37 - 42).

Delgado-Charro, M. B. y Guy, R. H. 1998. Percutaneous penetration and transdermal drug delivery. *Dermatology Foundation*. 32 (4) (1 - 12).

Denuzzio, J. D. y Berner, B. 1990. Electrochemical and iontophoretic studies of human skin. *Journal of Controlled Release*. 11 (105 - 112).

Diaz Peña, M. y Roig Muntaner, A. 1988. *"Química Física II ".* Alambra Universidad, España. Pág: 1358 - 1365.

Doelker, E. 1987. Proposition de classification des polymères biocompatibles pour les formes médicamenteuses á liberation controlle. *STP Pharma*. 3 (3) (207 - 215).

Dolz, M.; González, F.; Herráez, M. y Díez, O. 1994. The influence of polymer concentration on the 5-fluorouracil release rate from carbopol hydrogels. *Journal de Pharmacie de Belgique*. 49 (6) (509 - 513).

Eccleston, G. M. 1994. *"Encyclopedia of Pharmaceutical Technology"*. Microemulsions. Swarbrick, J. y Boylan, J. C. (eds). Marcel Dekker, Inc. U.S.A. Volumen 9. Pág: 375 – 421.

Edwards, D. A.; Prausnitz, M. R.; Langer, R. y Weaver, J. C. 1995. Analysis of enhanced transdermal transport by skin electroporation. *Journal of Controlled Release*. 34 (211 - 221).

Elias, P. M. 1990. *"Topical Drug Delivery Formulations".* Capítulo 2: The importance of epidermal lipids for the stratum corneum barrier. Osborne, D. W. y Amann, A. H. (eds). Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 13 - 28.

Elias, P. M. 1991. Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism. *Journal of Controlled Release*. 15 (199 - 208).

Falamarzian, M. y Varshosaz, J. 1998. The effect of structural changes on swelling kinetics of polybasic/ hydrophobic pH – sensitive hydrogels. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 24 (7) (667 – 669).

Fang, J.; Huang, Y.; Wu, P. y Tsai, Y. 1996. Transdermal iontophoresis of sodium nonivamide acetate. I. Consideration of electrical and chemical factors. *International Journal of Pharmaceutics*. 143 (47 - 58).

Florey, K. 1976. *"Analytical Profiles of Drug Substances".* Academic Press, Inc. New York. Volumen 5. Pág: 283 – 306.

Fred, L; Wang, W.; Zheng, J.; Tsao, G.; Johnsen, S.; Cai, Z. y Hsieh, D. S. 1994. Analysis of methotrexate from formulations and skin specimens by HPLC. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2 (3) (177 - 188).

Friberg, S. E.; Kayazi, I. H.; Margosiak, M.; Osborne, D. W. y Ward, Anthony J. I. 1990. *"Topical Drug Delivery Formulations".* Capítulo 3: Stratum corneum. Structure and transport properties. Osborne, D. W. y Amann, A. H. (eds). Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 29 - 45.

Gao, S. y Singh, J. 1998. In vitro absorption enhancement of a lipophilic drug tamoxifen by terpenes. *Journal of Controlled Release*. 51 (193 - 199).

García B. , F. 1992. *"Fisicoquímica para Farmacia y Bioquímica".* Capítulo 34: Aspectos generales de las macromoléculas. Coordinador general: Sanz Pedrero, P. Masson, S.A., Barcelona. Pág: 899 – 903.

Gargarosa, L. P. y Hill, J. M. 1995. Modern iontophoresis for local drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 123 (159 - 171).

Gasco, M. R.; Gallarate, M. y Pattarino F. 1991. In vitro permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 69 (193 - 196).

Gasco, M. R. 1997. *"Industrial Applications of microemulsions".* Capítulo 5: Microemulsions in the pharmaceuticalfField: perspectives andaApplications. Solans, C. y Kunieta, H. (eds). Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 97 – 122.

Gehrke, S. H. y Lee, P. I. 1990. *"Specialized Drug Delivery Systems".* Capítulo 8: Hydrogels for drug delivery systems. Tyle, P. (ed), Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 333 - 392.

Ghadially, R.; Reed, J. T. y Elias, P. M. 1996. Stratum corneum structure and function correlates with phenotype in psoriasis. *The Journal of Investigative Dermatology*. 17 (4) (558 - 564).

Gillespie, H.; Baird, R. y Bairdson. 1990. *"Química ".* Capítulo 16: Electroquímica. Editorial Reverté, S.A. España. Pág: 721 - 739.

González, M. A. 1992. *"Topics in Pharmaceutical Sciences".* Capítulo 8: Trends in transdermal drug delivery. Crommelin, D. J. A. y Midha, K. K. (eds). Medpharm Scientific Publishers. Stuttgart. Pág: 119 – 136.

Goodman Gilman, A. 1996. *"Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica".* Mc Graw-Hill Interamericana, México. Novena Edición. Pág: 1320 - 1325.

Green, P. G.; Hinz R. S.; Cullander, C.; Yamane, G. y Guy, R. H. 1991. Iontophoretic delivery of amino acids and amino acid derivates across the skin in vitro. *Pharmaceutical Research.* 8 (9) (113- 118).

Green, P. G.; Flanagan, M. I.; Shroot, B. y Guy, R. H. 1993. *"Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement".* Capítulo 14: Iontophoretic drug delivery. Waltyers, K. A. y Hadgraft, J. (eds). Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 311 - 333.

Green, P. G. 1996. Iontophoretic delivery of peptide drugs. *Journal of Controlled Release*. 41 (33 - 48).

Grodzinsky, A. J. y Grimshaw, P. E. 1990. Electrically and chemically controlled hydrogels for drug delivery. *Pulsed and Self-regulated Drug Delivery, CRC*. (47 - 63).

Guy, R. H.; Hadgraft, J. y Bucks, D. A. W. 1987a. Transdermal drug delivery and cutaneous metabolism. *Xenobiotica*. 17 (3) (325 - 343).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Guy, R. H. y Hadgraft, J. 1987b. Transdermal Drug Delivery: a perspective. *Journal of Controlled Release*. 4 (237 - 251).

Guy, R. H. 1996. Current status and future prospects of transdermal drug delivery. *Pharmaceutical Research*. 13 (12) (1765 - 1769).

Guy, R. H.; Kalia, Y. N.; Delgado-Charro, M. B. ; Merino, V. , López, A. Y. y Marro, D. 2000. Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. *Journal of Controlled Release*. 64 (129 - 132).

Hirvonen, J.; Hueber, F. y Guy, R. H. 1995. Current profile regulates iontophoretic delivery of amino acids across the skin. *Journal of Controlled Release*. 37 (239 - 249).

Huang, Y.; Wu, S.; Wang, C. y Jiang, T. 1996a. Response surface method as an approach to optimization of iontophoretic transdermal delivery of pilocarpine. *International Journal of Pharmaceutics*. 129 (41 - 50).

Huang, Y. y Wu, S. 1996b. Transdermal iontophoretic delivery of thyrotropin- realising hormone across excited rabbit pinna skin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 22 (11) (1075 - 1081).

Hwang, G. C.; Lin, A. Y.; Chen, W. y Sharpe, R. J. 1995. Development and optimization of a methotrexate topical formulation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 21 (17) (1941 - 1952).

Iglesias, G. 1992. Tesina de Licenciatura: Estudio físico-químico y polimerización de microemulsiones de interés farmacéutico: obtención de nanopartículas. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Química, Departamento de Química – Física. España.

Iza, M.; Stoianovici, G.; Viora, L.; Grossiord, J. L. y Couarraze, G. 1998. Hydrogels of poly(ethylene glycol): mechanical characterization and release of a model drug. *Journal of Controlled Release*. 52 (41 - 51).

Jackson, J. V.; Moss, M. S. y Widdop, B. *"Clarke's Isolation and Identification of Drugs".* The Pharmaceutical Press, London. 2da Edición. Pág: 756 – 756 (1986).

Junqueira, L. C. y Carneiro, J. 1996. *"Histología Básica".* Capítulo 18: Piel y anexos. Marson, S.A., España. 4ta Edición. Pág: 339 - 351.

Kasting, G. B. y Keister J. C. 1989. Application of electrodiffusion theory for a homogeneous membrane to iontophoretic transport through skin. *Journal of Controlled Rellease*. 8 (195 – 210).

Kasting, G. B. y Bowan, L. A. 1990. DC Electrical properties of frozen, excited human skin. *Pharmaceutical Research*. 7 (2) (134 - 143).

Kasting, G. B. 1992. Theoretical models for iontophoretic delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 9 (177 - 199).

Katime, I.; Novoa, R.; Díaz de Apodaca, E.; Mendizábal, E. Y Puig, J. 1999. Theophylline release from poly(acrylic acid – co – acrylamide) hydrogels. *Polymer Testing* . 18 (559 – 566).

Katime, I.; Díaz de Apodaca, E.; Mendizábal, E. Y Puig, J. 2000. Acrylic acid/methyl methacrylate hydrogels. I. Effect of composition on mechanical and thermodynamic properties. *Journal of macromolecular science – Pure and Applied Chemistry* A 37:4 (307 – 321).

Kim, S. W.; Bae, Y. H. y Okano, T. 1992. Hydrogels: swelling, drug loading, and release. *Pharmaceutical Research*. 9 (3) (283 - 290).

Kim, A.; Green, P. G.; Rao, G. y Guy, R. H. 1993. Convective solvent flow across the skin during iontophoresis. *Pharmaceutical Research.* 10 (9) (1315 – 1321).

Kim, C.; Ryuu, S.; Park, K.; Lim, S. y Hwang S. 1997. Preparation and physicochemical characterization of phase inverted water/ oil microemulsion containing cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics.* 147 (131 – 134).

Kneep, V.; Hadgraft, J. y Guy, R. H. 1987. Transdermal Drug Delivery: Problems and possibilities. *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 4 (13 - 37).

Korsmeyer, R. W. y Peppas, N. A. 1983. *"Controlled Release Delivery Systems".* Capítulo 4: Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems. Theodore, J. R. y Mansdork, S.Z. (eds). Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 77-90.

Ktistis, G. y Niopas, I. 1998. A study on in-vitro percutaneous absorption of propanolol from disperse systems. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*. 50 (413 - 418).

Kulicke, W. M. y Notterlmann, H. 1992. *"Polymers in Aqueous Media"".* Capítulo 2: Structure and swelling of some synthetic, semisynthetic, and biopolymer hydrogels. Glass, E. (ed). American Chemical Society, Washington, D.C. Pág: 15 - 44.

Lawrence, H. B. 1989. *"Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems"* Volumen 2. Capítulo 9: Emulsions and microemulsions. Lieberman, A.; Rieger, M.M. y Banker, G.S. (eds). Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 335 – 378.

Lawson, G. J. y Dixon, P. F. 1981. Rapid and simple method for the measurement of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate in serum by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography, Biomedical Applications*. 223 (225 - 231).

Ledger, P. W. 1992. Skin biological in electrically enhanced transdermal delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 9 (289 - 307).

Lee, P. I. 1984. Novel Approach to zero-orden drug delivery via immobilized nonuniform drug distribution in glassy hydrogels. *Journal of Pharmaceutical Science*. 73 (10) (1344 - 1347).

Lee, Y. M.; Shin, H. S. y Kim, S. Y. 1997. Pulsatile interpenetrating polymer networks hydrogels composed of poly vinyl alcohol) and poly(acrylic acid). *Proceeding of International Symposium Controlled Release of Bioactive Materials.* 24 (487 - 488).

Lelawongs, P.; Liu, J. y Chien, Y. W. 1990. Transdermal iontophoretic delivery of arginine-vasopressin (II). Evaluation of electrical and operational factors. *International Journal of Pharmaceutics*. 61 (179 - 188).

Linn, E. E.; Pohland, R. C. y Byrd, T. K. 1990. Microemulsion for intradermal delivery of cetyl alcohol and octhyl dimethyl PABA. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 16 (6) (899 – 920).

Liz-Marzán, L. M. 1992. Tesis Doctoral: Microemulsiones: un nuevo medio de reacción para la síntesis de partículas magnéticas ultrafinas. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Química, Departamento de Química – Física. España.

Lu, G.; Jun, H. W. y Suh, H. 1997. Percutaneous absorption and disposition studies of methotrexate in rabbits and rats. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*. 18 (5) (409 - 422).

Lu, G. y Jun, H. W. 1998. Diffusion studies of methotrexate in carbopol and poloxamer gels. *International Journal of Pharmaceutics*. 160 (1 - 9).

Luzardo-Alvarez, A.; Rodríguez-Fernández, M.; Blanco-Méndez, J.; Guy, R. H. y Delgado-Charro, M. B. 1998. Iontophoretic permselectivity of mammalian skin: characterization of hairless mouse and porcine membrane models. *Pharmaceutical Research.* 15 (7) (984 – 1004).

Malmsten, M. 1998. *"Biopolymers at interfaces"*. Marcel Dekker, Inc. New York. (1998).

Merck Research Laboratories. 1996. *"The Index Merck"*. Division of Merck and CO., Inc. 12da Edición. Pág: 1025 – 1025.

Moll, F. y Knoblauch, P. 1993. Iontophoretic in vitro release of antimycotics from hydrogels. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 19 (10) (1143 - 1158).

Morrison, R. T. y Boyd; R. N. 1985. " *Química Orgánica (nueva versión)*". Fondo Educativo Inteamericano, México. Pág: 436 - 444.

Myers, D. 1992. *"Surfactant Science and Technology".* VCH publishers, Inc. Pág: 149 – 158.

Osborne, D. W.; Ward, J. I. y O'Neill, K.J. 1988. Microemulsions as topical drug delivery vehicles. I. Characterization of a model system. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 14 (9) (1203 - 1219).

Osborne, D. W.; Ward, J. I. y O'Neill, K. J.. 1991. Microemulsions as topical drug delivery vehicles: in-vitro transdermal studies of model hydrophilic drug. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*. 43 (451 - 454).

Padmanabhan, R. V.; Phipps, J. B.; Lattin, G.A. y Sawchuk, R. J. 1990. In vitro and in vivo evaluation of transdermal ionthophoretic delivery of hydromorphone. *Journal of Controlled Release*. 11 (123 - 135).

Panus, P. C.; Campbell, J.; Kulkarni, S. B.; Herrick, R. T.; Ravis, W. R. y Banga, A. K. 1997. Transdermal iontophoretic delivery of ketoprofen through human cadaver skin and in humans. *Journal of Controlled Release*. 44 (113 - 121).

Peppas, N. A. y Franson, N. M. 1983. Thes swelling interface number as a criterion for prediction of diffunsional solute release mechanisms in swellable polymer. *Journal of Polymer Science.* 21 (983 - 997).

Pikal, M. J. 1990. Transport mechanisms in iontophoresis. I. A theoretical model for the effect of electroosmotic flow and flux enhancement in transdermal iontophoresis. *Pharmaceutical Research*. 7 (2) (118 - 127).

Pikal, M.J. y Shah, S. 1990. Transport Mechanisms in iontophoresis. II. Electroosmotic flow and transference number measurements for hairless mouse skin. *Pharmaceutical Research*. 7 (3) (213 - 223).

Pikal, M.J. 1992. The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 9 (201 - 237).

Qvist, M. H.; Hoeck, U.; Kreilgaard, B.; Madsen, F. Y Frokjaer, S. 2000. Evaluation of göttingen minipig skin for transdermal in vitro permeation studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 11 (59 - 68).

Radomska, A. y Dobrucki, R. 2000. The use of some ingredients for microemulsion preparation containing retinol and its esters. *International Journal of Pharmaceutics* 196 (131 – 134).

Rao, G.; Guy, R. H.; Glikfeld, P.; La Course, W. R.; Leung, L.; Tamada, J.; Potts, R. O. y Azimi, N. 1995. Reverse iontophoresis: noninvasive glucose monitoring in vivo in humans. *Pharmaceutical Research*. 12 (12) (1869 - 1873).

Rees, R. B.; Bennett, J. H.; Maibach, H. I. y Arnold, H. L. 1967. Methotrexate for psoriasis. *Archives of Dermatology.* 95 (1 - 11).

Ridout, G.; Hounk, J. y Guy, R. H. 1992. An Evaluation of structure-penetration relationships in percutaneous absortion. *Il Farmaco*. 47 (6) (869 - 892).

Roberts, M. S. 1997. Targeted drug delivery to the skin and deeper tissues: role of physiology, solute structure and disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 24 (874 - 879).

Sage, B. H. y Riviere, J. E. 1992. Model systems in iontophoresis-transport efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 9 (265 - 287).

Sage, B.H. 1993. *"Encyclopedia of Pharmaceutical Technology"*. Iontophoresis. Swarbrick, J. y Boylan, J. C. (eds). Marcel Dekker, Inc. U.S.A. Volumen 8. Pág: 217 - 247.

Santi, P.; Catellani, P. L.; Massimo, G.; Zanardi, G. y Colombo, P. 1993. Iontophoretic transport of verapamil and melatonin. I. Cellophane membrane as a barrier. *International Journal of Pharmaceutics.* 92 (23 - 28).

Santi, P. y Guy, R. H. 1996. Reverse iontophoresis-parameters determining electro-osmotic flow. Electrode chamber formulation. *Journal of Controlled Release*. 42 (29 - 36).

Schreier, H. y Bouwstra, J. A. 1994. Liposomes and niosomes as topical drug carriers: dermal and transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 30 (1 - 15).

Sen, M.; Uzun, C. y Güven, O. 2000, Controlled release of terbinafine hydrochloride from pH sensitive poly (acrylamide/ maleic acid) hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics* 203 (149 - 157).

Shaw, D. J. 1992. *"Colloid ans Surface Chemistry"*. Butterworth – Heinemann Ltd. Oxford. 4ta Edición. Pág: 262 – 276.

Sims, S. M.; Higuchi, W. I. y Srinivasam, V. 1991. Interaction of electric field and electroosmotic effects in determining iontophoretic enhancement of anions and cations. *International Journal of Pharmaceutics*. 77 (107 - 118).

Singh, P. y Maibach, H. I. 1994. Transdermal iontophoresis. *Clinical Pharmacokinetics*. 26 (5) (327 - 334).

Singh, J. y Singh, S. 1995. Transdermal iontophoresis: Effect of penetration enhancer and iontophoresis on drug transport and surface characteristics of human epidermis. *Current Problems of Dermatology*. 22 (179 - 183).

Srinivasam, V.; Sims, S. M.; Higuchi, W. I.; Behl, C. R.; Malick, A. W., y Pons, S. 1990a. "P*ulsed and Self-regulated Drug Delivery* ". Capítulo 4: Iontophoretic transport of drugs: a constant voltage approach. Kost, J. (ed). CRS Press. Pág: 65 – 89.

Srinivasam, V. y Higuchi, W. I. 1990b. A Model for iontophoresis incorporating the effect of convective solvent flow. *International Journal of Pharmaceutics*. 60 (133 - 138).

Tan, M. y Lebwohl, M. 1998. Psoriasis. *Drugs of Today*. 34 (7) (641 - 647).

Tanaka, T. 1981. Geles: ¿Qué fuerzas permiten la existencia de un estado intermedio entre el líquido y el sólido? *Investigación y Ciencia*. 54 (76 - 91).

Thacharodi, D. y Rao, K. R. 1994. Transdermal absortion of nifedipine from microemulsions of lipophilic skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics.* 111 (235 – 240).

Touitou, E.; Meidan, V. M. y Horwitz, E. 1998. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *Journal of Controlled Release*. 56 (7 - 21).

Trotta, M.; Gasco, M.R. ; Caputo, O. y Sancin, P. 1994. Transcutaneous diffusion of hematoporphyrin in photodynamic therapy in vitro release from microemulsions. *STP Pharma Sciences.* 4 (2) (150 – 154).

Trotta, M.; Pattarino, F. y Gasco, M. R. 1996. Influence of counter ions on the skin permeation of methotrexate from water – oil microemulsions. *Pharmaceutica Acta Helvetiae.* 71 (135 – 140).

Trotta, M.; Morel, S. y Gasco M. R. 1997. Effect of oil phase composition on the skin permeation of felodipine from o/w microemulsions. *Pharmazie.* 52 (50 – 53).

Tung, J. P. y Maibach, H. I. 1990. The practical use of methotrexate in psoriasis. *Drugs*. 5 (697 - 710).

Turner, T. D. 1991. *"Encyclopedia of Pharmaceutical Technology".* Swarbrick, J. y Boylan, J. C. (eds). Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 293 - 295.

Ulbrich, K.; Subr, V.; Podperovà, P. y Buresova, M. 1995. Synthesis of novel hydrolytically degradable hydrogels for controlled drug release. *Journal of Controlled Release*. 34 (155 - 165).

Vadillo, I. 1992. Tesina de Licenciatura: Síntesis y propiedades de hinchamiento de hidrogeles de acrilamida y diversos monoitaconatos de alquilo. Universidad del País Vasco. Facultad de Química. Departamento de Química Física. España.

Vaidyanathan, R.; Chaubal, M. G. y Vasavada, R. C. 1985. Effect of pH and solubility on in vitro skin penetration of methotrexate from 50%v/v propylene glycol-water vehicle. *International Journal of Pharmaceutics*. 25 (85 - 93).

Vakkalanka, S. K.; Brazel, C. S. y Peppas, N.A. 1996. Temperature-and pH- sensitive terpolymers for modulated delivery of streptokinase. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edn*. 8 (2) (119 - 129)

Van de Kerkhof, P. C. M. 1998. The Management of psoriasis. *Netherlands Journal of Medicine*. 52 (40 - 45).

Van Dooren-Greebe, R. J.; Kuijpers, A. L. A.; Mulder, J.; De Boo, T. H. y Van de Kerkhof, P. C. M. 1994. Methotrexate revisited: effects of long-term treatment in psoriasis. *British Journal of Dermatology*. 130 (204 - 210).

Vanbever, R.; Prausnitz, M: R. y Prèat, V. 1997. Macromolecules as novel transdermal enhancers for skin electroporation. *Pharmaceutical Research*. 14 (5) (638 - 644).

Varghese, E. y Khar, R. K. 1996. Enhanced skin permeation of diclofenas by iontophoresis: in vitro and in vivo studies. *Journal of Controlled Release*. 38 (21 - 27).

Velasco, A.; Lorenzo, P.; Serrano, J. S. y Andrés-Treller, F. 1993. *"Farmacología, Velazquez".* Mc Graw-Hill Inteamericana, España. 16ta Edición. Pág: 1083 - 1099.

Vilaplana, J. y Aragonés, C. 1995. *"Temas actuales de dermatologí ".* Capítulo: Piel y ácidos grasos esenciales. Ediciones Dogma, S.A., España. Pág: 1 - 30.

Wallace, S. M. y Barnett, G. 1978. Pharmacokinetic analysis of percutaneous absortion: evidence of parellel penetration phathways for methotrexate. *Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 6 (4) (315 - 325).

Walter, M.; Hulme, T. A.; Rippon, M. G.; Walmsley, R. S.; Gunnigle, S.; Lewin, M. y Winnsey, S. 1997. In vitro model(s) for the percutaneous delivery of active tissue repair agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 86 (12) (1381 – 1384).

Walters, K. 1989. *"Transdermal Drug Delivery: Development Issues and Research Initiatives".* Capítulor 10: Penetration enhancers and their use in transdermal therapeutic systems. Hadgraft, J. y Guy, R. H. (eds). Marcel Dekker, Inc., New York. Pág: 197 - 243.

Wang, D.; Lin, C.; Chu, D. y Chang, L. 1997. Effect of various physical/chemical properties on the transdermal delivery of cyclosporin through topical application. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 23 (1) (99 - 106).

Warisnoicharoen, W.; Lansley, A. B. y Lawrence, M. J. 2000. Nonionic oil water microemulsions: the effect of oil type on phase behavior. *International Journal of Pharmaceutics* 198 (7 – 27).

Weintein, G. D.; McCullough, J. L. y Olsen, E. 1989. Topical methotrexate therapy for psoriasis. *Archives of Dermatology.* 125 (227 - 230).

Welsh, U. y Storch, V. 1976. *"Estudio comparado de la Citología e histología animal ".* Capítulo 3: Tegumento. Urmo, S.A., España. Pág: 135 - 171.

Whitten, K.; Davis, R. E. Y Peck, M. L. 1998. *"Química General"*. Imc Graw-Hill Interamericana de España, S.A.U. 5ta Edición. Pág: 1039 – 1047.

Winsor. P.A. 1948. Hydrotropy, solubilisation and related emulsification process. Part I. *Transaction of the Faraday Society.* 44 (376 – 398).

Winter, M. E. 1994. *"Farmacocinética Clínica Básica"*. Ediciones Díaz de Santos, S.A., España. 2da Edición. Pág: 217 – 237.

Wood, J. M.; Attwood, D. y Collett, J. H. 1982. The influence of gel formulation on the diffusion of salicylic acid in polyhema hydrogels. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*. 34 (1 - 4).

Yoshida, N. H. y Roberts, M. S. 1992. Structure-transport relationships in transdermal iontophoresis. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 9 (239 - 264).

Yu, H. y Grainger, D. W. 1995. Modified release of hydrophilic, hidrophobic and peptide agents from ionized amphiphilic gel networks. *Journal of Controlled Release*. 34 (117 - 127).

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Publicaciones

Hasta la fecha, el trabajo de investigación que constituye esta tesis doctoral, ha dado lugar a dos publicaciones (ambas aceptadas en la revista: *International Journal of Pharmaceutics*, cuya copia se adjunta a continuación.

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Passive and iontophoretic transdermal penetration of methotrexate

M.J. Alvarez-Figueroa [a,b,*], M.B. Delgado-Charro [c], J. Blanco-Méndez [a]

[a]Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela. 15706 Santiago de Compostela, Spain.
[b]Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile, Vicuña Mackenna 4860, Santiago de Chile, Chile.
[c]Céntre Interuniversitaire de Récherche et d'Enseignement, Pharmapeptides, 74166 Archamps, France & Faculté des Sciences Université of Geneva, CH-1211, Switzerland.
* Corresponding Author. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain. Tel: +34-981594627. Fax: +34-981547148. E-mail: ffjavial@usc.es

Abstract

The *in vitro* iontophoretic transdermal delivery of methotrexate (MTX) across pig skin was investigated. Cathodal iontophoresis considerably increased MTX skin permeation and accumulation as compared to the passive controls. The effect of NaCl and MTX concentrations in the vehicle were also studied. As expected, MTX iontophoretic transport decreased with NaCl content. On the other hand, MTX concentration did not modify its electrotransport in the range of concentrations considered (4.4 - 6.6 mM). The influence of the current density (0.25-0.5 mA cm^{-2}) was also investigated. The iontophoretic transport of MTX tends to increase with current density although this effect was not always statistically significant. Finally, we explored the possibility of using anodal iontophoresis from an acid (pH 4.0-5.0) donor solution to deliver MTX. This was limited due to the low solubility of MTX in acid pH. On the whole, this work that iontophoresis may be use to improve the topical application of MTX for the treatment of psoriasis.

Keywords: Iontophoresis, Methotrexate, Psoriasis.

1. Introducción

Methotrexate (MTX, Fig. 1) is a folic acid antagonist with antineoplastic activity. It competitively inhibits the enzyme dihydrofolate reductase, leading to inhibition of DNA synthesis (Chládek et al., 1998). Since MTX inhibits mitotic activity, it is effective for the treatment of recalcitrant psoriasis (Vaidyanathan et al., 1985; Lu et al., 1997), a skin disorder which is characterized by hyperproliferation of epidermal cells, giving rise to regions of cutaneous thickening and erythematous lesions, typically on the back, the elbows, the knees, and the scalp (Ghadially et al., 1996; Tan and Ledwohl 1998).

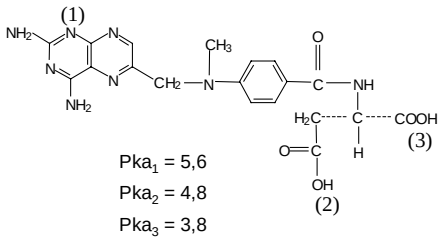


Figure 1: Chemical structure of methotrexate (M.W. 454.56 g mol^{-1}, Log P oct/water = -1.85)

MTX is effective for the treatment of psoriasis when it is administered by the oral or parenteral route over long periods of time. However, the systemic use of this drug may provoke any of numerous side effects, including nausea, vomiting, fatigue, headache, dyspnea, leukopenia, thrombocytopenia, anemia, and hepatic toxicity (Bookbinder et al., 1984; Van Dooren-Greebe et al., 1994). To reduce such effects, it would clearly be preferable to administer MTX topically, and to this end there have been studies of its administration in ointments, creams, and gels (Vaidyanathan et al., 1985; Weinstein et al., 1989; Hwang et al., 1995; Singh and Singh 1995; Trotta et al., 1996; Chatterjee et al., 1997; Lu et al., 1997). However, no topical dosage forms of this drug are commercially available yet. A major problem is that MTX is hydrosoluble and has a high molecular weight, and is mostly in dissociated form at physiological pH; its capacity for passive diffusion is thus limited (Singh and Singh 1995). Iontophoretic drug administration consists of the application of a weak electric field across the skin, in order to facilitate the penetration of charged molecules, or of neutral and polar molecules such as mannitol and glucose (Kim et al., 1993; Rao et al., 1993). Iontophoretic techniques

may therefore be useful for increasing transdermal penetration of MTX.

Iontophoretic transport is principally due to two phenomena: convective flow and electrorepulsion (Kim et al., 1993; Green 1996). Since MTX is negatively charged at physiological pH (7,4), it must be delivered from the cathode, and will be driven from cathode to anode by electrorepulsion (Yoshida and Roberts 1992). However, the convective flow which goes in the opposite direction at physiological conditions, will oppose the movement of MTX towards the anode.

Singh et al. (Singh and Singh 1995) studied the combined effect of iontophoresis and enhancers such as DMSO (dimethylsulphoxide), DMF (dimethylformamide), DMA (dimethylacetamide) and Azone (1-dodecylazacycloheptan-2-one) on the transdermal penetration of MTX. They found that iontophoresis further increased the permeability coefficient of MTX as compared to that measured using the enhancers passively. However, these authors did not characterize the iontophoretic penetration of MTX in the absence of chemical enhancers.

Our long-term aim is to develop an efficient topical dosage form for MTX. In this context, we report here a study of factors possibly influencing electrotransport into and across pig skin, namely drug concentration, current density, ionic strength, and pH.

2. Materials and methods

2.1 Reagents

Methotrexate hydrate (98%), Ag wire (99.99% pure, 1.0 mm diameter), AgCl (99%), Pt wire (99.99% pure, 0.5 mm diameter), and HEPES (99.5%) were all from Sigma-Aldrich Química S.A. (Spain). Methanol (HPLC quality) was from Merck S.A. All the other reagents (NaCl, ethanol, HCl, NaOH, Na_3PO_4) were analytical grade.

2.2 Skin

Skin was obtained from various regions (neck, hind leg, fore leg, back) of a 2- to 3-day-old pig that had been killed by cervical dislocation. The skin was frozen at –20ºC until use. About 12 h before each experiment, the skin was thawed. Muscle and subcutaneous tissue remains were removed, and any hair was cut short. The skin was then cut into appropriately sized pieces which were placed in the diffusion cells with the epidermis facing the donor solution. In each series of assays we used skin from all of regions, to minimize inter-assay variability due to variability among the skin types.

2.3 Passive diffusion experiments

For these experiments we used vertical passive diffusion cells (area 4.15 cm^2) (Laboratory Glass Apparatus Inc., USA), thermostatted at 37ºC in a water bath (Selecta, Digiterm, Spain) and protected from light. The donor solution was 3 mL of 25 mM HEPES buffer pH 7.4 + 50 mM NaCl containing MTX at 2.0, 2.5, 2.8 or 3.0 mg/mL. The receptor solution was 4 mL of 25 mM HEPES buffer pH 7.4 + 154 mM NaCl. Both the donor and the receptor solutions were magnetically stirred (HP Variomag Multipoint Electronicrührer) throughout the experiment. The concentration of MTX in the receptor solution was determined after 6 and 24 h of passive diffusion, and the amount of MTX in the skin was determined at the end of the experiment. At each time the whole receptor solution was sampled and the receptor chamber refilled with fresh buffer.

2.4 Iontophoresis experiments

For these experiments, we used side-by-side diffusion cells (area = 0.78 cm^2; Crown-Bio Scientific Inc., USA), again protected from light and magnetically stirred throughout the experiment. A constant direct current generated with a Kepco TES 2360LCR apparatus (Kepco Power Supply, USA) was applied. The voltage of the complete circuit and of each cell was measured hourly with a voltmeter (Freak, MY-63). Electrodes were Ag/AgCl, prepared by the method of Green et al. (Green et al., 1991). The donor solution (cathodic compartment) was 3 mL of 25 mM HEPES buffer pH 7.4 with NaCl at 0, 50 or 100 mM, and MTX at 2.0 or 3.0 mg/mL. The receptor solution was 4 mL of 25 mM HEPES buffer pH 7.4 + 154 mM NaCl. These experiments were performed at room temperature.

We also investigated the effects of pH on the iontophoretic penetration of MTX. To this end, we perfomed experiments in which the donor solution was 25 mM HEPES buffer pH 4.0 or 5.0 + 50 mM NaCl containing 0.034 or 0.072 mg/mL MTX, and the receptor solution was 25 mM HEPES buffer pH 7.4 + 154 mM NaCl. In these experiments the donor solution was placed in the anodic compartment, in view of the positive charge of MTX in this pH range.

In all of the above experiments, the concentration of MTX in the receptor solution was determined after 4, 7 and 10 h, and the amount of MTX in the skin was determined after 10 hours. At each time the whole receptor solution was sampled and the receptor chamber refilled with fresh buffer.

2.5 MTX quantification

Quantification of MTX in receptor solutions was as follows. First, the receptor solution was filtered through a 0.45 µm polyvinyl difluoride filter (Millipore), then evaporated to dryness in a vacuum oven (Heraeui) at 50ºC. The dry residue was then dissolved in 1.5 mL of the HPLC mobile phase (see below), and the solution was then centrifuged (Sigma 2-15, Laborzentrifugen, Germany) for 10 min at 3500 rpm. The supernatant was

filtered, and MTX was quantified in the filtrate by HPLC, as below.

Quantification of MTX in skin was as follows. The skin was washed with ethanol (2 x 5 mL), then left in 10 mL of ethanol in the dark for about 48 h. The ethanol was then filtered through filter paper, and evaporated to dryness at 50ºC under vacuum. The dried residue was then dissolved in 1.5 mL of HPLC mobile phase (see below) and centrifuged for 10 min at 3500 rpm. The supernatant was filtered through 0.45 µm polyvinyl difluoride filters, and MTX was quantified in the filtrate by HPLC, as below.

MTX was quantified by HPLC as per Lawson and Dixon (Lawson and Dixon 1981), using a Merck Hitachi high-performance liquid chromatograph with an L-6200[a] pump, an L-4500 diode detector, an AS-4000[a] injector, and a D-6000 interface. The mobile phase was 0.1 M Na_3PO_4 (pH 6.7) / methanol 75:25 (degassed by vacuum filtration). Both the column and the precolumn were Lichrospher 100 RP-18 columns (5 µm pore size) (Merck). Flow rate was 1 mL/min. System temperature was maintained constant at 35ºC, and MTX was quantified on the basis of absorption at 305 nm. Sample volume was 100 µL. The detection limit was 2 µg/mL.

2.6 Data analysis

We performed at least 4 - 6 replicates of each experiment. Results are presented in the text as means ± SDs. Data were analyzed by analysis of variance, and Dunn's tests or Student-Newman-Keuls tests for comparisons of multiple means. Statistical significance was fixed at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 Passive Diffusion experiments

These assays confirmed the scant ability of MTX to penetrate the skin by passive diffusion. MTX was only detectable in the receptor solution when the MTX concentration in the donor solution was ≥ 2.8 mg/mL: penetration after 24 h was 0.6 ± 0.4 µg cm^{-2} and 2.9 ± 4.5 µg cm^{-2} with 2.8 mg/mL and 3.0 mg/mL of MTX in the donor solution respectively. These two means did not differ significantly.

Increasing MTX concentration in the donor solution led to significant increases in the amount of drug accumulated into the skin, which ranged from 2.38 ± 0.46 µg cm^{-2} to 6.21 ± 0.50 µg cm^{-2}.

Our results are in agreement with those of Weinstein et al. (Weintein et al., 1989), who investigated the passive diffusion of MTX across human skin. These authors found that transdermal penetration of MTX from an aqueous donor solution containing 2% MTX was about 5 µg cm^{-2} after 48 h.

It is clear then that transdermal delivery of MTX almost certainly requires some sort of enhancing technique, such as a chemical absorption-promoter (Chatterjee et al., 1997) or iontophoresis (Singh and Singh 1995), since passive penetration into the skin may be sufficient for treatment of psoriasis, though this cannot be confirmed since the skin concentrations required for therapeutic effect are not know.

3.2 Iontophoresis of MTX

Iontophoresis has been proposed as a technique for enhancing skin penetration of antipsoriatic drugs such as khellin (Green 1996) and MTX (Singh and Singh 1995). In the present study, we aimed to identify the key factors controlling electrotransport of MTX.

Table 1: Cumulative transdermal delivery of MTX (µg per cm^{-2} of skin) in each of the iontophoresis experiments (mean ± S.D, n= 6).

[MTX] (mg/mL)	[NaCl] (mM)	Current density (mA cm^{-2})	[MTX] cumulative delivery		
			4 h. (µg cm^{-2})	7 h. (µg cm^{-2})	10 h. (µg cm^{-2})
2	0	0.5	29.9 ± 11.8	100.4 ± 78.0	207.0 ± 154.6
2	50	0.5	18.4 ± 19.6	49.6 ± 44.4	70.3 ± 65.6
2	100	0.5	2.5 ± 3.1	9.0 ± 14.2	24.5 ± 28.7
3	0	0.5	40.0 ± 38.2	103.4 ± 89.8	184.6 ± 151.2
3	50	0.5	15.6 ± 15.4	32.5 ± 31.0	66.7 ± 54.1
2	0	0.25	17.1 ± 28.1	24.7 ± 35.0	57.8 ± 93.1
2	50	0.25	1.9 ± 2.6	6.4 ± 9.9	11.6 ± 17.8
2	100	0.25	6.5 ± 8.9	12.2 ± 15.9	21.9 ± 21.4
3	0	0.25	9.0 ± 18.0	19.2 ± 28.2	25.2 ± 31.6
3	50	0.25	3.6 ± 8.9	10.2 ± 21.9	19.3 ± 42.8

Table 1 summarizes the results on iontophoretic transdermal penetration of MTX under the different conditions tested. As expected, the application of an electric current considerably increased penetration into the receptor solution: in all cases, the 10-h cumulative delivery of MTX was markedly and significantly higher ($p < 0.05$) than in the corresponding passive-diffusion experiments.

Note that the influence of MTX concentration in the donor solution was studied only over the range 2.0-3.0 mg/mL (4.4-6.6 mM), because of the low solubility of MTX (Table 2). Furthermore, it was not possible to perform experiments with 3.0 mg/mL in medium with 100 mM NaCl, because of the even lower solubility of MTX at this ionic strength (Table 2).

The results of these experiments suggest that MTX concentration in the donor solution does not have a significant effect on iontophoretic trasdermal penetration. Results of this type have been predicted by Kasting (Kasting and Keister 1989) in the absence of competing ions in the donor solution, and observed experimentally for hydromorphone (over the range 0.01-0.08 M) by Padmanabhan et al. (Padmanabhan et al., 1990). MTX concentration in the donor solution likewise had no significant effect in the presence of NaCl, but this may be attributable to the narrow concentration range considered and to the high inter-assay variability observed.

Table 2: Solubility of MTX in the different donor solutions used in these experiments.

Donor solution	Solubility of MTX. (mg/mL)
HEPES 25 mM, pH 7.4	4.6
HEPES 25 mM + NaCl 50 mM, pH 7.4	3.1
HEPES 25 mM + NaCl 100 mM, pH 7.4	3.4
HEPES 25 mM + NaCl 50 mM, pH 5.0	0.09
HEPES 25 mM + NaCl 50 mM, pH 4.0	0.04

The effects of ionic strength on penetration were investigated by modifying NaCl concentration in the donor solution (0, 50 or 100 mM). Penetration declined with increasing ionic strength: however, the differences were statistically significant only when MTX concentration in the donor solution was 2.0 mg/mL and current density was 0.5 mA cm^{-2}. The apparent transport number of MTX was 6×10^{-4} in experiments with donor solution MTX concentration 2.0 mg/mL, current density 0.5 mA cm^{-2}, and NaCl concentration 100 mM, and increased only to 5×10^{-3} in experiments without NaCl. This low transport number indicates that the iontophoretic transport of MTX is limited by the presence of the highly mobile sodium ions at the anode and possibly by the comparably sized HEPES ions (M.W. 238 g mol^{-1}, 25 mM) at the cathode.

To investigate the influence of current density on MTX penetration, we performed experiments at 0.25 and 0.50 mA cm^{-2}. An increase in penetration with increasing current density is expected, given that the flow due to electrorepulsion (J_{ER}, mol h^{-1} cm^{-2}) of an ion *i* is given by:

$$J_{ER} = (t_N \cdot I)/z \cdot F$$

where t_N is the transport number of that ion, *z* its valency, *F* the Faraday constant, and *I* the current applied (Yoshida and Roberts 1992). The amount of MTX delivered increased with increasing current density, but the observed differences were statistically significant only in the series of experiments in which MTX concentration was 3.0 mg/mL and NaCl concentration was 50 mM or 0 mM.

It is of interest to compare our results with those obtained using other penetration-enhancing techniques, such as microemulsions and chemical enhancers. In a study performed with hairless mouse skin using an MTX-saturated microemulsion of lecithin in water/PG (70:30), pH 5.0 (MTX solubility = 2.5 mg g^{-1}), the measured transdermal penetration rate was 5 ± 1 µg cm^{-2} hr^{-1} (Trotta et al., 1996). In another study (Weintein et al., 1989) performed with human skin, using a 2% MTX solution and the enhancers dodecylmethylsulfoxide and Azone, the cumulative delivery of MTX was 10 – 40 µg cm^{-2} in 48 h, (i.e. about 0.2 – 0.8 µg cm^{-2} h^{-1}), lower than in the present study.

In the present study, the concentration of MTX in the skin ranged from 1 to 10 µg cm^{-2} in the different experiments (Table 3). Statistical analysis of these data suggests that the amount of MTX entering and remaing in the skin tends to increase with increasing current density, increasing MTX concentration, and declining NaCl concentration in the donor solution. However, no clear pattern was observed. For example, a higher current density led to higher MTX accumulation only in the experiments performed with 3 mg/mL MTX. Similar values (13.5 ± 2.9 µg cm^{-2}) were obtained by Lu et al. (Lu et al., 1997) using rabbit ear skin and gels containing 0.5-1.0% of MTX and 4% N,N-diethyl-n-toluamide (DEET). The relatively high levels of MTX reached in the skin after iontophoresis suggest that this technique may be appropriate for the treatment of psoriasis: however, this cannot be confirmed until the concentration of MTX required for therapeutic effect is established.

Table 3: MTX recovered from the skin after the iontophoretic experimets (µg cm^{-2}, mean ± S.D, n = 6).

[MTX] (mg/mL)	[NaCl] (mM)	Current density (mA cm^{-2})	[MTX] in skin (µg cm^{-2})
2	0	0.5	6.9 ± 3.2
2	50	0.5	3.7 ± 2.6
2	100	0.5	7.1 ± 9.0
3	0	0.5	10.9 ± 6.1
3	50	0.5	4.7 ± 1.7
2	0	0.25	5.3 ± 2.5
2	50	0.25	5.4 ± 4.3
2	100	0.25	8.9 ± 10.4
3	0	0.25	1.4 ± 1.4
3	50	0.25	0.7 ± 1.7

Finally, we investigated the influence of pH on the iontophoretic penetration of MTX. At pH 4.0 – 5.0 the amine group of MTX is predominantly ionized (≥ 80%), and MTX is therefore positively charged and zwitterionic, and must be delivered from the anode. In theory, anodic iontophoresis should offer the advantage of adding an electroosmotic component to the iontophoretic flux (Pikal 1992). Furthermore, it has been proposed than the electroosmotic contribution becomes more relevant as the transport number of the drug considered decreases (Burnette 1989; Pikal and Shah 1990). However, MTX was not detected either in the receptor solution or in the skin after anodic iontophoresis at either pH. This is probably due to the low solubility of MTX in the donor solution (Table 2).

It therefore seems, that transdermal penetration of MTX can be effectively improved by iontophoresis. In same previous studies, the use of other absortion-promoting strategies such as microemulsions and chemical enhancers has resulted in similar values of transdermal penetration. However, iontophoresis offers some clear advantages, such as its versatility (as far as the control of drug delivery is concerned) and the fact that it is a physical method. In other words , the enhanced flux results from the interaction between the electric field and the ions present in the system. In view of this, a faster recovery of the skin barrier (soon after the current is turned off) and lower skin irritation are expected than when the skin barrier is chemically or structurally perturbed. In any case, the usefulness of iontophoresis for the treatment of psoriasis requires future sudies aimed at assessing a) the safety of iontophoretic delivery to psoriatic skin, b) optimal MTX concentrations for therapeutic effect and c) measures of MTX iontophoretic transport and accumulation through a damage skin barrier such psoriatic skin.

4. Conclusions

Iontophoresis markedly improved transdermal penetration of MTX. Penetration was influenced by ionic strength (i.e. NaCl concentration) of the donor solution and current density. Specifically, penetration was highest in the absence of NaCl and at the highest current density tested (0.5 mA cm^{-2}). By contrast, penetration was not affected by MTX concentration in the donor solution (range 4.4 – 6.6 mM). A variable amount of MTX was recovered from the skin, independently of the iontophoresis conditions. Attempts at delivery of MTX by anodic iontophoresis were not successful, probably because of the low solubility of this drug in acid medium.

Acknowledgments

This work was partially financed by grant XUGA 20312B98 from the Xunta de Galicia (Spain). M. J. Alvarez-Figueroa thanks the Pontifical Catholic University of Chile for an undergraduate fellowship.

References

Bookbinder, S.A., Espinoza, L.R., Fenske, N.A., Germain, B.F., Vasey, F.B., 1984. Methotrexate: its use in the rheumatic diseases. Clin. Exp. Rheumatol. 2, 185-193.

Burnette, R.R., Marrero, D.,1986. Comparison between the iontophoretic and passive transport of tryrotropin releasing hormone across excited nude mouse skin. J. Pharm. Sci. 75:8, 738-743.

Burnette, R.R., 1989. Iontophoresis in Transdermal Drug Delivery.In: Hadgraft J. and Guy, R.H., (Ed.), Chapter 11, Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 245-291.

Chatterjee D.J., Li. W. Y., Koda, R.T., 1997. Effect of vehicles and penetration enhancers on the in vitro and in vivo percutaneous absortion of methotrexate and edatrexate through hairless mouse skin. Pharm. Res. 14:8, 1058-1067.

Chládek, J., Martinková, J., Simková, M., Vanecková, J., Koudelková, V., Noczicková, M., 1998. Pharmacokinetics of low doses of methotrexate in patients with psoriasis over the early period of treatment. Eur. J. Clin. Pharmacol. 53, 437-444.
Ghadially R., Reed, J.T., Elias, P.M., 1996. Stratum corneum structure and function correlates with phenotype in psoriasis. J. Invest. Dermatol. 17:4, 558-564.
Green. P.G., Hinz, R.S., Cullander, C., Yamane, G., Guy, R.H., 1991. Iontophoretic delivery of amino acids and amino acid derivatives across the skin in vitro. Pharm. Res. 8:9, 1113-1118.
Green P.G. 1996. Iontophoretic delivery of peptide drugs. J. Control. Release 21, 33-48.
Hwang G.C., Lin, A.Y., Chen, W., Sharpe, R.J., 1995. Development and optimization of a methotrexate topical formulation. Drug Dev. Ind. Pharm. 21:17, 1941-1952.
Kasting, G.B., Keister, J.C., 1989. Application of electrodiffusion theory for a homogeneous membrane to iontophoretic transport through skin. J. Control. Release 8, 195-210.
Kim A., Green, P.G., Rao, G., Guy, R.H., 1993. Convective solvent flow across the skin during iontophoresis. Pharm. Res. 10:9, 1315-1321.
Lawson G.J., Dixon, P.F., 1981. Rapid and simple method for the measurement of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate in serum by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 223, 225-231.
Lu G., Jun, H.W., Suh, H., 1997. Percutaneous absorption and disposition studies of methotrexate in rabbits and rats. Biopharm. Drug Dispos. 18:5, 409-422.
Marconi, B., Manzini, F., Colombo, P., Allerga, F., Giordano, F., Gazzaniga, A., Orecchia, G., Santi, P., 1999. Distribution of khellin in excited human skin following iontophoresis and passive dermal transport. J. Control. Release 60, 261-268.
Padmanabhan R.V., Phipps, J.B., Latín, G.A., Sawchuk, R.J., 1990. In vitro and in vivo evaluation of transdermal iontophoretic delivery of hydromorphone. J. Control. Release 11, 123-135.
Pikal. M.J., Shah, S., 1990. Transport mechanisms in iontophoresis II. Electroosmotic flow and transference number measurements for hairless mouse skin Pharm. Res. 7:2, 118-127.
Pikal, M.J. 1992. The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis Adv. Drug Deliv. Rev. 9, 201-237.
Rao G., Glikfeld, P., Guy, R.H., 1993 Reverse iontophoresis: development of a noninvasive approach for glucose monitoring. Pharm. Res. 10:12, 1751-1755.
Singh J., Singh, S., 1995. Transdermal iontophoresis: effect of penetration enhancer and iontophoresis on drug transport and surface characteristics of human epidermis. Curr. Prob. Dermatol. 22, 179-183.
Tan M., Ledwohl, M., 1998. Psoriasis. Drugs of Today 34:7, 641-647.
Trotta M., Pattarino, F., Gasco, M.R., 1996. Influence of counter ions on the skin permeation of methotrexate from water-oil microemulsions. Pharm. Acta Helv. 71, 135-140.
Vaidyanathan, R., Chaubal, M.G., Vasavada, R.C., 1985. Effect of pH and solubility on in vivo skin penetration of methotrexate from 50% v/v propylene glycol-water vehicle. Int. J. Pharm. 25, 85-93.
Van Dooren-Greebe R.J., Kuijpers, A.L.A., Mulder, J. De Boo, T. Van de Kerkhof, P.C.M., 1994. Methotrexate revisited: effects of long-term treatment in psoriasis. Br. J. Dermatol. 130, 204-210.
Weintein G.D., Mc Cullough, J.L., Olsen, E., 1989. Topical methotrexate therapy for psoriasis. Arch. Dermatol. 125, 227-230.
Yoshida N. H., Roberts, M.S., 1992. Structure-transport relationships in transdermal iontophoresis. Adv. Drug Deliv. Rev. 9, 239-264.

Transdermal delivery of methotrexate: iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions

M. J. Alvarez-Figueroa [a,b,*], J. Blanco-Méndez [a]

[a]*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela,. 15706 Santiago de Compostela, Spain.*
[b]*Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile, Vicuña Mackenna 4860, Santiago de Chile, Chile.*
** Corresponding Author. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain. Tel: +34-981594627, Fax: +34-981547148, e-mail: ffjavial@usc.es*

Abstract

In vitro assays were performed to investigate the effectiveness of transdermal administration of methotrexate (MTX) by iontophoretic delivery from two types of hydrogel and passive delivery from two types of microemulsion. Both iontophoretic delivery of MTX from hydrogels and passive delivery from microemulsions were more effective than passive delivery from aqueous solutions of the drug. In the iontophoretic delivery assays, the type of hydrogel used and the concentration of the drug in the loading solution had little influence on effectiveness of delivery. In the passive delivery assays, we used both W/O and O/W microemulsions: effectiveness of delivery was higher from O/W systems. At the end of all assays, significant amounts of MTX were detected in the skin. These results suggest that both hydrogels and microemulsions may be of value for the topical administration of MTX in the treatment of psoriasis.

Keywords: Methotrexate, Iontophoresis, Hydrogel, Microemulsion, Psoriasis.

1. Introduction

For certain drugs, transdermal delivery offers a number of advantages with respect to oral or parenteral administration. However, only a small minority of drug molecules are able to passively penetrate the skin (Thacharodi and Rao, 1994). Ionic, neutral and/or polar molecules typically show limited skin penetration ability (Rao et al., 1993; Kim et al., 1993).

Methotrexate (MTX) is a folic acid antagonist with antineoplastic activity. It is also effective for the treatment of psoriasis when administered by the oral or parenteral route over long periods of time. However, the systemic use of this drug may provoke any of numerous side effects, notably hepatotoxic effects (Bookbinder et al., 1984; Van Dooren-Greebe et al., 1994). To reduce such effects, it would clearly be preferable to administer MTX topically (Hwang et al., 1995). A major problem is that the drug is hydrosoluble and has a high molecular weight (454.56 g/mol), and is mostly in dissociated form at physiological pH: its capacity for passive diffusion is thus limited. However, techniques such as iontophoresis (Singh and Singh., 1995), or the use of appropriate vehicles such as hydrogels or microemulsions (Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 1994; Lu and Jun, 1998) may enhance transdermal delivery of this drug.

The aim of the present study was to evaluate hydrogels and microemulsions as vehicles for the topical administration of MTX. This forms part of our long-term efforts to develop a topical dosage form suitable for the local treatment of psoriasis.

In iontophoretic delivery, an electric field is applied across the skin, enhancing the penetration of ionized, neutral or polar molecules (Rao et al., 1993; Kim et al., 1993). Previous studies have demonstrated that iontophoretic delivery is effective for enhancing the transdermal penetration of MTX (Álvarez-Figueroa et al., 2000). The development of more convenient reservoir systems is clearly desirable, and one notable area of interest has been the use of drug-containing hydrogels. Formulation of the drug as a hydrogel rather than a solution facilitates drug handling and, in the case of iontophoretic delivery, allows the patient to remain ambulant.

Hydrogels have attracted increasing attention in recent years, in view of their swelling behaviour, adhesiveness and biocompatability. Incorporation of drugs into hydrogels permits modulation of their release kinetics (Kim et al., 1992; Vakkalanka et al., 1996; Falamarzian and Varhosaz., 1998).

Microemulsions are dispersions of two immiscible components stabilized by a third, amphoteric, component. They are recognized as appropriate vehicles for the administration of drugs (Osborne et al., 1991; Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 1994; Thacharodi and Rao, 1994). The use of a

microemulsion as vehicle may enhance transdermal penetration by various mechanisms. Many molecules are solubilized in microemulsions. In addition, microemulsions induce a change in the thermodynamic activity of the drugs they contain, modifying their partition coefficient, and thus favour penetration of the stratum corneum. Furthermore, their component surfactants reduce the functional barrier of the stratum corneum. This latter function may be more or less important, depending on the nature of the surfactant used (Delgado-Charro et al., 1997).

2. Materials and methods

2.1 Reagents

Methotrexate hydrate (98%), Ag wire (99.99% pure, 1.0 mm diameter), AgCl (99%), Pt wire (99.99% pure, 0.5 mm diameter), phosphoric acid (98%), ethyl oleate (70%), Tween 80, Span 80, 1-2 octanediol (98%), myristic isopropyl ester (98%) and HEPES (99.5%) were all from Sigma-Aldrich Química S.A. (Spain). Acrylamide (> 99%), methanol (HPLC quality) and acetonitrile (HPLC quality) were from Merck S.A. Acrylic acid (> 99%) and N,N'-methylenebisacrylamide (>98%) were from Fluka. 2-2'-Azobis (2-aminopropane) dihydrochloride (V50) was from Wako Chemicals, USA. Labrasol® (polyethylene glycol-8 caprylate/caprate) and Plurol Isostearique® (polyglyceryl isostearate) were from Gattefossé (Lyon, France). All the other reagents (NaCl, ethanol, HCl, NaOH, Na_3PO_4) were analytical grade.

2.2 MTX hydrogels

Hydrogels were prepared with the monomers acrylic acid and acrylamide. In preliminary trials we used different monomer ratios and different amounts of cross-linker, and finally selected two types of hydrogel, one prepared with acrylic acid only, and the other with 1:1 (acrylic acid):acrylamide. The selection criteria were viscosity, ease of synthesis, and reproducibility of synthesis (Katime et al., 1999; Katime et al., 2000). The two types of hydrogel were prepared with the same amount of cross-linking agent.

The acrylic-acid-only hydrogel was prepared by dissolving 0.02 g of N,N'-methylenebisacrylamide (the crosslinker) in 8 mL of distilled water in a test tube, then adding 3 g of acrylic acid, then bubbling with N_2 for 10 min. In another tube, 0.03 g of V50 was dissolved in 2 mL of distilled water, and the system was then bubbled with N_2 for 2 min. The V50 solution (i.e. the initiator) was then added to the monomer solution, and the tube was capped with a septum seal and bubbled with N_2 for 2 min. The hydrogels were then washed for one week, with constant changing of the water. They were then cut, dried and polished to obtain hydrogels with a smooth and homogeneous surface (Álvarez-Figueroa et al., 1999).

The 1:1 (acrylic acid):acrylamide hydrogel was prepared by the same procedure, with the acrylamide (1.5 g) added to the crosslinker solution first, then the acrylic acid (1.5 g) (Álvarez-Figueroa et al., 1999).

For loading with MTX, the hydrogels were placed in contact for one week with 30 mL of buffer solution (25 mM HEPES + 50 mM NaCl) containing 120 or 200 μg/mL of MTX.

Table 1: Composition of the different microemulsions tested.

System	Microemulsion	% oil phase	% aqueous phase	% S/C
I	OE1	10	10	80
I	OE2	10	50	40
I	OE3	20	25	55
II	EM1	10	15	75
II	EM2	25	15	60

2.3 Microemulsions

The microemulsion systems studied in this work have been previously characterized in our laboratory (Liz-Marzán, 1992; Delgado-Charro et al., 1997; Baroli et al., 2000). An important characteristic of these systems is that they employ non-irritant surfactants and co-surfactants, suitable for topical application.

The two systems used were:

I. Surfactant/cosurfactant 3:1 v/v Labrasol®:(Plurol Isostearique®); oil phase ethyl oleate; aqueous phase 154 mM NaCl pH 7.4.

II. Surfactant/cosurfactant 3:1:1.2 w/w/w (Tween 80):(Span 80):(1,2-octanediol); oil phase myristic isopropyl ester; aqueous phase water.

Various microemulsions were prepared, all within the stability zones of the corresponding phase diagrams, as shown in Table 1. The required volume of each component was measured in a measuring cylinder, the components were mixed by shaking, and the mixture was left in a water bath at 37°C until stabilization (about 24 h).

For passive diffusion assays (see below), the microemulsion was prepared with MTX at 50 or 80% saturation.

2.4 In vitro assays of iontophoretic delivery from MTX hydrogels

Skin was obtained from various regions (neck, hind leg, fore leg, back) of a 2- to 3-day-old pig that had been killed by cervical dislocation. The skin was frozen at -20°C until use, and thawed about 12 h before each experiment. Muscle and subcutaneous tissues were removed, and any hair cut short. The skin was then cut into appropriately sized pieces which were placed in the diffusion cells with the epidermis facing the donor solution. In each series of assays we used skin from all four regions, to minimize inter-assay variability due to variability among skin types.

For these experiments we used vertical passive diffusion cells (area 4.15 cm^2) (Laboratory Glass Apparatus Inc., USA), protected from light and magnetically stirred throughout the experiment. A constant direct current (0.5 mA/cm^2) generated with a Kepco TES 2360LCR apparatus (Kepco Power Supply, USA) was applied. The voltage of the complete circuit and of each cell was measured hourly with a voltmeter (Freak, MY-63). The silver wire used at the anode was introduced into one of the outlets of the receptor compartment. The cathode was a silver disc coated with AgCl (Green et al., 1991), with the same dimensions as the donor hydrogel. The receptor solution was 4 mL of 25 mM HEPES buffer (pH 7.4) + 154 mM NaCl. The experiments were performed at room temperature.

In all experiments, the concentration of MTX in the receptor solution was determined after 10 h, and the amount of MTX in the skin was determined subsequently.

Six replicates of each experiment were performed.

2.5 In vitro assays of passive diffusion from MTX microemulsions

For these experiments we used vertical passive diffusion cells (area 4.15 cm^2), thermostatted at 37°C in a water bath (Selecta, Digiterm, Spain) in the dark. The donor solution was 3 mL of the microemulsion containing MTX. The receptor solution was 4 mL of 25 mM HEPES buffer pH 7.4 + 154 mM NaCl. The receptor solutions were magnetically stirred (HP Variomag Multipoint Electronicrührer) throughout the experiment. The concentration of MTX in the receptor solution was determined after 6 and 24 h of passive diffusion, and the amount of MTX in the skin was determined subsequently.

Six replicates of each experiment were performed.

2.6 Quantification of MTX

For quantification of MTX in receptor solutions, the solution was first passed through a 0.45 µm polyvinyl difluoride filter (Millipore), then evaporated to dryness in a vacuum oven (Heraeus) at 50°C. The dry residue was then dissolved in 1.0 mL of HPLC mobile phase (see below), and the solution was then centrifuged (Sigma 2-15, Laborzentrifugen, Germany) for 10 min at 11000 rpm. The supernatant was filtered, and MTX was quantified in the filtrate by HPLC, as below.

For quantification of MTX in skin, the skin was first washed with ethanol (2 x 5 mL), then left in 10 mL of ethanol in the dark for 48 h. The ethanol was then filtered through filter paper, and evaporated to dryness at 50°C under vacuum. The dried residue was then dissolved in 1.0 mL of HPLC mobile phase (see below) and centrifuged for 10 min at 11000 rpm. The supernatant was filtered through 0.45 µm polyvinyl difluoride filters, and MTX was quantified in the filtrate by HPLC, as below.

HPLC quantification of MTX was as per Cercós-Fortea et al. (1997), using a Merck Hitachi high-performance liquid chromatograph with an L-6200ª pump, an L-4500 diode detector, an AS-4000ª injector, and a D-6000 interface. The mobile phase was 84:16 (0.05 M phosphoric acid, pH 2.7):acetonitrile, degassed by vacuum filtration. Both the column and the precolumn were Lichrospher 100 RP-18 columns (5 µm pore size) (Merck). Flow rate was 1 mL/min. System temperature was maintained constant at 35°C, and MTX was quantified on the basis of absorption at 303 nm. Sample volume was 50 - 100 µL. The detection limit was 2 µg/mL.

2.7 Determination of MTX solubility in microemulsions

Excess MTX was added to 10 mL of the microemulsion, and left at -37°C in the dark with magnetic stirring for 163 hours. At 24, 48, 72, 96 and 163 hours, we took an aliquot of the microemulsion and centrifuged it for 10 min at 11000 rpm. The supernatant was filtered through 0.45 μm polyvinyl difluoride filters (to removed drug in suspension), and was then diluted with an appropriate volume of ethanol. MTX was quantified in the filtrate by spectrophotometry (Shimadzu, UV-240) at 304 nm. For each microemulsion, 6 replicate assays were performed.

2.8 Data analysis

Results are cited in the text as means ± SDs. Data were analyzed by analysis of variance, and Dunn's tests or Student-Newman-Keuls tests for subsequent pairwise comparisons. Statistical significance was fixed at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1 Iontophoretic delivery from hydrogels

Previous studies have shown that synthetic hydrogels have suitable viscosity for use in topical formulations. In addition, studies of swelling, uptake and MTX distribution have demonstrated that these systems are suitable for the transdermal administration of MTX. Swelling equilibrium is reached after about 80 h, with the amount of water incorporated into the polymeric network being pH-dependent over the range tested (pH 6.0 - 8.0). The MTX solution penetrates the hydrogel structure homogeneously, and the pH reached inside the hydrogel is appropriate for maintenance of MTX stability (Álvarez-Figueroa et al., 1999).

The results of the assays of iontophoretic delivery of MTX from hydrogels are summarized in Table 2.

Table 2: Summarized results of the assays of iontophoretic delivery of MTX from hydrogels: amounts of MTX in the receptor solution after 10 h (μg cm^{-2}) (ambient temperature, 0.5 mA cm^{-2}). Values shown are means ± SD for 6 assays.

Hydrogel	MTX in the receptor solution (loading solution 120 μg/mL)	MTX in the receptor solution (loading solution 200 μg/mL)
Acrylic acid only	1.52 ± 0.41	1.69 ± 0.42
1:1 (Acrylic acid): Acrylamide	0.98 ± 0.32	1.39 ± 0.29

These results indicate that hydrogel composition had little effect on the amount of drug crossing the skin. Significant differences were detected between the two types of hydrogel only when the donor solution contained 120 μg/mL MTX. MTX concentration in the donor solution likewise had little effect: a statistically significant difference between the two MTX concentrations was only observed for the (acrylic acid):acrylamide hydrogel. Note that we were unable to investigate the effects of loading-solution MTX concentration outside the range tested, because concentrations below 120 μg/mL are not detectable by the HPLC method used, while at concentrations above 200 μg/mL the drug does not distribute homogeneously in the hydrogel but precipitates at its surface.

In these experiments we used the maximum current advisable for iontophoretic delivery (0.5 mA/cm^2), but nevertheless detected only small amounts of MTX in the receptor solution. Weaker currents would thus be expected to be less effective, and indeed the concentration of MTX in the receptor solution might remain below the detection limit of the HPLC method used.

Previous studies (Weinstein et al., 1989; Álvarez-Figueroa et al., 2000) have shown that iontophoresis considerably increases transdermal delivery of MTX from hydrogels, by comparison with passive delivery. Weinstein et al. (1989) found that passive diffusion of MTX across human skin, from a solution containing 2% MTX, was about 5 μg/cm^2 after 48 h.

The apparent transport number (Yoshida and Roberts, 1992) was practically the same for all four assays, ranging from 1.2 x 10^{-5} to 2.0 x 10^{-5}. These values are an order of magnitude lower than those estimated for iontophoretic delivery of MTX from solutions (Álvarez-Figueroa et al., 2000), suggesting that the iontophoretic transport of MTX is limited by the presence of highly mobile sodium ions at the anode.

It would also have been interesting to investigate in greater detail the kinetics of iontophoretic delivery of MTX from hydrogels, but a) MTX concentration in the receptor solution before 10 h was below the HPLC detection limit, and b) it was not possible to include more silver in the system for sampling beyond this time.

The amounts of MTX retained in the skin in these assays are summarized in Table 3.

The amount of MTX retained in the skin was not significantly affected by either hydrogel composition or MTX concentration in the loading solution.

Table 3. Summarized results of the assays of iontophoretic delivery of MTX from hydrogels: amounts of MTX remaining in the skin after 10 h (μg cm^{-2}) (ambient temperature, 0.5 mA cm^{-2}). Values shown are means ± SD for 6 assays.

Hydrogel	MTX in the skin (loading solution 120 μg/mL)	MTX in the skin (loading solution 200 μg/mL)
Acrylic acid only	1.56 ±1.13	1.30 ± 0.61
1:1 (Acrilic acid): Acrylamide	2.59 ± 0.64	1.52 ± 0.8

3.2 Microemulsions

On mixing of the different components, translucent and stable microemulsions were formed almost immediately. On addition of MTX, no opalescence was noted, indicating that these systems retained their stability when the drug was added.

Solubilities of MTX in each microemulsion are listed in Table 4. The solubility of MTX was higher in system I (ethyl oleate as oil phase) than in system II (myristic isopropyl ester as oil phase). This may be attributable to the fact that system I is O/W, while system II is W/O. MTX is hydrosoluble, and thus has higher affinity for the aqueous phase: since this is the external phase in the system-I microemulsions, a greater amount of drug is solubilized.

Table 4. Solubilities of MTX (μg/mL) at 37ºC in the different microemulsions, and MTX concentration used (μg/mL) in the skin penetration assays. Solubilities values are means ± SDs for 6 assays.

Microemulsion	**MTX solubility**	**80% saturation MTX concentration**	**50% saturation MTX concentration**
OE1	1275.81 ± 249.26	1021	638
OE2	977.50 ± 79.87	782	489
OE3	1357.87 ± 76.39	1086	679
EM1	669.60 ± 168.72	536	335
EM2	595.23 ± 57.203	476	298

The results of the assays of passive delivery of MTX from microemulsions are summarized in Figure 1. The microemulsions contained MTX at 50 or 80% saturation. With all microemulsions studied, and regardless of MTX concentration, at the end of the experiment MTX concentration in the microemulsion remained much higher than in the skin or in the receptor solution, confirming that the quantity of drug present in the microemulsion remained sufficient throughout the assay period.

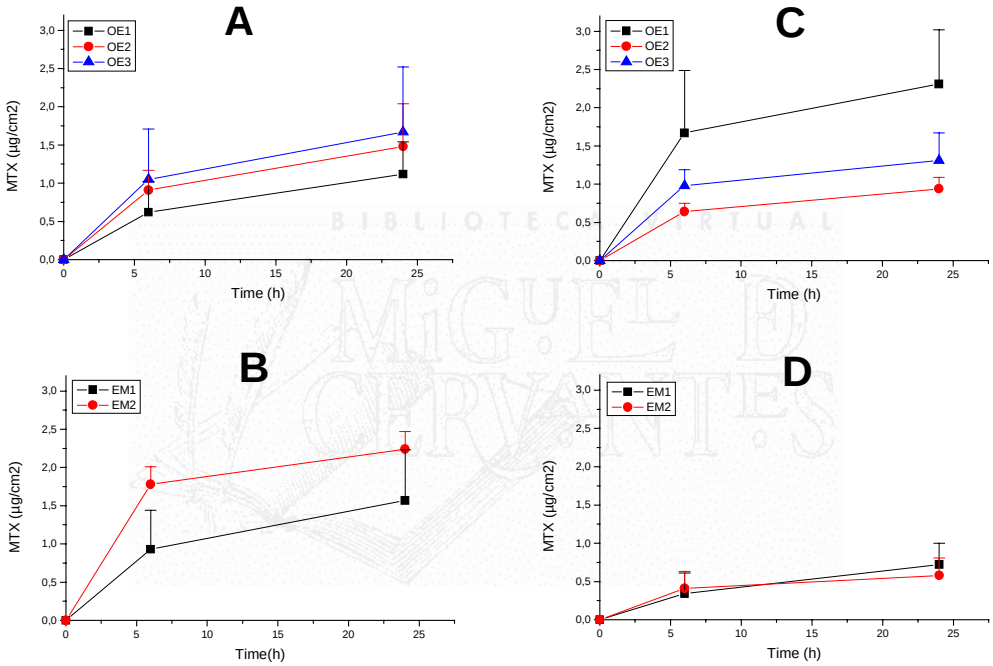
Considering the results obtained with MTX at 80% saturation, no significant variation in degree of penetration across the skin was detected either between the two systems or within each system among formulations. Considering the results obtained with MTX at 50% saturation, however, statistically significant variation was observed both between and within systems: indeed, the only nonsignificant differences were between OE2 and EM1, and between EM1 and EM2. These results suggest that formulation factors have marked effects on system efficacy at relatively low MTX concentrations, but not at higher MTX concentrations. Here it is important to note that, for a given MTX saturation (50 or 80%), MTX concentration varied widely (see Table 4). One possible explanation for the more marked effect of formulation factors at 50% saturation is that the magnitude of the effect of MTX concentration on degree of penetration declines with increasing MTX concentration: this might explain, for example, why degree of penetration differed markedly between EM2-50% and OE3-50% (MTX concentration 298 vs. 679 μg/mL) but not between EM2-80% and OE3-80% (MTX concentration 476 vs. 1086 μg/mL). However, detailed investigation of the effects of formulation factors on degree of penetration is difficult for systems of this type, since it is not possible to vary one factor over a wide range while holding all other factors constant. The EM system is particularly problematic in this regard: it shows two small stability zones in the O/W/surfactant phase diagram, one in which W/O microemulsions are formed, and another (very small) in which O/W microemulsions are formed.

Some previous studies (Osborne et al., 1988; Osborne et al., 1991), have found that drug release from microemulsions is dependent on their proportional composition, and notably on their proportional water content. In the present study, we observed significant effects of composition for the OE-50% systems, but not for OE-80% systems or the EM systems.

Pairwise comparisons for each formulation (i.e. OE1-80% vs. OE1-50%, etc.) indicate that the amount

of MTX crossing the skin in most cases differs considerably depending on MTX saturation. This again points to the importance of MTX concentration in determining passive diffusion from microemulsions.

Figure 1. Summarized results of the assays of passive delivery of MTX from microemulsions: amounts of MTX in the receptor solution after 6 and 24 h (µg cm^{-2}) (37°C). MTX concentrations in each system are show in Table 4. **A)** system I, 80% MTX saturation; **B)** system II, 80% MTX saturation; **C)** system I, 50% MTX saturation; **D)** system II, 50% MTX saturation. Values shown are means ± SD for 6 assays.



Several studies have compared O/W and W/O microemulsions with other vehicles for the transdermal administration of medicines, such as lotions, suspensions, gels or emulsions (Linn et al., 1990; Gasco et al., 1991; Trotta and Gasco, 1997). It has been observed that microemulsions have a greater capacity to release drugs towards the skin. This may be due to the fact that drugs contained in microemulsions are in dissolved or suspended form, so that their absorption is faster and more effective. We found that passive transdermal delivery of MTX from microemulsions was more effective than passive transdermal delivery from a simple solution (Weinstein et al., 1989; Álvarez-Figueroa et al., 2000), but less effective than iontophoretic transdermal delivery from a simple solution (Álvarez-Figueroa et al., 2000). In the case of MTX, the greater effectiveness of iontophoretic delivery from solutions than of passive delivery from microemulsions may be attributable to the lower solubility of MTX in microemulsions than in simple aqueous solution.

A previous study of the passive delivery of MTX from W/W microemulsions across nude mouse skin obtained a delivery rate of about 4 - 5 µg cm^{-2} h^{-1} (Trotta et al., 1996). This is markedly higher than the rate obtained in the present study, presumably because the diffusion of MTX (a hydrosoluble compound) is favoured when it is incorporated into aqueous vehicles. In the present case, and although the differences were not always statistically significant, we observed more effective delivery of MTX from the microemulsion with aqueous external phase (system I).

The amounts of MTX remaining in the skin at the end of the assay are shown in Table 5. The observed behaviour was similar to that obtained for amounts of MTX entering the receptor solution. In the case of microemulsions with MTX at 80% saturation, we did not detect statistically significant between-formulation differences in delivery to skin. In the case of microemulsions with MTX at 50% saturation, we

detected a number of statistically significant between-formulation differences in delivery to skin. For all formulations, the amount of MTX remaining in the skin was significantly higher when MTX content was 50% saturation than when MTX content was 80% saturation.

The amounts of MTX remaining in the skin in these experiments are similar to the amounts remaining in the

skin in the assays of iontophoretic delivery from hydrogels.

Table 5. Summarized results of the assays of passive delivery of MTX from microemulsions: amounts of MTX remaining in the skin after 24 h (μg cm^{-2}) (37°C). Values shown are means ± SD for 6 assays.

Microemulsion	MTX saturation	MTX in the skin (μg cm^{-2})
OE1	80%	0.61 ± 0.07
OE1	50%	0.86 ± 0.25
OE2	80%	0.91 ± 0.22
OE2	50%	2.11 ± 0.83
OE3	80%	1.11 ± 0.56
OE3	50%	2.19 ± 0.44
EM1	80%	0.92 ± 0.38
EM1	50%	2.91 ± 0.39
EM2	80%	1.12 ± 0.31
EM2	50%	2.21 ± 0.72

4. Conclusions

Both iontophoretic transdermal delivery of MTX from hydrogels, and passive transdermal delivery from microemulsions, were more effective than passive transdermal diffusion from MTX solutions (Weinstein et al., 1989; Álvarez-Figueroa et al., 2000). The effectiveness of iontophoretic delivery from hydrogels was not affected by the type of hydrogel used, or by MTX concentration in the loading solution. The effectiveness of passive delivery from microemulsions, the effectiveness of passive delivery from microemulsions showed some relationship to MTX concentration, but appeared not to be affected by microemulsion composition or phase proportion. In all cases detectable amounts of MTX remained in the skin at the end of the assay. The increased effectiveness of MTX delivery observed in the present study suggests that topical administration of this drug may be feasible, but since the optimal skin concentrations of MTX for treatment of psoriasis are not known, we cannot confirm that the concentrations reached will be effective. However, both hydrogels and microemulsions are versatile systems whose composition and properties can be readily modified. Optimization of system properties might therefore improve their delivery of MTX to the skin.

Acknowledgements

This work was partially financed by grant XUGA 20312B98 from the Xunta de Galicia (Spain). M.J. Álvarez-Figueroa thanks the Pontificia Universidad Católica de Chile for an undergraduate fellowship. We thank Gattefossé S.A. for generously supplying Labrasol and Plurol Isostearique. We also thank Prof. Issa Katime (Universidad del País Vasco, Spain) for his cooperation in the synthesis of the hydrogels.

References

Álvarez-Figueroa, M.J.; Delgado-Charro, M.B. and Blanco-Méndez, J. 1999."Síntesis y caracterización de hidrogeles de ácido acrílico y ácido acrílico/acrilamida 1:1" IV Congreso de la Asociación Española de Docentes de Farmacia Galénica. Santiago de Compostela, España.

Álvarez-Figueroa, M.J.; Delgado-Charro, M.B. and Blanco-Méndez, J. 2000. "Passive and iontophoretic transdermal penetration of methotrexate. Accepted for publication in Int. J. Pharm.

Baroli, B.; López-Quintela, A.; Delgado-Charro, M.B.; Fadda, A.M, and Blanco-Méndez, J. 2000. "Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen" J. Control. Release 69, 209-218.

Bookbinder, S.A.; Espinoza, L.R.; Fenske, N.A.; Germain, B.F. and Vasey, F.B. 1984. "Methotrexate: its use in the rheumatic diseases". Clin. Exp. Dermatol. 2, 185-193.

Cercós-Fortea, T.; Casabó, V.G.; Nácher, A.; Cejudo-Ferragud,E.; Polache, A. and Merino, M. 1997. "Evidence of competitive inhibition of methotrexate absorption by leucovorin calcium in rat small intestine". Inter. J. Pharm. 155, 109–119.

Delgado-Charro, M.B.; Iglesias-Vilas, G. and Blanco-Méndez, J. 1997. "Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion

systems". European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 43, 37-42.

Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Edited by Swarbrink J and Boylan J.C. Marcel Dekker, Inc., USA. Volume 9. Pages 375–421 (1994).

Falamarzian, M. and Varhosaz, J. 1998. "The effect of structural changes on swelling kinetics of polybasic/hidrophobic pH– sensitive hydrogels". Drug Dev. Ind. Pharm. 24:7, 667–669.

Gasco, M.R.; Gallarate, M. and Pattarino, F. 1991. "In vitro permeation of azelaic acid from viscosized microemulsions". Inter. J. Pharm. 69, 193–196.

Green, P.G.; Hinz, R.S.; Cullander, C.; Yamane, G. and Guy, R.H. 1991. "Iontophoretic delivery of amino acids and amino acid derivatives across the skin in vitro". Pharm. Res.8:9, 1113-1118.

Hwang, G.C.; Lin, A.Y.; Chen, W. and Sharpe, R.J. 1995. "Development and optimization of a methotrexate topical formulation". Drug Dev. Ind. Pharm. 21:17, 1941-1952.

Katime, I.; Novoa, R.; Díaz de Apodaca, E.; Mendizábal, E. and Puig J. 1999. "Theophylline release from poly(acrylic acid- co – acrylamide) hydrogels". Polymer Testing 18, 559-566.

Katime, I.; Díaz de Apodaca, E.; Mendizábal. E. and Puig, J. 2000. "Acrylic acid/methyl methacrylate hydrogels. I. Effect of composition on mechanical and thermodynamic properties". Journal of Macromolecular Science – Pure and Applied Chemestry A37: 4, 307-321.

Kim, S.W.; Bae, Y.H. and Okano, T. 1992. "Hydrogels: swelling, drug loading, and release". Pharm. Res. 9:3, 283– 90.

Kim, A.; Green, P.G.; Rao, G. and Guy, R.H. 1993. "Convective solvent flow across the skin during iontophoresis". Pharm. Res. 10:9, 1315-1321.

Linn, E.E.; Pohland, R.C. and Byrd, T.K. 1990. "Microemulsion for intradermal delivery of cetyl alcohol and octyl dimethyl PABA". Drug Dev. Ind. Pharm. 16:6, 899–920.

Liz-Marzán L. M. Microemulsiones. Un nuevo medio de reacción para la síntesis de partículas magnéticas ultrafinas. Doctoral thesis. University of Santiago de Compostela, Spain, 1992.

Lu, G. and Jun, H.W. 1998. "Diffusion studies of methotrexate in carbopol and poloxamer gels". Inter. J. Pharm. 160, 1–9.

Osborne, D.W.; Ward, J.L. and O'Neill, K.J. 1988. "Microemulsions as topical delivery vehicles. I. Characterization of a model system". Drug Dev. Ind. Pharm. 14, 1203–1219.

Osborne, D.W.; Ward, J.L. and O'Neill, K.J. 1991. "Microemulsions as topical drug delivery vehicles: in- vitro transdermal studies of a model hydrophilic drug". J. Pharm. Pharmacol. 43, 451–454.

Rao, G.; Glikfeld, P. and Guy, R.H. 1993. "Reverse iontophoresis: development of a noninvasive approach for glucose monitoring". Pharm. Res. 10:12, 1751-1755.

Singh, J. and Singh, S. 1995. "Transdermal iontophoresis: effect of penetration enhancer and iontophoresis on drug transport and surface characteristics of human epidermis". Curr. Prob. Dermatology 22, 179-183.

Thacharodi, D. and Rao, K.P. 1994. "Transdermal absortion of nifedipine from microemulsions of lipophilic skin penetrations enhancers". Inter. J. Pharm. 111, 235 –240.

Trotta, M.; Pattarino, F. and Gasco, M.R. 1996. "Influence of counter ions on the skin permeation of methotrexate from water-oil microemulsions". Pharm. Acta Helv. 71, 135-140.

Trotta, M. and Gasco, M.R. 1997. "Effect of oil phase composition on the skin permeation of felodipine fron o/w microemulsions. Pharmazie 52, 50–53.

Vakkalanka, S.K.; Brazel, C.S. and Peppas, N.A. 1996. "Temperature and pH- sensitive terpolymers for modulated delivery of streptokinase". J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 8:2, 119–129.

Van Dooren-Greebe, R.J.; Kuijpers, A.L.A.; Mulder, J.; De Boo, T. and Van der Kerkhof, P.C.M. 1994. "Methotrexate revisited: effects of long-term treatment in psoriasis". Br. J. Dermatol. 130, 204-210.

Weintein, G.D.; McCullough, J.L. and Olsen,E. 1989. "Topical methotrexate therapy for psoriasis". Arch. Dermatol. 125, 227-230.

Yoshida, N.H. and Roberts, M.S. 1992. "Structure-transport relationships in transdermal iontophoresis" Adv.Drug Deliv. Rev. 9, 239-264.

PROMOCIÓN DE LA PENETRACIÓN TRANSDÉRMICA DE METOTREXATO

El metotrexato (MTX) ha demostrado ser un fármaco efectivo para el tratamiento de la psoriasis cuando se emplea por vía oral o parenteral y por períodos de tiempo prolongados. Sin embargo, como se han observado numerosos efectos asociados a su uso sistémico se ha intentado su administración por vía local. Debido a las características químicas que este principio activo posee (peso molecular, solubilidad, lipofilia, etc.) penetra escasamente a través de la piel por mecanismos de difusión pasiva. Es por esto, que en este trabajo se estudiaron diferentes técnicas y vehículos que permitieran el empleo de este fármaco por vía transdérmica. Es así como la técnica de iontoforesis, que consiste en la aplicación de corriente eléctrica a través de la piel, mostró ser una técnica ventajosa respecto a la difusión pasiva. Además, cuando se combinó esta técnica con el uso de hidrogeles como vehículos de administración transdérmica, también se observó un aumento en la penetración del MTX. Posteriormente, se estudió el empleo de microemulsiones como vehículos de administración tópica, ya que se ha estudiado que estos sistemas actúan como promotores de la absorción percutánea. En este último caso, al igual que en los casos anteriores, también se observó un aumento en la penetración de MTX respecto de la difusión pasiva desde soluciones que contenían dicho fármaco. Es así como el incremento en la penetración transdérmica de MTX obtenida en este estudio, hace posible su administración por vía tópica. Sin embargo, por no conocerse las concentraciones locales necesarias para su uso en el tratamiento local de la psoriasis, no podemos afirmar que el incremento en las concentraciones tópicas alcanzadas son las adecuadas para alcanzar el efecto terapéutico requerido. No obstante, tanto las técnicas como los vehículos de administración transdérmica empleados en este estudio, son versátiles y pueden ser modificados y diseñados para lograr un aumento aún mayor de la penetración cutánea de este principio activo.

Palabras claves: Metotrexato, Iontoforesis, Psoriasis, Hidrogeles, Microemulsiones.

PROMOCIÓN DA PENETRACIÓN TRANSDÉRMICA DE METOTREXATO

O metotrexato (MTX) ten demostrado ser un fármaco efectivo para o tratamento da psoríase cando se emprega por vía oral ou parenteral e por períodos de tempo prolongados. Sen embargo, ao se teren observado numerosos efectos asociados ao seu uso sistémico, intentouse a súa administración por vía local. Debido ás carácterísticas químicas (peso molecular, solubilidade, lipofilia, etc.) penetra escasamente a través da pel por mecanismos de difusión pasiva. Por isto, neste traballo estudiáronse diferentes técnicas e vehículos que permitisen o emprego deste fármaco por vía transdérmica. Así a iontoforese, técnica que consiste na aplicación dunha corrente eléctrica a través da pel, presentou vantaxes frente á difusión pasiva. Ademáis, cando se combinou esta técnica co uso de hidroxeles como vehículo de administración transdérmica, tamén se observou un aumento na penetración do MTX. Posteriormente estudiouse o emprego de microemulsións como vehículos de administración tópica debido a que estes sistemas actúan como promotores da absorción percutánea. Neste último caso, como nos anteriores, tamén se observou un aumento da penetración de MTX respecto da difusión pasiva desde solucións que contiñan dito fármaco. Así é como o incremento na penetración transdérmica de MTX obtida neste estudio fai posible a súa administración vía tópica. Sen embargo, debido ao descoñecemento das concentracións locais necesarias para o seu uso no tratamento local da psoríase, non podemos afirmar que os incrementos logrados nas concentracións tópicas sexan os adecuados para alcanza-lo efecto terapéutico requirido. Aínda así, tanto as técnicas coma os vehículos de administración transdérmica empregados neste estudio, son versátiles e poden ser modificados e deseñados para conseguir un aumento aínda maior da penetración cutánea deste principio activo.

Palabras claves: Metotrexato, Iontoforese, Psoríase, Hidroxeles, Microemulsións.

PROMOTION OF THE METHOTREXATE TRANSDERMAL PENETRATION

Methotrexate (MTX) is a drug effective for the treatment of psoriasis when administered by the oral or parenteral route over long periods of time. However, the systemic use of this drug may provoke any of numerous side effects. To reduce such effects, it would clearly be preferable to administer MTX topically. A mayor problem is that the drug is hydrosoluble and has a high molecular weight, and is mostly in dissociated form at physiological pH: its capacity for passive diffusion is thus limited. However, some technique such as iontophoresis or the use of appropriates vehicles such as hydrogels or microemulsions may enhance transdermal delivery of this drug. We observed that iontophoresis markedly improve transdermal penetration of MTX when we used solutions of hydrogels as vehicles for the iontophoretic administration. Moreover, we observed that microemulsions was more effective than passive transdermal diffusion from MTX solutions. The increased effectiveness of MTX delivery observed in the present study suggests tat topical administration of this drug may be feasible. However, since the optimal skin concentrations of MTX for treatment of psoriasis are not know, we cannot confirm that the concentrations reached will be effective. However, the iontophoretic, hydrogels and microemulsions, are versatile systems whose composition and properties can be readily modified. Optimisation of system properties might therefore improve their delivery of MTX to the skin.

Keywords: Methotrexate, Iontophoresis, Psoriasis, Hydrogel, Microemulsion.

Fecha de defensa de la tesis doctoral: 1 de Febrero de 2001

Director de la tesis: Dr. José Blanco Méndez
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
Universidad de Santiago de Compostela

Composición del tribunal:

Presidente: Dr. Ramón Martínez Pacheco
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
Universidad de Santiago de Compostela

Vocales: Dr. José Luis Lastres García
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
Universidad Complutense de Madrid

Dra. Paloma Ballesteros Papantonakis
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
Universidad Complutense de Madrid

BIBLIOTECA VIRTUAL MIGUEL DE CERVANTES

Dra. Rosa María Jiménez-Castellanos Ballesteros
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
Universidad de Sevilla

Secretario: Dr. Francisco Javier Otero Espinar
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
Universidad de Santiago de Compostela

BIBLIOTECA VIRTUAL
MIGUEL DE CERVANTES

PROMOTION OF THE METHOTREXATE TRANSDERMAL PENETRATION

Methotrexate (MTX) is a drug effective for the treatment of psoriasis when administered by the oral or parenteral route over long periods of time. However, the systemic use of this drug may provoke any of numerous side effects. To reduce such effects, it would clearly be preferable to administer MTX topically. A mayor problem is that the drug is hydrosoluble and has a high molecular weight, and is mostly in dissociated form at physiological pH: its capacity for passive diffusion is thus limited. However, some technique such as iontophoresis or the use of appropriates vehicles such as hydrogels or microemulsions may enhance transdermal delivery of this drug. We observed that iontophoresis markedly improve transdermal penetration of MTX when we used solutions of hydrogels as vehicles for the iontophoretic administration. Moreover, we observed that microemulsions was more effective than passive transdermal diffusion from MTX solutions. The increased effectiveness of MTX delivery observed in the present study suggests tat topical administration of this drug may be feasible. However, since the optimal skin concentrations of MTX for treatment of psoriasis are not know, we cannot confirm that the concentrations reached will be effective. However, the iontophoretic, hydrogels and microemulsions, are versatile systems whose composition and properties can be readily modified. Optimisation of system properties might therefore improve their delivery of MTX to the skin.

Keywords: Methotrexate, Iontophoresis, Psoriasis, Hydrogel, Microemulsion.