

OPTIMIZACIÓN METODOLÓGICA PARA ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD *in vitro* EMPLEADO LOS MODELOS DE CELDA DE FRANZ HORIZONTAL Y VERTICAL

**JUAN CAMILO LASSO REYES
JHON FREDDY RUIZ DURANGO**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
SANTIAGO DE CALI**

2017

OPTIMIZACIÓN METODOLÓGICA PARA ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD *in vitro* EMPLEADO LOS MODELOS DE CELDA DE FRANZ HORIZONTAL Y VERTICAL

JUAN CAMILO LASSO REYES

JHON FREDDY RUIZ DURANGO

Trabajo de grado para optar al título de pregrado en Química Farmacéutica

Director: Constain Hugo Salamanca Mejía PhD.

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES


DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

SANTIAGO DE CALI

2017



APROBADO POR:



Christian Javier Yarce
Evaluador



Constain Hugo Salamanca
Tutor del Proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente, son nuestros padres y abuelos a quienes queremos agradecerles, porque han sido seres comprometidos con nuestro desarrollo profesional y personal, nos han guiado en todos y cada uno de los momentos de nuestras vidas, debemos reconocerlos como personas ejemplares que desde su posición han tenido la sabiduría y la paciencia para ayudarnos a interponernos a cualquier adversidad.

Además, queremos agradecer a nuestro tutor, Constain Salamanca, por sus palabras de aliento y sus enseñanzas, también a Cristhian Yarce porque estas personas significaron un apoyo importante durante todo el proceso de desarrollo profesional y personal durante nuestro paso por el grupo de investigación fisicoquímica farmacéutica (GIFF), grupo al cual le agradecemos por su colaboración y apoyo durante el proyecto.

Agradecemos enormemente a nuestros compañeros en general y a los “Lords”, sencillamente por haber compartido experiencias maravillosas, académicas y personales, las cuales han sido parte de nuestro crecimiento en la etapa universitaria.

Por ultimo pero no menos importante, agradecer a cada uno de los profesores que hicieron parte de nuestro proceso de formación, por su paciencia y su vocación, por su compromiso con nuestra educación y por habernos aportado un granito de arena en cada una de las áreas, para poder materializar este proyecto.

CONTENIDO

LISTADO DE FIGURAS.....	7
LISTADO DE ECUACIONES.....	8
LISTADO DE TABLAS.....	9
1 RESUMEN DEL PROYECTO:.....	11
2 ABSTRACT.....	12
3 INTRODUCCIÓN:.....	13
3.1 PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA O PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN EN TÉRMINOS DE NECESIDADES Y PERTINENCIA:.....	13
4 MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.....	15
4.1 ESTADO DEL ARTE.....	15
4.2 MARCO TEORICO.....	18
4.2.1 Permeabilidad.....	18
4.2.2 Factores a controlar en estudios de permeabilidad.....	18
4.2.3 Membranas empleadas en la metodología de celdas de Franz.....	19
4.2.4 Celdas de Franz.....	21
4.2.5 Azul de metileno.....	23
5 OBJETIVO GENERAL.....	25
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
6 METODOLOGÍA PROPUESTA:.....	26
6.1.1 Materiales:.....	26
6.1.2 Metodología:.....	26
6.1.3 Preparación del montaje de celda vertical y horizontal.....	26
6.1.4 Obtención del perfil de permeabilidad:.....	27
6.1.5 Análisis estadístico de los datos:.....	29
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:.....	30
7.1.1 Efecto de la temperatura:.....	32
7.1.2 Efecto de la velocidad de agitación:.....	32
7.1.3 Efecto del tipo de membrana:.....	36
7.1.4 Comparación entre la celda de tipo vertical y la de tipo horizontal.....	39
8 CONCLUSIONES.....	45
9 RECOMENDACIONES.....	46

10	BIBLIOGRAFÍA	47
11	ANEXOS	54
11.1	PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE AZUL DE METILENO Y ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	54
11.2	OBTENCIÓN DEL PERFIL DE PERMEABILIDAD:.....	56
11.3	TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS.....	62
11.3.1	Efecto de la temperatura:.....	62
11.4	IMPACTO AMBIENTAL.....	66
11.5	Montaje celda vertical.....	67

LISTADO DE FIGURAS

- FIGURA 1.** COMPARACIÓN ENTRE STRAT-M® Y PIEL HUMANA (MERCK MILLIPORE CORPORATION, 2015). ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 2.** PRESENTACIÓN DE LA MEMBRANA. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 3.** MEMBRANA DE CELULOSA. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 4.** CELDA DE FRANZ TIPO VERTICAL** (PERMEGEAR, 2015). ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 5.** CELDA DE FRANZ TIPO HORIZONTAL* (PERMEGEAR, 2015).....¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 6.** ESTRUCTURA QUÍMICA DEL AZUL DE METILENO (AM) *(ELABORADA EN CHEMDRAW) ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 7. A).** GRÁFICO DEL PORCENTAJE DE AM PERMEADO A LAS DIFERENTES TEMPERATURAS EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO VERTICAL. **B).** CANTIDAD DE ACTIVO EN EL COMPARTIMENTO ACEPTOR EN RELACIÓN AL TIEMPO EN (H) A LAS DIFERENTES TEMPERATURAS DE ESTUDIO EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO VERTICAL.32
- FIGURA 8. A).** GRÁFICO DEL PORCENTAJE DE AM PERMEADO A LAS DIFERENTES TEMPERATURAS EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO HORIZONTAL. **B).** CANTIDAD DE ACTIVO EN EL COMPARTIMENTO ACEPTOR EN RELACIÓN AL TIEMPO EN (H), A LAS DIFERENTES TEMPERATURAS DE ESTUDIO EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO HORIZONTAL. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 9. A).** GRÁFICO DEL PORCENTAJE DE AM PERMEADO A LAS DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITACIÓN EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO VERTICAL. **B).** CANTIDAD DE ACTIVO EN EL COMPARTIMENTO ACEPTOR EN RELACIÓN AL TIEMPO EN (H), A LAS DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITACIÓN EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO VERTICAL. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 10. A).** GRÁFICO DEL EFECTO DEL PORCENTAJE DE AM PERMEADO A LAS DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITACIÓN EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO HORIZONTAL. **B).** CANTIDAD DE ACTIVO EN EL COMPARTIMENTO ACEPTOR EN RELACIÓN AL TIEMPO EN (H), A LAS DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITACIÓN EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO HORIZONTAL..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 11. A).** GRÁFICO DEL EFECTO DEL PORCENTAJE DE AM PERMEADO CON LAS DIFERENTES MEMBRANAS EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO VERTICAL. **B).** CANTIDAD DE ACTIVO EN EL COMPARTIMENTO ACEPTOR EN RELACIÓN AL TIEMPO EN (H), CON LA MEMBRANA DE CELULOSA Y LA STRAT-M® EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO VERTICAL. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 12. A).** GRÁFICO DEL EFECTO DEL PORCENTAJE DE AM PERMEADO CON LAS DIFERENTES MEMBRANAS EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO HORIZONTAL. **B).** CANTIDAD DE ACTIVO EN EL COMPARTIMENTO ACEPTOR EN RELACIÓN AL TIEMPO EN (H), CON LA MEMBRANA DE CELULOSA Y LA STRAT-M® EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO HORIZONTAL. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 13.** GRÁFICO DE ABSORBANCIA VS. CONCENTRACIÓN DE AZUL DE METILENO (CURVA DE CALIBRACIÓN).55

LISTADO DE ECUACIONES

- ECUACIÓN 1.** PRIMERA LEY DE FICK..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ECUACIÓN 2. SEGUNDA LEY DE FICK..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ECUACIÓN 3. CALCULO DEL ÁREA BAJO LA CURVA..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

LISTADO DE TABLAS

TABLA 1. PROMEDIO DE DATOS OBTENIDOS DE LA CELDA DE FRANZ DE TIPO VERTICAL	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 2. PROMEDIO DE DATOS OBTENIDOS DE LA CELDA DE FRANZ DE TIPO HORIZONTAL.	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 3. DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y PORCENTAJE DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN PARA LA CELDA HORIZONTAL.	41
TABLA 4. DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y PORCENTAJE DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN PARA LA CELDA VERTICAL.....	42
TABLA 5. DATOS DE LAS ABSORBANCIAS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE AZUL DE METILENO	54
TABLA 6. DATOS DEL PERFIL DE PERMEABILIDAD DE AM A 25°C Y 37°C PARA LA CELDA VERTICAL.....	56
TABLA 7. DATOS DEL PERFIL DE PERMEABILIDAD DE AM A 25°C Y 37°C PARA LA CELDA HORIZONTAL.	57
TABLA 8. DATOS DEL PERFIL DE PERMEABILIDAD DE AM A 240RPM, 360RPM Y 480RPM PARA LA CELDA VERTICAL.....	58
TABLA 9. DATOS DEL PERFIL DE PERMEABILIDAD DE AM A 240RPM, 360RPM Y 480RPM PARA LA CELDA HORIZONTAL.	59
TABLA 10. DATOS DEL PERFIL DE PERMEABILIDAD DE AM CON MEMBRANA DE CELULOSA Y STRAT-M PARA LA CELDA VERTICAL.	60
TABLA 11. DATOS DEL PERFIL DE PERMEABILIDAD DE AM CON MEMBRANA DE CELULOSA Y STRAT-M PARA LA CELDA HORIZONTAL.....	61
TABLA 12. RESULTADOS DEL TEST DE MANN WHITNEY, PARA LA COMPARACIÓN DE LA MEDIAS DE AUC, AL EVALUAR EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO VERTICAL.	62
TABLA 13. RESULTADOS DEL TEST DE MANN WHITNEY, PARA LA COMPARACIÓN DE LA MEDIAS DE K_p , AL EVALUAR EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO VERTICAL.....	62
TABLA 14. RESULTADOS DEL TEST DE MANN WHITNEY, PARA LA COMPARACIÓN DE LA MEDIAS DE T_L , AL EVALUAR EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO VERTICAL.....	63
TABLA 15. RESULTADOS DEL %CV AL ANALIZAR EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO VERTICAL, PARA PARÁMETRO EL K_p	63
TABLA 16. RESULTADOS DEL %CV AL ANALIZAR EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO VERTICAL, PARA PARÁMETRO EL T_L	63
TABLA 17. RESULTADOS DEL TEST DE MANN WHITNEY, PARA LA COMPARACIÓN DE LA MEDIAS DE AUC, AL EVALUAR EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO HORIZONTAL.....	64
TABLA 18. RESULTADOS DEL TEST DE MANN WHITNEY, PARA LA COMPARACIÓN DE LA MEDIAS DE K_p , AL EVALUAR EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO HORIZONTAL.	64

TABLA 19. RESULTADOS DEL TEST DE MANN WHITNEY, PARA LA COMPARACIÓN DE LA MEDIAS DE T_L , AL EVALUAR EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO HORIZONTAL.	64
TABLA 20. RESULTADOS DEL %CV AL ANALIZAR EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO HORIZONTAL, PARA PARÁMETRO EL K_P	64
TABLA 21. RESULTADOS DEL %CV AL ANALIZAR EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CELDA DE FRANZ DE TIPO HORIZONTAL, PARA PARÁMETRO EL T_L	65

1 RESUMEN DEL PROYECTO:

Para la predicción de la permeabilidad transdérmica de fármacos, se han desarrollado diversos métodos experimentales entre los que se destacan las determinaciones *in vivo*, *in situ* e *in vitro*, las cuales varían en complejidad experimental y en costo de ejecución. En la actualidad, los estudios de permeabilidad transdérmica *in vitro* con celdas de Franz han mostrado un interesante incremento en su utilización; sin embargo, se ha encontrado que dicha metodología presenta cierta variabilidad entre los resultados obtenidos por un laboratorio u otro. En ese sentido, este proyecto investigativo busca optimizar la metodología de celdas de difusión de Franz utilizando los modelos de tipo horizontal y vertical, con el fin de obtener mayor reproducibilidad y menor variabilidad en los resultados y, con ello, establecer cuáles son las variables operacionales más críticas, dando información útil a aquellas personas que deseen hacer uso de la misma.

Para este estudio, se realizaron ensayos de permeabilidad por un tiempo de 8 horas por triplicado, con un volumen nominal de celda vertical de 125 mL y una celda horizontal de 126 mL (en cada compartimento). Se utilizó solución de azul de metileno como sustrato modelo a una concentración de 200 μ M. Todos los ensayos se realizaron a dos condiciones de temperatura, correspondientes a 25°C y a 37°C, tres velocidades de agitación correspondientes a 240 rpm, 360 rpm y 480 rpm y dos tipos de membranas correspondientes a celulosa y Strat-M®, con el fin de emular las condiciones en las que ocurre el proceso de absorción de un fármaco a través de la piel. Por medio de la obtención de perfiles cinéticos de permeabilidad, se obtuvieron valores de áreas bajo la curva [AUC], coeficientes de permeabilidad [Kp] y el periodo de latencia [T_L] para cada una de las combinaciones de variables operaciones de esta metodología.

Los resultados del estudio muestran que las variables operacionales de velocidad de agitación y tipo de membrana son críticas para esta metodología, mientras que la temperatura no lo es entre 25°C y 37°C. Al comparar el tipo de celda (vertical y horizontal) en términos de reproducibilidad, se encontró que la celda horizontal es más reproducible que la celda vertical.

Palabras claves: Celdas de Franz, azul de metileno, permeabilidad, optimización, variables operacionales.

2 ABSTRACT

For the prediction of the transdermal drug permeability, several experimental methods have been developed, among them *in vivo*, *in situ* and *in vitro* determinations, which vary in experimental complexity and execution cost, stand out. Nowadays, the studies of *in vitro* transdermal permeability with Franz cells have shown an interesting increase in its use, however, it has been found that this methodology is variable in results obtained from laboratory to laboratory. In order to obtain greater reproducibility and lower variability of results in this methodology used in preformulation studies, this research project proposal seeks to optimize the Franz diffusion cell methodology, using horizontal and vertical type models. Thus, , to establish which are the most critical operational variables, giving useful information to those people who pretend to use this methodology.

For this study, triplicate assays were performed for a time of 8 hours, with a nominal volume of 125 mL vertical cell and a 126 mL horizontal cell (in each compartment). Methylene Blue was used as the model substrate at a concentration of 200 μ M. These tests were performed at two temperature conditions, corresponding to 25 ° C and 37 ° C, three shaking velocities corresponding to 240 rpm, 360 rpm and 480 rpm and two types of membranes corresponding to cellulose and Strat-M®, in order to emulate the conditions in which the process of absorption of a drug through the skin occurs. The values of areas under the curve (AUC), permeability coefficients (Kp) and the latency period (TL) were obtained for each of the combinations of variable operations of this methodology by obtaining permeability kinetic profiles.

The results of this study show that the operational variables of agitation velocity and membrane type are critical for this methodology and that the temperature is not between 25°C and 37°C. When comparing the cell type (vertical and horizontal) in terms of reproducibility, the study found that the horizontal cell is more reproducible than the vertical cell.

Key words: Franz cells, methylene blue, permeability, optimization, operational variables

3 INTRODUCCIÓN:

3.1 PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA O PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN EN TÉRMINOS DE NECESIDADES Y PERTINENCIA:

En los estudios de formulación de medicamentos es necesaria la realización de una serie de estudios fisicoquímicos, biológicos y farmacológicos, que permitan dar información acerca del posible comportamiento que tendrá un fármaco en un organismo vivo. Para ello, los estudios *in vitro* corresponden a una alternativa de estudio viable en las etapas tempranas de investigación, ya que permiten obtener una gran cantidad de información para poder discriminar sobre cuáles sistemas serán los candidatos potenciales y, con ello, establecer los prototipos de estudio y o evaluación. En este sentido, los estudios fisicoquímicos, tales como los termodinámicos (solubilidad y reparto o/w), o los cinéticos (velocidad de disolución y permeabilidad) proporcionan información fundamental acerca de las características preliminares del posible comportamiento que presentará determinado fármaco, ya sea solo o vehiculizado en un sistema de dosificación determinado. De acuerdo a lo anterior, existe la necesidad del continuo desarrollo e implementación de técnicas que permitan a los investigadores evaluar tales características de una manera rápida y sencilla, permitiendo la toma de decisiones sobre cuáles pueden ser los mejores prototipos de medicamentos y así pasar a posteriores etapas de evaluación más complejas y costosas.

Para el caso de los estudios de solubilidad y cinética de disolución, se han desarrollado diversas técnicas útiles las cuales se encuentran muy bien referenciadas y adaptadas por los diferentes laboratorios de investigación y/o producción de medicamentos; sin embargo, para los estudios relacionados con la evaluación de la permeabilidad *in vitro* la situación es opuesta, pues la información e implementación de dichas metodologías no se encuentra tan extendida y/o adaptada. Pese a dicha situación, existen varias metodologías para esta clase de estudios, donde se destaca la técnica de difusión bicompartimental de celdas de Franz (Yolima Baena, Leidy J. Dallos, Rubén H. Manzo, Luisa F. Ponce D'León., 2011).

Actualmente, la metodología de las celdas de Franz es uno de los procedimientos más sencillos y económicos para los estudios de permeabilidad *in vitro*. En la evaluación de optimización de prototipos de dosificación farmacéutica de tipo semisólido (Kumar, P. Sanghvi, P. Collins, P. Charles, C., 1993) (Bonferoni, M. C. Rossi, S. Ferrari, F. Caramella, C., 1998) (Klimundová, J. Šatinský, H. Sklenářová, P. Solich, D., 2006). Por otro lado, la farmacopea de los Estados Unidos (USP 39 NF34) ha recomendado dicha metodología como técnica de control de

especificaciones de calidad y prueba de desempeño de productos transdérmicos y tópicos (The United States Pharmacopeial Convention, 2017) .

No obstante, es importante resaltar que, aunque existe un notorio incremento en la utilización de esta metodología, se aprecia que muchas de las conclusiones reportadas están relacionadas con una alta variabilidad en los resultados; dicha variabilidad puede deberse a que no se tiene una adecuada utilización o manejo de la misma (Oltra Noguera, 2010). Asimismo, llama la atención que, pese a dichas conclusiones, no existe información concreta y específica orientada a evidenciar cuáles son las variables operacionales que pueden afectar significativamente la metodología. Es por esto que la investigación realizada en este trabajo, se enfocó en optimizar una metodología de celdas de Franz, utilizando dos tipos (horizontal y vertical) y con ello, establecer cuáles son los aspectos y/o variables más importantes a considerar cuando esta se utiliza.

4 MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

4.1 ESTADO DEL ARTE

Los estudios de permeabilidad *in vitro* utilizando celdas de difusión de Franz se han reportado desde la década de los 70 (Franz T. , 1978) donde se destacan los estudios de Thomas Franz, En los que evalúa la absorción de 12 compuestos orgánicos en dichas celdas, encontrándose que hay una buena concordancia entre los resultados en *in vitro* e *in vivo* (Franz T. J., 1975). En los años 80, Shah evaluó la liberación *in vitro* de la hidrocortisona a partir de emulsiones en celdas de difusión de Franz y con diversas membranas sintéticas (Vinod P Shah, Jerome Elkins, See-Yan Lam, Jerime P. Skelly., 1989). En la década de los 90, Vlachou preparo y evaluó *in vitro* varias formulaciones de gel de griseofulvina; los perfiles de liberación *in vitro* de estas formulaciones se realizaron a través de celdas de difusión de Franz con membranas artificiales y de piel humana extirpada (M.D Vlachou, D.M Rekkas, P.P Dallas y N.H Choulis. , 1992).

Los artículos sobre dicha metodología se han incrementado exponencialmente desde el año 2006, donde Netzlaff investigó la idoneidad de las mediciones de pérdida de agua transepidermica (TEWL) *in vitro* como una prueba de integridad de barrera para la epidermis, separada por calor humano (HSE) mediante un sistema modelo consistente en una membrana de teflón montada en células de difusión de Franz (Frank Netzlaff a , Karl-Heinz Kostka b , Claus-Michael Lehr a, Ulrich F. Schaefer a., 2006). En el 2008, Shinde Anil y su grupo de investigación diseñaron parches de matriz transdérmica con hidrocloruro de tramadol, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo al cual se le realizaron estudios de difusión *in vitro*, utilizando membranas de acetato de celulosa (tamaño de poro 0,45 μ) en una celda de difusión de Franz de tipo vertical (Shinde Anil, Garala Kevin y More Harinath, 2008).

Por otro lado en el 2009 Veerabahu Shanmugasundaram y colaboradores desarrollaron un modelo QSAR de regresión lineal múltiple basado en un conjunto de 61 compuestos a los que se les evaluó permeabilidad a través de la célula de Franz, debido a la necesidad de encontrar un modelo matemático que permita describir el fenómeno de permeación a través de celdas de difusión de Franz (Pil H. Lee a , Robert Conradi b , Veerabahu Shanmugasundaram, 2009).

A partir del 2010 se incrementa el uso de las celdas de difusión de Franz en estudios de liberación transdérmica de diversas formulaciones, como en el caso de Lucía Lhez y su grupo de investigación de la universidad nacional de San Luis, que estudió el comportamiento *ex vivo* de una formulación de enalapril maleato para su administración por vía transdérmica, utilizando piel de oreja de cerdo. Los experimentos se realizaron en celdas de difusión vertical tipo Franz (Lucía Lhez,

Nora B. Pappano y Nora B, 2010). Por otro lado, en el 2011, Rosario Gutiérrez en su trabajo doctoral en la universidad complutense de Madrid realizó estudios de difusión de formulaciones liposómicas de Aciclovir por medio de celdas de difusión de Franz (Molina, 2011).

María Debandi realizó estudios sobre la cinética de liberación utilizando celdas de Franz tipo vertical de distintas membranas, para la liberación *in vitro* de principios activos anticelulíticos. Los perfiles de liberación obtenidos con las tres membranas, indicaron la posibilidad de usar una membrana comercial de celulosa en reemplazo de membranas preparadas con piel de oreja de cerdo en los estudios *in vitro* de permeación de activos cosméticos (María V. Debandi, Nora J. François, Marta E. Daraio., 2011). Debido a la alta variabilidad de resultados de la metodología mencionada, Yuliya Levintova realizó una mejora a la técnica de celdas de Franz al implementar membranas que eviten su descomposición cuando se realice el estudio en condiciones fisiológicas (Yuliya Levintova, Fotios M. Plakogiannis, Robert A. Bellantone, 2011).

En el 2012, se evaluó la capacidad del metacrilato de Metil-celulosa, un nuevo polisacárido hidrofólicamente modificado -hidroxipropil-, para controlar la liberación del fármaco en formulaciones semisólidas. La liberación fue evaluada mediante la implementación celdas de difusión de Franz de tipo vertical (Lucero, M. Claro, C. Casas, M. Jiménez-Castellanos, M., 2012). Asimismo Alain Pineau junto con su grupo de investigación de la universidad de Poitier, estudiaron la absorción transdérmica del clorhidrato de aluminio utilizando celdas de difusión de Franz de tipo vertical (Alain Pineau b , Olivier Guillard a , Bernard Fauconneau d , Frédéric Favreau a, Marie-Helene Marty C, Angeline Gaudin C, Claire Marie Vincent C, Anni Marraud A, Jean-Paul Marty C., 2012). Por otro lado, André Bersani y su grupo de investigación de la universidad de Sao Paulo, evaluaron la permeabilidad de lamivudina (3TC) y zidovudina (AZT) utilizando un método *ex vivo* diferente en celdas de Franz, donde se insertó segmentos de yeyuno en células de Franz con el fin de evaluar la permeabilidad del fármaco (André Bersani Dezani, Thaisa Marinho Pereira, Arthur Massabki Caffaro, Juliana Mazza Reis, Cristina Helena Dos Reis Serra, 2013).

Otro de los estudios fue realizado por Danhua Liu y su grupo de investigación en el 2015, donde evaluaron la velocidad de permeación de gestodeno en diferentes materiales biodegradables. Estos estudios de difusión *in vitro*, se realizaron utilizando celdas de difusión de Franz de tipo horizontal (Danhua Liu, Chong Zhang, Xiaowei Zhang, Zhu Zhen, Ping Wang, Jianxin Li, Dongxu Yi, Ying Jin, Dan Yang., 2015). Un estudio muy interesante, fue el que desarrollaron en abril del 2016 Mauricio Espinal Ruiz y colaboradores del departamento de química de la universidad nacional de Colombia, donde estudiaron el efecto de pectinas sobre la cinética de transferencia de masa de monosacáridos, aminoácidos en una emulsión de aceite de maíz en agua, en celdas de difusión de Franz de tipo vertical (Espinal, M. Restrepo, L. Narváez, C., 2016).

Las celdas de difusión de Franz también han sido empleadas para el estudio de la permeabilidad de nanoemulsiones, como lo presento en su trabajo Victoria Ospina y sus colaboradores, que determinaron la difusión y retención en piel humana de la PcAlCl contenida en una nanoemulsión para la optimización de formulaciones tópicas; la permeación se determinó en ensayos en celdas de difusión de Franz (Victoria Eugenia Ospina, Julio Cesar Mantilla, Carlos Arturo Conde, Patricia Escobar., 2014). También se ha determinado la permeabilidad de nano partículas poliméricas, como lo hizo Balzus al estudiar la liberación de dexametasona a partir de nano partículas poliméricas, por medio de las celdas de difusión de Franz (Balzus, Sahle, Hönzke, Gerecke, Schumacher, Hedtrich, Kleuser, Bodmeier., 2017).

Por otro lado, Zeb Alam y colaboradores investigaron la actividad anti-reumática *in vivo* del gel liposomal metotrexato, ocluida (MTX-UDL-gel) en modelo de rata con artritis inducida por adyuvante. Para la permeación de MTX-UDL-gel a través de piel de rata, se usó la metodología de celdas de difusión Franz (Zeb, A. Qureshi, O. Yu, C. Akram, M. Kim, H. Kim, M. Kang, J. Majid, A. Chang, S. Bae, E. , 2017).

En octubre del 2016, Alice Simona y su grupo realizaron estudios de permeación con celdas de difusión de Franz utilizando diferentes membranas poliméricas sintéticas y piel de oreja de cerdo, para evaluar el sistema de administración transdérmica del fármaco rivastigmina (Simona, A. Amarob, M. Healyb, A. Cabrala, L. Pereira, V., 2016), asimismo lo continuaron haciendo miembros de la universidad de Lyon realizando un estudio en el que se analizó la permeación *in vitro* de un Antibiótico, enrofloxacino, administrado percutáneamente a la piel de una serpiente (Python molurus Bivittatus), usando también celdas difusión de Franz (Ducrotté, A. Kirilova, P. Salvia, J. Trana, V. Doreb, V. Marignacb, G. Pignonb, C. Perrotb, S. Boulieua, R. Université de Lyon., 2016). Por otro lado, Jaroslav en un estudio de la administración transdérmica de la ciclosporina A por la irradiación de plasma atmosférico, determina el flujo de fármaco y la cantidad de fármaco penetrado a través de la piel mediante las celdas de difusión de Franz (Kristof, J. Miyamoto, H. Tran, A. Blajan, M. Shimizu, K, 2017).

Nguyen utilizó micro agujas maltosa para la administración transdérmica de doxorubicina y para la caracterización de esta forma farmacéutica, aplicó la metodología de celdas de difusión de Franz de tipo vertical para determinar la permeabilidad de las micro agujas (Nguyen, H. Banga, A., 2017). Finalmente, dentro de los últimos estudios que se han desarrollado empleando la metodología de celdas de Franz, está un ensayo, llevado a cabo por Gudnason y colaboradores, con el fin de analizar las características de lentes cargados con fármacos (SCL) y establecer características de estos sistemas de dosificación (Gudnasona, K. Solodovab, S. Vilardellc, A. Massonb, M. Sigurdssona, S. Jonsdottira, F., 2017).

4.2 MARCO TEORICO

4.2.1 Permeabilidad

Para que un fármaco pueda permear una membrana deberá primero tener la capacidad para llegar a ella. Las interacciones intermoleculares que se presentan entre un soluto y el solvente, son muy importantes ya que el fenómeno de difusión ocurre solo si el soluto es soluble en el solvente. Así pues, aparece el concepto de difusión descrito por Fick, que en términos de ecuaciones se muestra así (Larissa Zhou, Kendra Nyberg, Amy C. Rowat., 2015)

Primera ley de Fick

$$J_i = -D_i \nabla C_i$$

Ecuación 1. Primera ley de Fick

J_i expresado en unidades de $\text{mol cm}^{-2}\text{s}^{-1}$, es el flujo que presenta un determinado soluto y depende de la facilidad que tengan las moléculas para moverse a través del medio (D_i) en unidades de cm^2s^{-1} ; este término conocido como el coeficiente de difusión correspondiente a la especie i en el sistema. Finalmente ∇C_i es el gradiente de concentración en el sistema (Jiang, Xiaoyun. Xu, Mingyu. Qi, Haitao., 2010).

Segunda ley de Fick

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} - D_i \nabla^2 C_i = \frac{\partial C_i}{\partial t} - D_i \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_i}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \right) = 0$$

Ecuación 2. Segunda ley de Fick

Si se le aplica la ley de Stokes a la primera ley de Fick, se llega a la ecuación anterior. Sin embargo, en esta ley se representa la difusión como la variación de la concentración de la especie i en un punto determinado, evaluado con respecto al tiempo (Silverthorn, 2009).

Ahora bien, la permeabilidad es uno de los parámetros que se deben evaluar en estudios *in vitro* al igual que la disolución, ya que estos son de vital importancia en los estudios de preformulación de productos farmacéuticos de uso tópico. En este estudio nos centramos en la permeabilidad, la cual es definida como la capacidad que posee una molécula para atravesar una membrana usando un gradiente de concentración (el flujo ocurre desde el espacio con mayor potencial químico al de menor potencial químico), de una zona de mayor concentración a una de menor concentración. Esto, siempre y cuando sean controladas algunas variables como la temperatura, pH, concentración, velocidad de agitación y tipo de membrana,

además de factores intrínsecos de la molécula como lo son el tamaño y la polaridad de la molécula (Rosenbaum, 2011).

4.2.2 Factores a controlar en estudios de permeabilidad

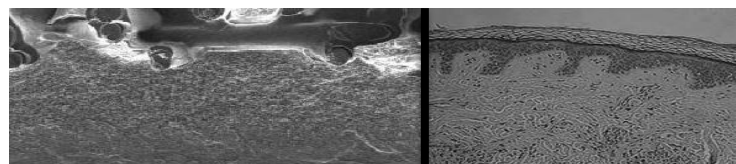
- Tamaño de las moléculas prototipo: es un factor relevante si se tiene presente cuál será la vía de absorción que primará para el fármaco. Por lo tanto el tamaño que posea la molécula a la que se le desee realizar la evaluación de la permeabilidad, es de vital importancia ya que se debe tener en cuenta que existen dos vías de absorción celular: la vía transcelular y la vía paracelular. Dependiendo del tamaño de la molécula, se favorecerá una vía de absorción u otra.
- Temperatura: es el grado de movimiento térmico aleatorio de las moléculas (Yunus Cengel, Michael Boles, 2012). Este parámetro afecta directamente la solubilidad y por ende, el fenómeno de permeabilidad, ya que, al aumentar el movimiento de las moléculas de soluto y de solvente (vibración, rotación y traslación), se ven favorecidas las interacciones de tipo soluto-solvente. Dicho parámetro es muy importante, debido a que la difusión ocurre si se tiene solubilidad de la molécula de estudio en el medio, por tanto, es uno de los factores más críticos en estudios de permeabilidad.
- pH: es uno de los aspectos fisicoquímicos más importantes para moléculas polares principalmente, ya que el grado de ionización de las moléculas modifica en gran medida la solubilidad de las mismas y, por ende, el paso a través de las membranas, aún más si se tiene en cuenta el carácter lipofílico que tenga la membrana y los grupos funcionales de la molécula en estudio (Rosenbaum, 2011).
- Naturaleza de la membrana: las membranas normalmente son de carácter lipofílico en su interior debido a su composición fosfolipídica, lo cual es un factor determinante en los procesos de permeabilidad de fármacos o moléculas que posean una polaridad; pues si la afinidad de la molécula por la membrana es mayor que la afinidad de la misma por el medio, la molécula tenderá a quedarse retenida en la membrana, sin embargo, también se tiene una afinidad muy marcada de la molécula hacia el medio continuo, esta se verá repelida por la membrana y no la atravesará. Es por esta razón que controlar el carácter lipofílico de la membrana. Permite gran variabilidad de ensayos de acuerdo a los requerimientos del estudio y el tipo de molécula empleada. Por otra parte, la naturaleza de la membrana también incluye el tamaño del poro, ya que, a un mayor tamaño de poro, una cantidad de moléculas de mayor tamaño podrán atravesar la membrana (Aguilar, 1983).

- Velocidad de agitación: su importancia radica en que las moléculas de estudio pueden que no presenten una solubilidad constante en el tiempo, por lo que, a medida que transcurre el experimento, puede que el soluto tenga tendencia a precipitar. Lo que se busca con la agitación es proporcionar un aporte entrópico al sistema, que evite la formación de precipitados. El aumento en la velocidad de agitación en el compartimento donador, hace que la molécula modelo llegue más rápido a la interfase con la membrana, y, que en el compartimento aceptor, las moléculas que permean se difundan más rápida y homogéneamente alejándose de la interfase con la membrana hasta alcanzar el pseudoequilibrio.

4.2.3 Membranas empleadas en la metodología de celdas de Franz

Los estudios que se llevan a cabo en celdas de Franz, son estudios *in vitro* que permiten obtener información de los perfiles de permeabilidad de fármacos al emular las condiciones reales, con el fin de entender fenómenos que se puedan presentar en la permeabilidad de una molécula a través de una membrana muy similar a la de la piel, antes de pasar a estudios *in vivo* con animales. Se utilizan para el estudio membranas de celulosa (comúnmente usadas en diálisis) y se escoge experimentar con membrana Strat-M®, debido a que posee un carácter lipofílico muy similar a las condiciones de la piel. El gran beneficio que proporcionan estas membranas sintéticas, es que se logra reducir la variabilidad que se puede presentar al emplear tejido humano, además de que los estudios son más rápidos (Uchida, Kadhum, Kanai, Todo, Oshizaka, & Sugibayashi, 2015).

Este modelo de membrana predice adecuadamente el paso de fármacos a través de la piel. Las Strat-M® mostradas en la Figura 1, por ejemplo, son seguras, poco variables, fáciles de manejar y se pueden almacenar a condición ambiente, además reproducibles y su composición es de dos capas de polietersulfona (PES), lo cual las hace más resistentes a la difusión. Por otro lado, en su revés está constituida de una capa de poliolefina, proporcionándole una combinación perfecta de resistencia a la difusión por un lado y difusividad por el otro. Principalmente, estas son capas poliméricas que se ordenan de tal forma que producen una superficie porosa que cumple el papel homologa a un filtro por tamaño, no obstante, estas membranas emulan las condiciones apolares de la piel gracias a la capa sintética de lípidos (Janani, Kumar, Balakrishna, Surthi, Kumar, & Mantry, 2014). Sin embargo son un poco costosas si se tiene en cuenta la cantidad de experimentos que se realizaron.



Membrana Sintética (Strat-M®)

Diel humana

Figura 1. Comparación entre Strat-M® y piel humana (Merck Millipore Corporation, 2015).

Las membranas Strat-M®, presentan alta sensibilidad y son apropiadas para estudios de permeabilidad. Gracias a su alta reproducibilidad, fácil manejo y su presentación, evita trabajo de acondicionamiento debido a que ya se encuentran cortadas de forma circular, con un tamaño de 25mm y no requieren hidratación previa, Figura 2 (Merck Millipore Corporation, 2015).



Figura 2. Presentación de la membrana.

Por su parte, la membrana que se emplea como variable fija en el estudio es la membrana de celulosa Figura 3. Esta es una membrana utilizada comúnmente en procedimientos de diálisis, gracias a su tamaño de 76mm (3 pulgadas), su bajo costo, buena reproducibilidad, además es afín a la molécula modelo que se emplea para estos estudios (AM), lo cual permite que la molécula la atraviese sin mayor dificultad, aunque una parte se queda suspendida en la membrana. Por todo ello, esta es la membrana más apropiada para realizar optimizaciones de variables operacionales en estudios de permeabilidad.



Figura 3. Membrana de Celulosa.

4.2.4 Celdas de Franz

Las celdas de Franz son una metodología utilizada para realizar estudios de permeabilidad, aunque son una técnica que presenta como principal dificultad la poca reproducibilidad de los experimentos. Dicha metodología ha sido muy útil dado que proporciona información en tiempo real, lo cual permite establecer perfiles de permeabilidad individuales y específicos, aportando información detallada con el objetivo de predecir el efecto de variables operacionales como: temperatura, pH, concentración, velocidad de agitación, tipo de membrana, tamaño de poro de la membrana, entre otros, en el proceso cinético de permeación. (Alves, y otros, 2016)

Las celdas de Franz son un tipo de recipientes bicompartimentales: Constituidos por un donador (donde se dispone la molécula modelo) y un compartimento aceptor (hacia el cual permea la molécula modelo), habitualmente construidas de vidrio de boro silicato y con un volumen efectivo definido. Lo que separa los dos compartimentos es una membrana, que expone un área específica hacia los dos compartimentos; por medio de esta metodología es posible acondicionar el ensayo.

En cuanto a la temperatura, esta variable es posible controlarla por medio de una chaqueta térmica que rodea las celdas (por la cual, pasa en reflujo agua a la temperatura establecida según el estudio), en cuanto a la velocidad de agitación; las celdas están acopladas a una plancha de agitación (que regula los rpm con que se desarrolla el estudio). Por su parte, el compartimento aceptor posee un desprendimiento lateral por el cual se realiza el muestreo, para evaluar por medio de espectrofotometría UV cuantitativamente el sustrato modelo. (Aguilera, Saez, Hardly, & Estévez, 2000).

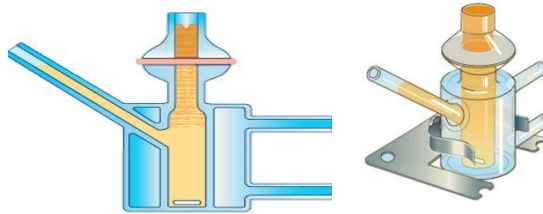
En los últimos años, el desarrollo de nuevos fármacos ha tenido un aumento considerable y, con ello, los estudios de preformulación, por ello es muy importante determinar aspectos que influyen directamente sobre la biodisponibilidad del fármaco en el cuerpo. En las celdas de Franz es posible asociar y controlar una serie de variables que condicionan los resultados que se tienen en los estudios, además de tener en cuenta aspectos económicos y de accesibilidad. La temperatura para este caso es supremamente crítica, al igual que la velocidad de agitación, la naturaleza de la membrana y el tipo de celda que se emplee en el ensayo. Es por ello que se debe tener sumo cuidado en el planteamiento de las condiciones de experimentación. (Avdeef, 2003).

4.2.4.1 Celda de Franz de tipo vertical

Las celdas verticales son de mayor complejidad, debido a que los desprendimientos laterales para muestrear son muy estrechos y al sacar la muestra se afecta la presión del sistema (lo que ocasiona un desbalance en la cantidad de agua en el recipiente donador, sin embargo esta disposición de las celdas requiere menos cantidad de muestra. Uno de los aspectos más críticos en esta metodología es la adaptación de la membrana, debido a que en algunos casos y en algunos tipos de membranas, es necesario hidratar por 24h aproximadamente (esta es una medida empleada para evitar la formación de la burbuja de aire entre la membrana y el medio aceptor, producto del calentamiento y la agitación). No obstante esto ocurre para las membranas de celulosa y no para la membrana Strat-M®.

Estas celdas son utilizadas principalmente en estudios de preformulación donde se evalúa la permeabilidad de fármacos de aplicación transdérmica, gracias a que

su disposición es propicia para disponer en el compartimento donador, suspensiones, geles, cremas o pastas de uso tópico.



*Disponibile en: [<http://permeGear.com/side-bi-side-cells/>]

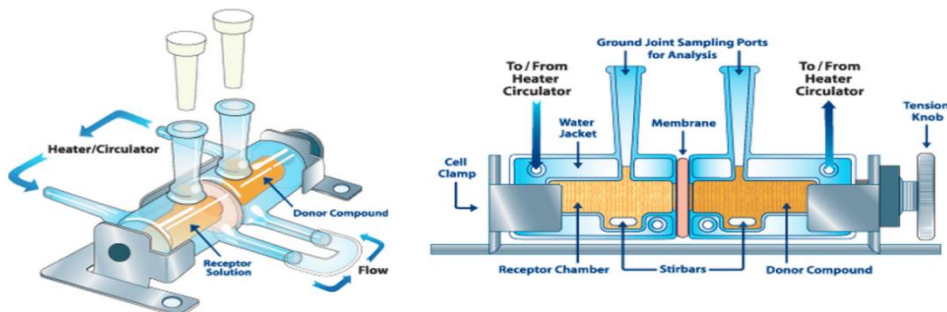
**Disponibile en: [<http://permeGear.com/parts-of-a-franz-cell/>]

Figura 4. Celda de Franz tipo vertical** (PermeGear, 2015)

4.2.4.2 Celda de Franz de tipo horizontal

Poseen una disposición que es menos afectada por la gravedad, pero requieren un volumen más grande de muestra. En cuestiones operacionales, la adaptabilidad de la membrana en las celdas de tipo horizontal es mucho más compleja que en las celdas de tipo vertical; ya que se debe tener en cuenta que no se puede derramar el agua de ninguno de los dos compartimentos, lo cual afectaría el volumen efectivo y por ende la reproducibilidad del experimento.

Estas celdas normalmente tienen un mayor uso en estudios de permeabilidad para fármacos, no solo de aplicación transdérmica sino también en fármacos de liberación intestinal, ya que la disposición de estas celdas permite acondicionar la velocidad de agitación en ambos compartimentos, al igual que la temperatura, además, son ideales para realizar estudios con diferentes tipos de membranas.



*Disponibile en: [<http://permeGear.com/side-bi-side-cells/>]

**Disponibile en: [<http://permeGear.com/parts-of-a-franz-cell/>]

Figura 5. Celda de Franz tipo horizontal* (PermeGear, 2015)

4.2.5 Azul de metileno

Para esta parte del estudio se utilizó azul de metileno como molécula modelo, la cual se muestra en la Figura 6, debido a que ésta es una molécula muy soluble en medios acuosos (40g/L en agua) (Iannacone & Alvariano, 2007), es estable químicamente a condiciones habituales de pH y permite evidenciar la existencia de fugas en el montaje del sistema de permeabilidad de celdas de difusión de Franz, debido a su capacidad de colorear. Económicamente presenta muchos beneficios en cuanto a los aspectos operacionales de estos estudios, y además de que se tiene evidencia de estandarizaciones de la metodología donde se utiliza dicha molécula como modelo. Por otra parte, su tamaño es propicio para el desarrollo de estudios de permeabilidad (PM = 319,85 g/mol), teniendo en cuenta las membranas empleadas en el experimento. Finalmente es una molécula que se puede cuantificar por medio de espectrofotometría UV, lo que la hace supremamente conveniente para este tipo de estudios. Quizás una de las pocas desventajas que posee es que es una molécula susceptible a hidrólisis y a oxidación en caso de estar en un medio con agentes reductores fuertes, como se puede ver por su estructura molecular.

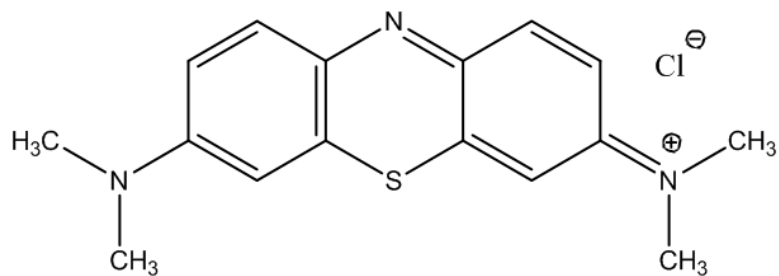


Figura 6. Estructura química del azul de metileno (AM) *(Elaborada en Chemdraw)

5 OBJETIVO GENERAL

Optimizar la metodología de celdas de difusión de Franz, evaluando la permeabilidad de azul de metileno en dos modelos correspondientes a tipo vertical y horizontal a diferentes variables operacionales.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la temperatura sobre los perfiles de permeabilidad del sustrato modelo azul de metileno por un tiempo de 8 horas, empleando celdas de difusión de Franz de tipo horizontal y vertical con membrana de celulosa y una velocidad de agitación de 360 rpm.
- Evaluar el efecto de la velocidad de agitación sobre los perfiles de permeabilidad del sustrato modelo azul de metileno por un tiempo de 8 horas, empleando celdas de difusión de Franz de tipo horizontal y vertical con membrana de celulosa a 37°C.
- Evaluar el efecto del tipo de membrana sobre los perfiles de permeabilidad del sustrato modelo azul de metileno por un tiempo de 8 horas, empleando celdas de difusión de Franz de tipo horizontal y vertical a 37°C y una velocidad de agitación de 360 rpm.
- Comparar las celdas de tipo vertical y horizontal, en términos de reproducibilidad a las diferentes variables operacionales identificadas como críticas, por medio de análisis estadístico.

6 METODOLOGÍA PROPUESTA:

6.1.1 Materiales:

Los compuestos que se utilizaron en la parte experimental fueron: Azul de metileno marca Merck®, proporcionado por los almacenes de la universidad Icesi. Las membranas que se utilizaron fueron: membranas de Celulosa para diálisis con peso molecular típico de corte de 14.000 daltons marca Aldrich y membrana Strat-M®. Líquidos de referencia: Agua ultra pura tipo I, obtenida a partir de un sistema de purificación (Arium pro Stedim biotecnología VF Sartorius), con un valor de conductividad de 0.056 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

6.1.1.1 Cuantificación de azul de metileno:

Se preparó una solución stock de azul de metileno grado analítico, a una concentración de 20 μM en agua destilada, a partir de esta se realizaron 5 diluciones en 1:2, con el objetivo de realizar una curva de calibración que permitiera la posterior cuantificación del azul de metileno, a una absorbancia a 664 nm. Finalmente, se realizó una regresión lineal por mínimos cuadrados para obtener la ecuación de la recta de Beer-Lambert, esto se hizo para cada una de las temperaturas establecidas en el estudio.

6.1.2 Metodología:

6.1.2.1 Montaje

Se encendió la termocupla acoplada al espectrofotómetro 2 horas antes de comenzar cada experimento y se acondicionó a la temperatura a realizar el estudio. Concomitantemente, se realizó el ajuste del espectrofotómetro a una absorbancia de 664 nm por medio de su programa digital (U.V prove) y se acondicionó el termostato 30 minutos antes de iniciar para atemperar el agua que recirculaba por la chaqueta térmica.

6.1.3 Preparación del montaje de celda vertical y horizontal.

6.1.3.1 Preparación de montaje de la celda vertical:

Se activó la membrana que se utilizó (si es de celulosa), para ello se dejó sumergida en agua destilada. Se llenó con agua destilada el baño maría termostatado hasta el tope definido y se armó la celda de Franz tipo vertical, colocando la membrana activada en medio de los compartimentos, luego, se introdujo un magneto de longitud de 1 cm en el compartimento aceptor.

Posteriormente, se conectó la celda de Franz de tipo vertical al sistema de mangueras de reflujo desde el baño maría y se encendió la bomba de reflujo, para

que el agua recirculara por la chaqueta de calentamiento de la celda. Finalmente, se adicionó en el compartimiento aceptor 125 mL de agua destilada y en el compartimiento donador se dispuso de 5 mL de la solución de azul de metileno a 200 μM , en el momento en el que se comenzó a cronometrarse el experimento. Ver anexo 11.5.

6.1.3.2 Preparación de montaje de la celda horizontal:

Se activó la membrana a utilizar (si es de celulosa), para ello se dejó sumergida en agua destilada. Se llenó con agua destilada el baño maría termostático hasta el tope definido y se armó la celda de Franz tipo horizontal, colocando la membrana activada en medio de los compartimientos, luego, se introdujo un magneto de longitud de 1 cm en el compartimiento aceptor y uno idéntico en el compartimiento donador.

Posteriormente, se conectó a la celda de Franz de tipo horizontal al sistema de mangueras de reflujo desde el baño maría y se encendió la bomba de reflujo, para que el agua recirculara por la chaqueta de calentamiento de la celda. Finalmente, se adicionó en el compartimiento aceptor 126 mL de agua destilada y en el compartimiento donador se dispuso de 126 mL de la solución de azul de metileno a 200 μM , en el momento en el que comenzó a cronometrarse el experimento.

6.1.4 Obtención del perfil de permeabilidad:

6.1.4.1 Evaluación del efecto de la temperatura sobre los perfiles de permeabilidad.

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre los perfiles de permeabilidad, el experimento se realizó por triplicado para las temperaturas de 25°C y 37°C, manteniendo constante la velocidad de agitación a 360 rpm y la membrana de celulosa a 5 kDa. Se adicionó la cantidad requerida de la solución de azul de metileno a 200 μM en cada tipo de celda en el compartimiento donador, e inmediatamente se inició el cronometraje del experimento, durante el experimento se tomaron alícuotas de 3 mL del compartimiento aceptor para medir absorbancias a 664 nm cada 5 minutos durante los primeros 15 minutos. A partir de los primeros 15 minutos de tomar las muestras, se comenzó a tomar datos cada 15 minutos hasta completar una hora y media, luego, se comenzó a medir cada media hora hasta las primeras 4 horas y, a partir de ahí, se midió a las primeras 4 horas se midió cada hora hasta completar las 8 horas del experimento. Todas las alícuotas se reintegraron al sistema lo más pronto posible después de que se realizó la medición.

A partir de los datos de absorbancia en función del tiempo que se obtuvieron, se utilizó la ecuación de Beer-Lambert resultante de la curva de calibración para obtener datos de concentración de azul de metileno en los compartimientos

aceptores. El gráfico obtenido de la concentración de azul de metileno en el compartimento aceptor en función del tiempo es el perfil de permeabilidad.

6.1.4.2 Evaluación del efecto de la velocidad de agitación sobre los perfiles de permeabilidad.

Para evaluar el efecto de la velocidad de agitación sobre los perfiles de permeabilidad, el experimento se realizó por triplicado para tres velocidades de agitación correspondientes de 240 rpm, 360 rpm y 480 rpm, manteniendo constante la temperatura a 37°C y la membrana de celulosa a 5 kDa. Se adiciona la cantidad requerida de la solución de azul de metileno a 200 µM en cada tipo de celda en el compartimento donador, e inmediatamente se inició el cronometraje del experimento, durante el experimento se tomaron alícuotas de 3 mL del compartimento aceptor para medir absorbancias a 664 nm cada 5 minutos durante los primeros 15 minutos. A partir de los primeros 15 minutos de tomar las muestras, se comenzó a tomar datos cada 15 minutos, hasta completar una hora y media, luego se comenzó a medir cada media hora hasta las primeras 4 horas y a partir de las primeras 4 horas se midió cada hora hasta completar las 8 horas del experimento. Todas las alícuotas se reintegraron al sistema lo más pronto posible después de que se realizó la medición.

A partir de los datos de absorbancia en función del tiempo que se obtuvieron, se usó la ecuación de Beer-Lambert obtenida de la curva de calibración, para obtener datos de concentración de azul de metileno en los compartimentos aceptores. El gráfico obtenido de la concentración de azul de metileno en el compartimento aceptor en función del tiempo es el perfil de permeabilidad.

6.1.4.3 Evaluación del efecto del tipo de membrana sobre los perfiles de permeabilidad

Para evaluar el efecto del tipo de membrana sobre los perfiles de permeabilidad, el experimento se realizó por triplicado para dos tipos de membrana de celulosa a 5 kDa y membrana Strat-M®, manteniendo constante la temperatura a 37°C y la velocidad de agitación a 360 rpm. Se adicionó la cantidad requerida de la solución de azul de metileno a 200 µM en cada tipo de celda en el compartimento donador e inmediatamente se inició el cronometraje del experimento, durante el experimento se tomaron alícuotas de 3 mL del compartimento aceptor para medir absorbancias a 664 nm cada 5 minutos durante los primeros 15 minutos. A partir de los primeros 15 minutos de tomar las muestras, se comenzó a tomar datos cada 15 minutos, hasta completar una hora y media, luego se comenzó a medir cada media hora hasta las primeras 4 horas y a partir de las primeras 4 horas se midió cada hora hasta completar las 8 horas del experimento. Todas las alícuotas se reintegraron al sistema lo más pronto posible después de que se realizó la medición.

A partir de los datos de absorbancia en función del tiempo que se obtuvieron, se usó la ecuación de Beer-Lambert obtenida de la curva de calibración, para obtener datos de concentración de azul de metileno en los compartimentos aceptores. El gráfico obtenido de la concentración de azul de metileno en el compartimento aceptor en función del tiempo es el perfil de permeabilidad.

6.1.4.4 Comparación del desempeño y la operatividad de las celdas de tipo vertical y horizontal

Con los perfiles de permeabilidad realizados por triplicado, se determinó el área bajo la curva de cada perfil de permeabilidad a las diferentes condiciones de operación anteriormente descritas, además del coeficiente de permeabilidad y el tiempo de latencia. Por medio del coeficiente de variación de las AUC para cada condición de operación, se comparó las celdas de tipo vertical y horizontal en términos de reproducibilidad.

6.1.5 Análisis estadístico de los datos:

El análisis estadístico de los resultados obtenidos de los perfiles de permeabilidad se realiza por medio de la estadística no paramétrica, ya que se tiene un $n=3$ para cada condición de operación. Esta rama de la estadística es la encargada de estudiar pruebas y modelos cuya distribución subyacente no se ajusta a los criterios paramétricos, y estas engloban pruebas no paramétricas que tienen como factor común la asunción acerca de la ley de probabilidad que sigue la población de la que ha sido extraída la muestra. Por esta razón, son conocidas comúnmente como pruebas de distribución libre (Vanesa Berlanga Silvente, María José Rubio Hurtado, 2012).

Las pruebas no paramétricas se pueden realizar para muestras que están relacionadas o que sean independientes. Para el caso de este estudio, las muestras tomadas son consideradas como independientes debido a que son mediciones realizadas en condiciones de operación diferentes. Al estudiar el efecto de la temperatura y del tipo de membrana se utilizó el test de Mann-Whitney, debido a que, en estas variables, solo se evalúan dos grupos (25°C y 37°C para la temperatura, y membrana de celulosa y Strat-M para el tipo de membrana). Por otra parte, la velocidad de agitación fue sometida a un tratamiento estadístico de los datos mediante el test de Kruskal-Wallis, ya que en esta variable operacional se consideran tres grupos (240rpm, 360rpm y 480rpm).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Se obtuvo principalmente los perfiles de permeabilidad del azul de metileno, a partir de los experimentos que se realizaron bajo condiciones especificadas en el estudio. Se correlacionaron diferentes variables operacionales como lo son la temperatura, la velocidad de agitación y el tipo de membrana, con el fin de realizar una comparación entre los aspectos fisicoquímicos que afectan directamente los fenómenos de difusión y permeabilidad de moléculas, especialmente de fármacos de uso transdérmico, empleando la metodología de celdas de Franz de tipo vertical y horizontal.

Se tienen los respectivos perfiles de permeabilidad del AM para las diferentes condiciones operacionales, de los cuales se determinaron 3 parámetros principales: el área bajo la curva, el periodo de latencia y el coeficiente de permeabilidad. El área bajo la curva se obtiene de la gráfica del porcentaje permeado del compartimento donador al aceptor vs el tiempo, empleando la ecuación (3); el área bajo la curva es un parámetro ampliamente utilizado para cuantificar el cambio de la concentración en el tiempo para cualquier sustrato de un reservorio a otro.

$$AUC = \int_0^{\infty} f(x)dx = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \sum_{i=1}^N f(x) \Delta x$$

Ecuación 3. Calculo del área bajo la curva.

El coeficiente de permeabilidad (K_p) y el periodo de latencia (T_L), se obtienen a partir de la gráfica de cantidad de activo vs tiempo (h). La cantidad de activo se obtiene al realizar una serie de tratamientos matemáticos, partiendo de las concentraciones [$\mu\text{g/ml}$] a diferentes tiempos, al multiplicar la concentración por el volumen de muestra (1mL) se obtiene la masa de la muestra, posteriormente se obtiene la masa en el compartimento aceptor sin corregir, multiplicando la concentración de la muestra por el volumen del compartimento aceptor. A continuación, se obtiene la masa de la muestra acumulada con la cual se puede calcular la masa del compartimento aceptor corregido, al sumarse con la masa del receptor sin corregir. Dividiendo la cantidad anterior entre el área de difusión se calcula la cantidad de activo, que se grafica vs el tiempo (h).

El gráfico anterior se puede obtener K_p y T , cuando se llega al estado estacionario; la pendiente de la función en dicho estado se denomina flujo (J) y el intercepto con el eje x es T_L . Dividiendo J entre la concentración del sustrato en el compartimento dador, se obtiene K_p . Los datos obtenidos de las áreas bajo la curva, el periodo de latencia y el coeficiente de permeabilidad para cada una de las réplicas de las diferentes variables operacionales, se muestran de manera resumida en la tabla 1 y 2. A partir de estas se realizan los procedimientos

estadísticos descriptos para cada una de las variables operacionales que se estudiaron.

Tabla 1. Promedio de datos obtenidos de la celda de Franz de tipo vertical

Vertical							
Variables Operacionales	Temperatura		Velocidad de agitación			Tipo de membrana	
Parámetro	25°C	37°C	240rpm	360rpm	480rpm	membrana de celulosa	membrana Strat-M®
AUC	386	371	374	361	569	371	0
Kp	1896,99	1699,15	1779,06	1736,64	2836,16	1697,54	0
TL	1,14	0,60	0,86	0,50	0,58	0,60	0

Tabla 2. Promedio de datos obtenidos de la celda de Franz de tipo horizontal.

Horizontal							
Variables Operacionales	Temperatura		Velocidad de agitación			Tipo de membrana	
Parámetro	25°C	37°C	240rpm	360rpm	480rpm	membrana de celulosa	membrana Strat-M®
AUC	22	30	22	30	28	30	0
Kp	590,43	769,86	579,77	744,90	740,72	763,15	0
TL	1,73	1,52	1,60	1,68	1,62	1,65	0

7.1.1 Efecto de la temperatura:

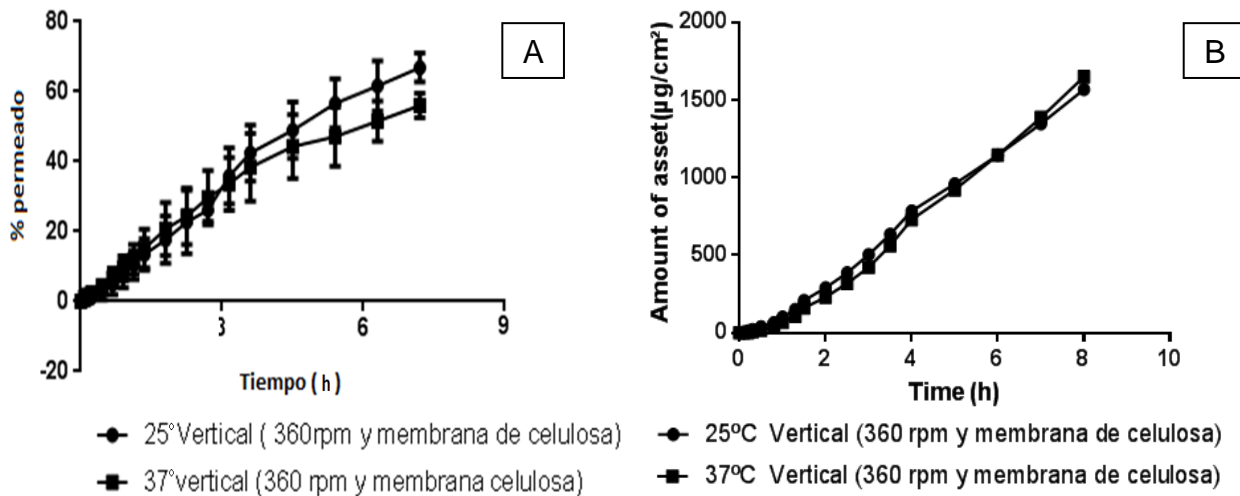


Figura 7. A). Gráfico del porcentaje de AM permeado a las diferentes temperaturas en la celda de Franz de tipo vertical. **B).** Cantidad de activo en el compartimento aceptor en relación al tiempo en (h) a las diferentes temperaturas de estudio en la celda de Franz de tipo vertical.

La figura 7a muestra el gráfico del porcentaje de AM permeado en la celda de Franz de tipo vertical a temperaturas de 25°C y 37°C, manteniendo constantes la membrana de celulosa y 360 rpm como velocidad de agitación. Cada condición operacional se realizó por triplicado, por lo cual se tienen gráficos con línea de tendencia y bigotes, con el fin de comparar la variabilidad y la reproducibilidad de los experimentos.

La temperatura es una variable crítica para la metodología de celdas de Franz en estudios de permeabilidad y liberación, pues, al incrementarla, aumentara el grado del movimiento térmico aleatorio de las moléculas afectando considerablemente fenómenos como la solubilidad y la difusión. En la figura 7, se puede observar que a 25°C se obtuvo un mayor porcentaje de permeación de azul de metileno que a 37°C a lo largo de los 480min del estudio. Este resultado no acorde a la teoría si se retoma el concepto anteriormente descrito; no obstante, se puede observar en el gráfico que los bigotes que representan la variabilidad del estudio, se traslapan en la mayoría de los puntos, podría decirse que la celda vertical a 25°C y a 37°C no presenta metodológicamente alguna diferencia significativa.

Con el fin de confirmar el supuesto anterior, se realizó la determinación del área bajo la curva para cada una de las réplicas realizadas, los valores explícitos se encuentran en la tabla 1 y a partir de los cuales se obtuvieron los porcentajes de coeficientes de variación en los que se logra evidenciar que la reproducibilidad de las réplicas realizadas no es buena, por lo que se desarrolló un estudio de comparación de datos por un test de estadística no paramétrica Mann-Whitney

con un grado de significancia del 95%, el cual se muestra en la tabla 12 de los anexos, en este test se obtuvo un valor p de 0.7, que al ser mayor a 0.05 permite concluir que no hay diferencia significativa entre las temperaturas establecidas en el desarrollo de la metodología.

Teniendo en cuenta lo anterior, se puede decir que es óptimo realizar los estudios de permeabilidad con la metodología de celdas de Franz de tipo vertical, en el intervalo comprendido entre 25°C y 37°C. Esto es muy importante si se toma en consideración que en los estudios de preformulación de fármacos, se busca obtener resultados comparables y precisos, además de que se realicen de forma rápida, fácil y de bajo costo. Dicho lo anterior se puede decir que no es necesario realizar las pruebas a 37°C que demandan mayor gasto energético, respecto a las pruebas a temperatura de 25°C con las que se obtienen resultados similares.

De la figura 7b se obtiene K_P y T_L para las temperaturas de 25°C y 37°C en la celda de Franz de tipo vertical, cuando se ha llegado al estado estacionario. Dicha grafica muestra la cantidad del sustrato permeado en la celda de Franz de tipo vertical a las temperaturas del estudio, manteniendo constantes la membrana de celulosa y 360rpm como velocidad de agitación. La Tabla 1 muestra el promedio de K_P y T_L a 25°C es 1896,99 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ y 1.14 h y para a la temperatura 37°C el promedio de K_P y T_L es 1699,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ y 0,6 h respectivamente para la celda de Franz de tipo vertical.

Con los anteriores resultados se desarrollaron 2 estudios de comparación de datos, mediante el test de estadística no paramétrica Mann-Whitney para los parámetros K_P y T_L . Los resultados de los estudios se muestran en las tablas 11 y 12 de los anexos, los cuales arrojaron que con un grado de significancia del 95% no hay diferencia significativa entre las temperaturas 25°C y 37°C para los anteriores parámetros.

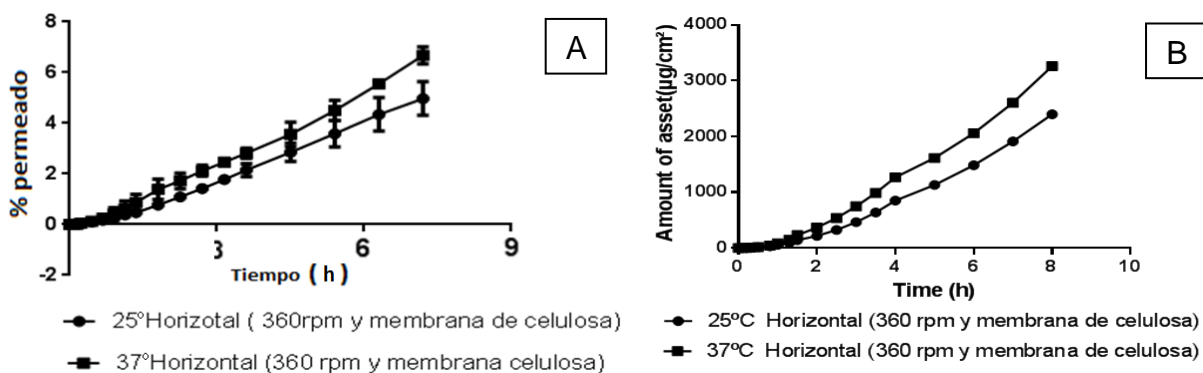


Figura 8. A). Gráfico del porcentaje de AM permeado a las diferentes temperaturas en la celda de Franz de tipo horizontal. **B).** Cantidad de activo en el compartimento aceptor en relación al tiempo en (h), a las diferentes temperaturas de estudio en la celda de Franz de tipo horizontal.

La figura 8a muestra el grafico del porcentaje de AM permeado en la celda de Franz de tipo horizontal a temperaturas de 25°C y 37°C, manteniendo constantes la membrana de celulosa y 360 rpm como velocidad de agitación. Cada condición operacional se realizó por triplicado, por lo cual se tienen gráficos con línea de tendencia y bigotes, con el fin de comparar la variabilidad y la reproducibilidad de los experimentos.

En la figura 8a se puede observar que a 37°C se obtuvo un mayor porcentaje de permeación de azul de metileno que a 25°C a lo largo de las 8 horas de estudio. esto es algo que va acorde a la teoría si retomamos el concepto anteriormente descrito, de que el incremento de la temperatura favorece los fenómenos la solubilidad y la difusión.

Con el grafico de la figura 8a se realizó la determinación del área bajo la curva para cada una de las réplicas realizadas, valores explícitos en la tabla 2 con estos resultados se realizó un estudio de comparación de datos por un test de estadística no paramétrica Mann-Whitney con un grado de significancia del 95%, este se muestra en la tabla 17 de los anexos, en la cual se obtuvo un valor p de 0,1 el cual es menor a 0.05, lo que permite concluir que no hay diferencia significativa entre las temperaturas establecidas en el desarrollo de la metodología.

Dicho lo anterior se puede decir que es óptimo realizar los estudios de permeabilidad en la metodología de celdas de Franz de tipo horizontal en el intervalo comprendido entre 25°C y 37°C. Esto es muy importante si tenemos en cuenta que en los estudios de preformulación de fármacos, se busca obtener resultados comparables y precisos, además de que se realicen de forma rápida, fácil y de bajo costo. Se puede decir que no es necesario realizar las pruebas a 37°C que demandan mayor gasto energético, respecto a las pruebas a temperatura de 25°C con las que se obtienen resultados similares.

Con la figura 8b se obtiene K_P y T_L para las temperaturas de 25°C y 37°C en la celda de Franz de tipo horizontal cuando se ha llegado al estado estacionario. Dicha grafica muestra la cantidad sustrato permeado en la celda de Franz de tipo vertical a las temperaturas del estudio, manteniendo constantes la membrana de celulosa y 360rpm como velocidad de agitación. La tabla 2 muestra el promedio de K_P y T_L a 25°C es 590,44 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ y 1,7 h y para a la temperatura 37°C el promedio de K_P y T_L es 769,86 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ y 1,52 h respectivamente.

Con los anteriores resultados se desarrollaron 2 estudios de comparación de datos, mediante el test de estadística no paramétrica Mann-Whitney para los parámetros K_P y T_L . Los resultados de los estudios se muestran en las tablas 18 y 19 de los anexos, los cuales arrojaron que con un grado de significancia del 95% no hay diferencia significativa entre las temperaturas 25°C y 37°C para los anteriores parámetros.

7.1.2 Efecto de la velocidad de agitación:

Después de haber realizado el estudio del efecto de la temperatura sobre los perfiles de permeabilidad, se desarrolló el mismo procedimiento para la variable operacional de velocidad de agitación. En la cual se obtuvieron graficas de dispersión, en las que se estudiaron las velocidades de agitación de 240rpm, 360rpm y 480rpm, manteniendo constantes la membrana de celulosa y la temperatura de 37°C. Cada estudio para cada variable operacional se realizó por triplicado, por lo cual se tienen gráficos con línea de tendencia y bigotes, con el fin de comparar la variabilidad y la reproducibilidad de los experimentos.

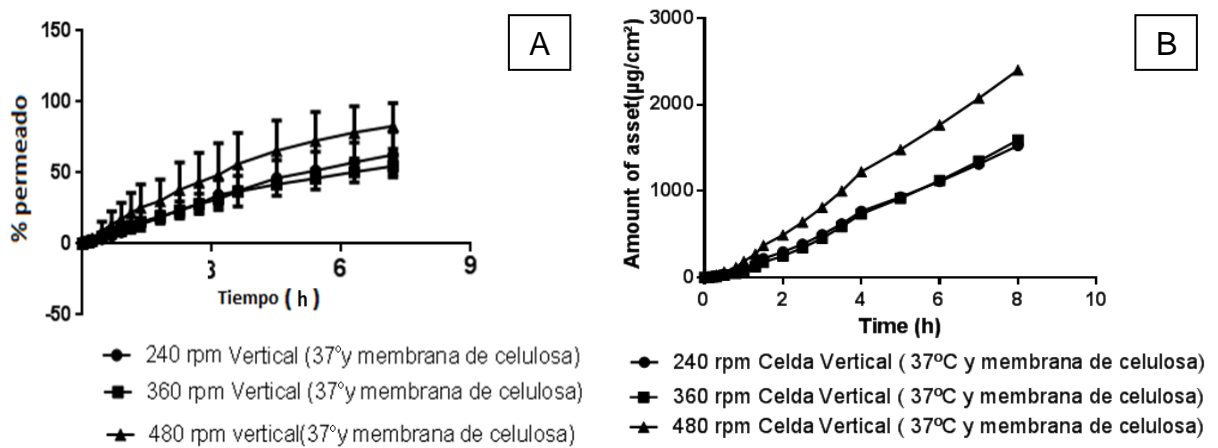


Figura 9. A). Gráfico del porcentaje de AM permeado a las diferentes velocidades de agitación en la celda de Franz de tipo vertical. **B).** Cantidad de activo en el compartimento aceptor en relación al tiempo en (h), a las diferentes velocidades de agitación en la celda de Franz de tipo vertical.

La velocidad de agitación es un factor indispensable en este tipo de estudios, debido a que este garantiza que el AM se distribuya homogéneamente por los compartimentos. La difusión del sustrato esta mediada por un gradiente y un potencial químico, la velocidad con la que se agite el medio y se distribuya la molécula en el área periférica de la membrana puede afectar drásticamente el fenómeno de permeación. Particularmente en la celda vertical solo se tiene agitación en el fondo de la celda, lo que hace que en la parte superior de la celda se forme un vórtice que en ocasiones puede provocar el encapsulamiento de burbujas de aire entre la membrana y el medio del compartimento donador.

La formación de las mencionadas burbujas es un problema para el desarrollo de la técnica, ya que el área que ocupa la burbuja en la membrana será un espacio por el cual no habrá paso de sustrato y los resultados del estudio se ven directamente afectados. La formación de burbujas en la membrana cuando se trabaja con la celda vertical de Franz, es favorecida por la falta de agitación de compartimento

donor, el calentamiento constante en el desarrollo de la técnica y por el diferencial de presión al momento de la toma de la muestra.

Ahora bien, según los datos obtenidos en la figura 9a, es evidente que hay una diferencia significativa en el porcentaje de azul de metileno permeado. Cuando se realiza a una velocidad de agitación de 480rpm, se obtiene un mayor porcentaje respecto a las otras dos velocidades (240rpm y 360rpm). Es claro que a medida que el AM permea la membrana, la presencia de una gran velocidad de agitación hace que la molécula se distribuya homogéneamente por el compartimento receptor; por lo tanto, el diferencial de potencial vuelve a caer drásticamente provocando que el AM pase de forma continua y veloz por medio de la membrana.

Con el fin de determinar si hay diferencia significativa al desarrollar la técnica con alguna de las 3 distintas velocidades propuestas, se calculó el área bajo la curva para cada una de las réplicas realizadas, valores que se reportan en la tabla 1 y a partir de los cuales se desarrolló un estudio de comparación de datos por el test de estadística no paramétrica Kruskal-Wallis, procedimiento estadístico mostrado en la tabla 22 de los anexos. El estudio estadístico arrojó que, con un grado de significancia del 95%, hay diferencia significativa de las medias al obtener un valor p de 0.036, por ello, es posible concluir que la velocidad de agitación es una variable operacional crítica en el desarrollo de la metodología de celdas de Franz de tipo vertical.

Para determinar cuál es la velocidad de agitación en la que hay diferencia significativa entre los 3 grupos, se realizó una comparación conocida como test múltiple de Dunn's, que permite determinar cuáles son las condiciones específicas que presentan diferencia significativa entre ellas, los datos de este análisis estadístico se muestran en la tabla 23. El test múltiple de Dunn's arrojó que, con una significancia del 95%, hay diferencia significativa al desarrollar la técnica a una velocidad de agitación de 240 rpm y 480 rpm.

Con el resultado anterior se confirma que la velocidad de agitación es una variable operacional crítica para esta técnica y que el desarrollo de esta debe hacerse a una velocidad de agitación de 360 rpm, ya que, a dicha velocidad, no hay diferencia estadística con las otras velocidades por lo que trabajar con esta velocidad es óptimo.

De la figura 9b se obtiene K_p y T_L para el sustrato de AM con la celda de Franz de tipo vertical, cuando se ha llegado al estado estacionario. Dicha grafica muestra la cantidad de sustrato permeado en la celda de Franz de tipo vertical con las velocidades de agitación de estudio, manteniendo constantes la membrana de celulosa y 25°C. La tabla 1 muestra el promedio de K_p y T_L a 240 rpm son 1779,07 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ y 0,86 h, para 360 rpm son 1736,64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ y 0,5 h y para 480 rpm 2836,16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ y 0,58 h respectivamente.

Con los anteriores resultados se desarrollaron 2 estudios de comparación de datos mediante el test de estadística no paramétrica Kruskal-Wallis, para los parámetros K_P y T_L . Los resultados de los estudios se muestran en las tablas 23 y 24 de los anexos, los cuales arrojaron que, con un grado de significancia del 95%, no hay diferencia significativa entre las velocidades de agitación de 240, 360 y 480 rpm para los parámetros mencionados.

Al no presentar una diferencia significativa entre las medias de los parámetros K_P y T_L , a las diferentes velocidades de agitación en el desarrollo de la técnica de celdas de Franz de tipo vertical, se podría decir que la velocidad de agitación no es una variable operacional crítica para esta metodología, supuesto que contradice el resultado obtenido para el parámetro AUC para las mismas condiciones operacionales.

El hecho de que el tratamiento estadístico no arroja diferencia significativa de las medias para los parámetros K_P y T_L , se debe a que el coeficiente de permeabilidad y el periodo de latencia van a ser dependientes de la matriz en que se encuentre contenido el sustrato y nos dará una buena idea sobre su cinética de liberación. En este caso, el sustrato utilizado AM es suministrado al compartimento donador de forma libre, por lo que los parámetros K_P y T_L no serán afectados significativamente al implementar la metodología a diferentes velocidades de agitación.

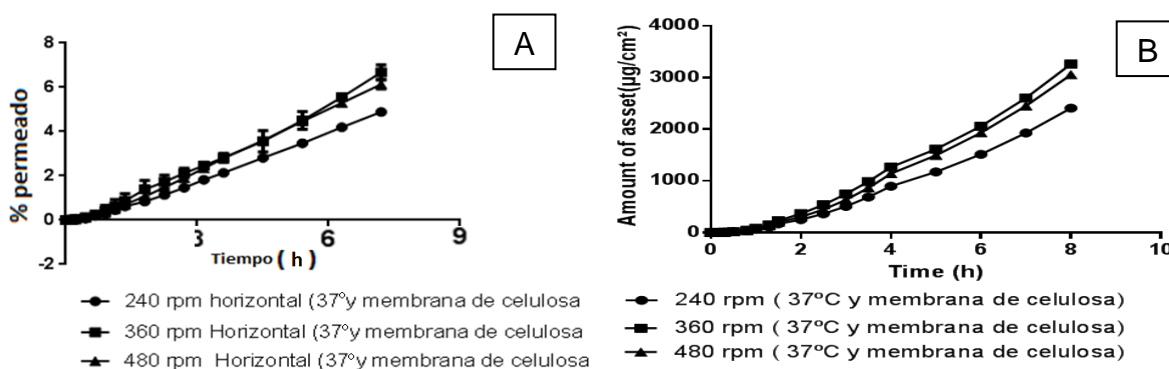


Figura 10. A). Gráfico del efecto del porcentaje de AM permeado a las diferentes velocidades de agitación en la celda de Franz de tipo horizontal. **B).** Cantidad de activo en el compartimento aceptor en relación al tiempo en (h), a las diferentes velocidades de agitación en la celda de Franz de tipo horizontal.

En la celda horizontal se tiene agitación en el compartimento aceptor y en el compartimento donador, lo que hace que la distribución de las moléculas en el medio sea homogénea y se evite el encapsulamiento de burbujas de aire en la vertical.

Ahora bien, según los datos obtenidos en la figura 10a, es evidente la diferencia significativa en el porcentaje de AM permeado cuando se realiza a 480rpm y a 360rpm, con respecto a lo permeado a 240rpm.

Con el fin de determinar si hay diferencia significativa en la realización de la técnica a las 3 diferentes velocidades de agitación, se realizó la obtención del área bajo la curva para cada una de las réplicas realizadas. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Se desarrolló un estudio de comparación de datos por el test de estadística no paramétrico Kruskal-Wallis, el cual se presenta en la tabla 27 de los anexos, en la cual se obtuvo un valor p de 0.025, el cual es menor 0.05, por ello es posible concluir que sí hay diferencia significativa entre las medias de AUC para las velocidades de agitación establecidas en el desarrollo de la metodología, por ello, se hizo necesario realizar una comparación entre grupos conocida como test de comparación múltiple de Dunn's, por medio de la cual se logró observar que la diferencia se presenta principalmente entre las velocidades de agitación de 240rpm y 380rpm, con una significancia del 95%. estadística mostrada en la tabla 28 de los anexos y por medio de la cual, es posible decir que la velocidad de agitación óptima para realizar el experimento es a 360rpm, ya que al trabajar con esta velocidad no hay diferencia significativa de las medias.

De la figura 10b se obtiene K_P y T_L para el sustrato de AM la celda de Franz de tipo horizontal, cuando se ha llegado al estado estacionario. Dicha grafica muestra la cantidad sustrato permeado en la celda de Franz de tipo vertical a las velocidades de agitación de estudio, manteniendo constantes la membrana de celulosa y 25°C. La tabla 2 muestra el promedio de K_P y T_L a 240 rpm son 579,78 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ y 1,6 h, para 360 rpm son 744,91 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ y 1,68 h y para 480 rpm 740,72 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ y 1,63 h respectivamente.

Con los anteriores resultados se desarrollaron 2 estudios de comparación de datos, mediante el test de estadística no paramétrica Kruskal-Wallis para los parámetros K_P y T_L . Los resultados de los estudios se muestran en las tablas 29 y 30 de los anexos, los cuales arrojaron que con un grado de significancia del 95% no hay diferencia significativa entre las velocidades de agitación de 240, 360 y 480 rpm para los anteriores de K_P y T_L .

Al no presentar una diferencia significativa entre las medias de los parámetros K_P y T_L a las diferentes velocidades de agitación en el desarrollo de la técnica de celdas de Franz de tipo horizontal, se podría decir que la velocidad de agitación no es una variable operacional crítica para esta metodología, tal y como pasa con la celda de Franz de tipo vertical.

Que el tratamiento estadístico no arroja diferencia significativa de las medias para los parámetros K_P y T_L , es debido a que el coeficiente de permeabilidad y el

periodo de latencia van a ser dependientes de la matriz en que se encuentre contenido el sustrato y nos dará una buena idea su cinética de liberación, en este caso el sustrato utilizado AM es suministrado al compartimento donador de forma libre, por lo que a los parámetros K_P y T_L no serán afectados significativamente al implementar la metodología a diferentes velocidades de agitación.

7.1.3 Efecto del tipo de membrana:

Para esta parte se obtuvieron gráficas de dispersión del efecto del tipo de membrana (celulosa y Strat-M®), manteniendo constantes la velocidad de agitación en 360rpm y 37° C de temperatura. Cada variable operacional se realizó por triplicado, por lo cual se tienen gráficos con línea de tendencia y bigotes, con el fin de comparar la variabilidad y la reproducibilidad de los experimentos.

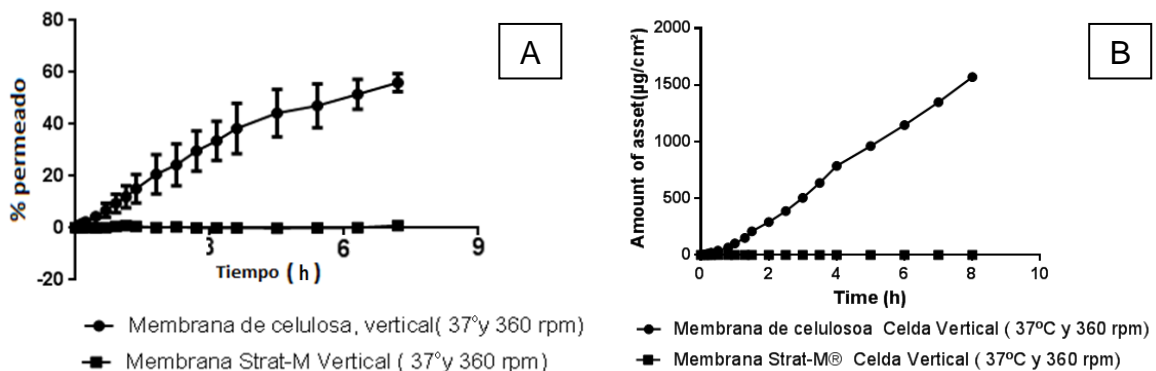


Figura 11. A). Gráfico del efecto del porcentaje de AM permeado con las diferentes membranas en la celda de Franz de tipo vertical. **B).** Cantidad de activo en el compartimento aceptor en relación al tiempo en (h), con la membrana de celulosa y la Strat-M® en la celda de Franz de tipo vertical.

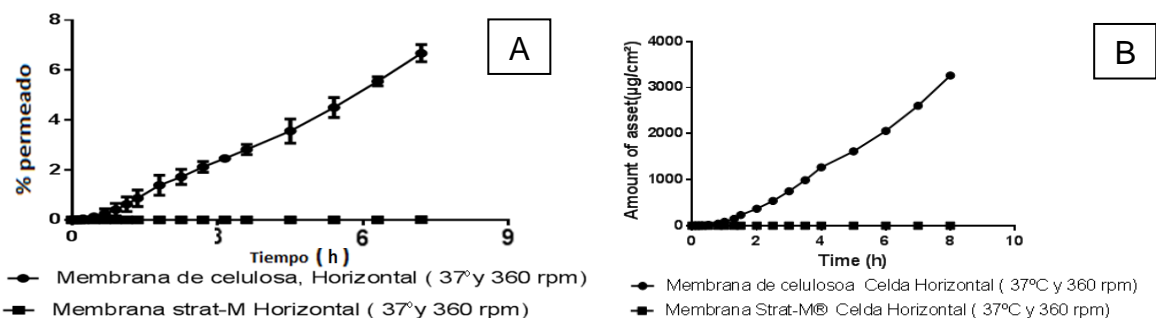


Figura 12. A). Gráfico del efecto del porcentaje de AM permeado con las diferentes membranas en la celda de Franz de tipo horizontal. **B).** Cantidad de

activo en el compartimento aceptor en relación al tiempo en (h), con la membrana de celulosa y la Strat-M® en la celda de Franz de tipo horizontal.

El tipo membrana es uno de los principales factores determinantes de la absorción de fármacos en la piel; la capacidad que tiene el sustrato para atravesar la membrana dependerá de la naturaleza de la membrana y del mismo sustrato. Normalmente, las membranas poseen diferentes tamaños de poros por los cuales atraviesan las moléculas y también diferentes vías por los cuales permean moléculas de diferente tamaño y polaridad. De acuerdo con esto, la selección de las membranas empleadas en este estudio reflejan la similitud entre los tejidos humanos y las membranas más empleadas para estudios de preformulación, evaluando aspectos como costo, facilidad de manejo, disponibilidad, reproducibilidad y semejanza con el área de la piel de interés.

Ahora bien, según los datos obtenidos en la figuras 11 y 12, es evidente que hay una diferencia en el porcentaje AM permeado cuando se desarrolla la técnica con la membrana de celulosa, con relación a la membrana Strat-M®. Con el fin de confirmar si hay diferencia significativa al desarrollar la técnica con alguna de las membranas, se calculó el área bajo la curva para cada una de las réplicas realizadas en la celdas de Franz de tipo vertical y horizontal. Posteriormente, se compararon las medias de las réplicas por medio de un test de estadística no paramétrica Mann-Whitney.

Los resultados del tratamiento estadístico se muestra en los anexos 33 y 38, con los cuales se dice que con una significancia de 95% hay diferencia significativa entre las medias de AUC para desarrollo de la metodología de celdas de Franz de tipo vertical y horizontal, cuando se utiliza la membrana de celulosa y la membrana Strat-M®. Dicho lo anterior se puede concluir que el tipo de membrana es una variable operacional crítica en el desarrollo de la metodología de celdas de Franz de tipo vertical y horizontal.

Además, con las figuras 11 y 12 se halla K_p y T_L cuando se emplea la membrana de celulosa y la membrana Strat-M® en las celdas de Franz de tipo vertical y horizontal, cuando se ha llegado al estado estacionario. Dichas graficas muestran la cantidad de sustrato permeado en las celdas de Franz de tipo vertical y horizontal con las 2 membranas de estudio, manteniendo constantes la temperatura a 37°C y 360rpm como velocidad de agitación. La Tabla 1 y 2 muestra el promedio de K_p y T_L cuando se emplea la membrana de celulosa en la celda vertical es 1697,55 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ y 0,6 h respectivamente y cuando se emplea la membrana de celulosa en la celda horizontal es 763,16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ y 1,66 h respectivamente. Los parámetros de K_p y T_L tanto para la celda vertical como horizontal son imposibles de calcular cuando se utilizó la membrana Strat-M®, ya que con esta el sustrato nunca logró permear al compartimento aceptor.

Ahora bien, los resultados en las figuras 11 y 12, muestran que la membrana de celulosa empleada en el estudio como una de las variables fijas, tiene un buen porcentaje de permeación de azul de metileno para las celdas de tipo vertical y horizontal, pero la membrana Strat-M®, la cual emula las condiciones de la piel humana, no evidencio permeación del sustrato a lo largo del experimento. Este fenómeno se debe a que la membrana Strat-M® es de una naturaleza altamente hidrófoba, compuesta en un alto porcentaje por fosfolípidos, esta al ser esta naturaleza y el medio utilizado al ser acuoso, se produce repulsión en la zona de interface lo que ocasiono que no se diera la difusión, y por ende el gradiente de concentración de un lado a otro fuese 0, esta repulsión en la zona de interface se conoce como capa de difusión estática.

7.1.4 Comparación entre la celda de tipo vertical y la de tipo horizontal

Para realizar la comparación de las celdas de Franz de tipo vertical y horizontal en términos de reproducibilidad, se calculó el coeficiente de variación de los 3 parámetros expuestos en la Tablas 1 y 2. El coeficiente de variación se calcula para verificar la reproducibilidad de cada tipo de celda, teniendo en cuenta cada una de las variables operacionales definidas en el estudio. Con ello se realizó una comparación directa entre los tipos de celdas, con el fin de determinar cuál de los dos modelos posee una mayor reproducibilidad y a que determinadas variables operacionales se optimizan los resultados. Finalmente, con esto se elaboró un veredicto sobre las condiciones más óptimas para la realización de ensayos de permeabilidad en estudios de preformulación, con el objetivo de armonizar el uso de esta metodología y garantizar resultados comparables y reproducibles.

La reproducibilidad de los datos es un factor determinante en el desarrollo de estudios de preformulación, debido a que la variabilidad en los resultados puede llevar a una mala elección de un prototipo para la formulación de fármacos de aplicación transdérmica.

Tabla 3. Desviación estándar y porcentaje del coeficiente de variación para la celda horizontal.

Parámetro	Variables Operacionales													
	Temperatura				Velocidad de Agitación						Tipo de membrana			
	25°C		37°C		240rpm		360rpm		480rpm		Membrana de celulosa		Strat-M®	
	SD	%C V	SD	%C V	SD	%C V	SD	%C V	SD	%C V	SD	%CV	S D	%C V
AUC	2,2	10,14	1,4	4,69	0,5	2,49	1,4	4,69	0,6	2,06	1,4	4,69	0	0
Kp	78,29	13,26	41,32	5,40	9,98	1,72	18,52	2,48	15,57	2,10	43,91	5,75	0	0
TL	0,21	12,44	0,89	20,65	0,06	3,90	0,01	1,03	0,07	4,73	0,08	4,90	0	0

Tabla 4. Desviación estándar y porcentaje del coeficiente de variación para la celda vertical.

Parámetro	Variables Operacionales													
	Temperatura				Velocidad de Agitación						Tipo de membrana			
	25°C		37°C		240rpm		360rpm		480rpm		Membrana de celulosa		Strat-M®	
	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
AUC	77	19,94	84	22,65	91	24,35	40,2	11,13	228,1	40,08	84	22,65	0	0
Kp	237,55	12,52	345,96	20,36	480,83	26,46	299,88	17,26	925,97	35,80	343,35	20,23	0	0
TL	0,46	40,56	0,30	49,88	0,14	16,76	0,28	55,87	0,38	66,66	0,30	50,84	0	0

En las Tablas 3 y 4 se registraron porcentajes de los coeficientes de variación para cada una de los tipos de celdas, a las respectivas variables operacionales. A partir de estos datos, es posible establecer que los %CV obtenidos para la celda de tipo horizontal son mucho más pequeños que los obtenidos en la celda vertical en cada uno de los 3 parámetros evaluados.

La alta variabilidad de los resultados en la celda de Franz de tipo vertical puede atribuirse a diferentes aspectos como: Que la celda vertical solo posee la chaqueta térmica dispuesta para el compartimento aceptor, en cambio la celda horizontal posee en los dos compartimentos el revestimiento para acondicionar la temperatura. Esto es de vital importancia si tenemos en cuenta que a la temperatura que presentaron menos variabilidad de los datos en la celda vertical fue a 25°C lo que quiere decir que no se presentó un diferencial de temperatura entre los dos compartimentos de las celdas, el cual, si tuvo lugar en el estudio realizado a 37°C. Por otra parte, la variabilidad obtenida en los estudios realizados en la celda horizontal mostró un gran desempeño debido a la presencia de la chaqueta térmica en los dos compartimentos.

Otro aspecto que puede incrementar la variabilidad de los datos en la celda vertical es la falta de agitación en el compartimento donador, agitación que si es posible conseguir en las celdas de Franz de tipo horizontal. La falta de agitación en el compartimento donador hace que no se distribuya homogéneamente el sustrato en este reservorio y afecte directamente los diferentes parámetros determinados.

Es importante resaltar en cuanto las diferencias metodológicas que presentan las celdas de tipo vertical y las de tipo horizontal, que en las primeras hay un

marcado efecto influyente por la fuerza de gravedad, ya que la presión que esta ejerce hace que las moléculas del azul de metileno tiendan a dirigirse hacia la membrana, aumentando de forma significativa el porcentaje permeado del sustrato modelo. En la celda de tipo horizontal la gravedad no afecta significativamente el porcentaje permeado, por lo que la incidencia de las moléculas de azul de metileno sobre la membrana, está determinada por la difusión y el gradiente de concentración que se tiene.

Por último, pero no menos importante, se tiene un compartimento donador con un volumen mucho menor en la celda de Franz de tipo vertical, en relación con el de la celda de tipo horizontal, pues claramente la disposición y el tamaño del reservorio de la celda vertical no permite adicionar los 125mL que se disponen en la celda horizontal. Además de esto, la disposición de la celda horizontal requiere un sistema de sellado entre los dos compartimentos, de tal forma que al disponer el agua y la muestra al interior de los compartimentos no se presenten fugas que afecten el volumen efectivo y con ello, se tengan resultados variables entre los distintos estudios.

Dicho lo anterior de que la celda de Franz de tipo horizontal como metodología tiene menor variabilidad en sus resultados, es importante establecer a partir de los porcentajes de los coeficientes de variación cuál es el conjunto de variables operacionales en el que la metodología es más reproducible para cada tipo de celda. Al analizar la Tabla 3 se puede decir que la temperatura en la que se obtiene menor variabilidad de los datos es a 37°C; con esta se disminuye en aproximadamente un 50% la variabilidad de los datos respecto a desarrollar la metodología a 25°C en la celda horizontal. Con los datos expuestos en la Tabla 4, se recomienda desarrollar la metodología para las celdas de tipo vertical a una temperatura de 25°C, temperatura en la cual se obtuvo un menor porcentaje de coeficiente de variación para los 3 parámetros estudiados, ya que cuando se implementa la metodología a la temperatura de 37°C en este tipo de celdas que no poseen chaqueta térmica en el compartimento donador, se da una diferencia térmica importante que afecta los fenómenos de solubilidad y difusión.

Por otro lado, al analizar la Tabla 3 se puede decir que la velocidad de agitación en la que se obtiene menor variabilidad de los datos en la celda de tipo horizontal es a 480 rpm, ya que la máxima agitación permite que en los dos compartimentos el sustrato se distribuya homogéneamente. Con los resultados obtenidos de los coeficientes de variación en la Tabla 4, se recomienda desarrollar la metodología para las celdas de tipo vertical a una velocidad de agitación de 360 rpm, velocidad agitación en la cual se obtuvo un menor porcentaje de coeficiente de variación para los 3 parámetros estudiados, ya que cuando se implementa la metodología a la velocidad de 240 rpm, no se alcanza a distribuir homogéneamente el sustrato que ha sido permeado a en el compartimento aceptor y cuando se desarrolla la metodología con una velocidad de agitación de 480 rpm se ve favorecida la formación de burbujas que afectan drásticamente la permeación del sustrato.

Por último, tanto para la celda vertical como para la horizontal se recomienda desarrollar la metodología con la membrana de celulosa, ya que este tipo de membrana no condiciona la permeación del sustrato como si lo hace la membrana Strat-M® al tener una naturaleza hidrofóbica tan marcada.

8 CONCLUSIONES

En cuanto a la temperatura: No hay diferencia significativa al implementar la metodología de celdas de Franz de tipo vertical y horizontal en el rango de temperaturas de 25°C a 37°C, aunque se recomienda que cuando se utilice celdas de tipo horizontal se realice a 37°C, ya que a esta temperatura se obtiene un %CV menor en sus resultados y cuando se utilice celdas de tipo vertical se realice a 25°C, ya que a esta temperatura se obtiene un %CV menor en sus resultados.

En cuanto a la velocidad de agitación: Se concluye que la velocidad de agitación es una variable operacional crítica en el desarrollo de la metodología de celdas de Franz de tipo horizontal y vertical. En cuanto a reproducibilidad en la celda vertical se recomienda agitar a una velocidad de 360 rpm, ya que es la velocidad de agitación en la cual se obtiene un menor %CV. Para la celda de tipo horizontal se recomienda agitar a 480 rpm, ya que es la velocidad de agitación con la que se obtiene menor %CV.

En cuanto al tipo de membrana utilizada: para los dos tipos de celdas es óptimo realizar los estudios con una membrana de celulosa, ya que esta no condiciona la permeación.

En cuanto al tipo de celda: Se concluye que la celda de tipo horizontal arroja datos con un alto grado de reproducibilidad para los estudios de preformulación, por sus bajos porcentajes coeficientes de variación. Aunque la celda de Franz de tipo horizontal sea el tipo de celda más reproducibles, al momento de elegir este tipo de celda hay que tener en cuenta que su adecuación es más compleja, además de que requiere una mayor cantidad de muestra y es por ello que de acuerdo a las necesidades del estudio se puede optar por la celda de tipo vertical o por la de tipo horizontal.

9 RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios de permeabilidad a diferentes pH utilizando las variables operacionales óptimas, debido a que el grado de ionización de una molécula, puede afectar significativamente la permeabilidad.

Realizar estudios de permeabilidad a las condiciones óptimas concluidas en este estudio, para fármacos de aplicación transdérmica y/o tópica, con el fin de probar la reproducibilidad de los datos para una formulación.

Realizar el estudio en un medio apolar, utilizando la membrana Strat-M®.

Emplear estudios de permeabilidad con modelos *in vivo* que tengan en cuenta la variabilidad interindividual

10 BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo-García, J. I., & Meléndez-González, J. A. (2011). Importancia de la tecnología para el desarrollo de las pequeñas y medianas empresas del sector industrial área farmacéutica de San Salvador. El Salvador: Universidad de El Salvador.
- Aguilar, J. P. (1983). *Fenómenos de transporte a través de membranas*. Artículo, Universidad Complutense Madrid, Madrid.
- Aguilera, A., Saez, A., Hardly, E., & Estévez, T. (Julio-Septiembre de 2000). Diseño de validación de una celda de difusión para estudios de liberación in vitro de biomoléculas. *Biotechnología Aplicada*, 17, 187-190.
- Alain Pineau b , Olivier Guillard a , Bernard Fauconneau d , Frédéric Favreau a, Marie-Helene Marty C, Angeline Gaudin C, Claire Marie Vincent C, Anni Marraud A, Jean-Paul Marty C. (2012). In vitro study of percutaneous absorption of aluminum from antiperspirants through human skin in the Franz diffusion cell. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 21-26.
- Alves, A. C., Ramos, I. I., Nunes, C., Magalhaes, L. M., Sklenarova, H., Segundo, M. A., y otros. (2016). On-line automated evaluation of lipid nanoparticles transdermal permeation using Franz diffusion cell and low-pressure chromatography. *Talanta*, 146, 369-374.
- André Bersani Dezani, Thaisa Marinho Pereira, Arthur Massabki Caffaro, Juliana Mazza Reis, Cristina Helena Dos Reis Serra. (8 de January de 2013). Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 194 - 202.
- Avdeef, A. (2003). *Permeability-Solubility-Charge State and the pH Partition Hypothesis. Absorption and Drug Development*. New Jersey: Hoboken.
- Balzus, Sahle, Hönzke, Gerecke, Schumacher, Hedtrich, Kleuser, Bodmeier. (JUN de 2017). Formulación y ex vivo de evaluación de nanopartículas poliméricas para el suministro controlado de corticosteroides a la piel y el epitelio corneal . *European Journal of farmacéutica y biofarmacéutica*, 115, 122-130.
- Bersani-Dezani, A., Marinho-Pereira, T., Massabki-Caffaro, A., Massa-Reis, J., & dos Reis-Sierra, C. H. (May-June de 2013). Determination of lamivudine and zidovudine permeability using a different ex vivo method in Franz cells. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 67(3), 194-202.
- Bonferoni, M. C. Rossi, S. Ferrari, F. Caramella, C. (1998). *A Modified Franz Diffusion Cell for Simultaneous Assessment of Drug Release and Washability of Mucoadhesive Gels* (Vol. 4). Pavia, Italia: Journal of Pharmaceutical Development and Technology.

- Buesa-Martínez, O. (1995). *Estudio comparativo de estabilidad fisicoquímica y disponibilidad in vitro de ketoprofeno en formas tópicas desarrolladas con nuevos excipientes*. Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Madrid.
- Chan, S.-Y., Chung, Y.-Y., Lington, E., & Quah, J. (2015). The characterization and dissolution performances of spray dried solid dispersion of ketoprofen in hydrophilic carriers. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(5), 372-385.
- Chen, Y., Quan, P., Liu, X., Wang, M., & Fang, L. (2014). Novel chemical permeation enhancers for transdermal drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 51-64.
- Cirri, M., Bragagni, M., Mennini, N., & Mura, P. (2012). Development of a new delivery system consisting in “drug – in cyclodextrin – in nanostructured lipid carriers” for ketoprofen topical delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(1), 46–53.
- Costa, P., & Sousa-Lobo, J. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123-133.
- Danhua Liu, Chong Zhang, Xiaowei Zhang, Zhu Zhen, Ping Wang, Jianxin Li, Dongxu Yi, Ying Jin, Dan Yang. (12 de Junio de 2015). Permeation measurement of gestodene for some biodegradable materials using Franz diffusion cells. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23, 413 - 420.
- Danhua, L., Chong, Z., Xiaowei, Z., Zhen, Z., Zhu, Z., Ping, W., y otros. (2015). Permeation measurement of gestodene for some biodegradable materials using Franz diffusion cells. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(4), 413-420.
- de Jalón, E. G., Josa, M., Campanero, M. A., Santoyo, S., & Ygartua, P. (2000). Determination by high-performance liquid chromatography of ketoprofen in vitro in rat skin permeation samples. *J Chromatogr A*, 870(1-2), 143-149.
- Dressman, J. B., Amidon, G. L., Reppas, C., & Shah, V. P. (1998). Dissolution testing as a pronostic toll for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharmaceutical Research*, 15(1), 11-22.
- Drug Bank. (s.f.). *Drug Bank*. Recuperado el 08 de mayo de 2015, de <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01009>
- Ducrotté, A. Kirilova, P. Salvia, J. Trana, V. Doreb, V. Marignac, G. Pignon, C. Perrot, S. Boulieua, R. Université de Lyon. (Diciembre de 2016). Ex-vivo permeation of enrofloxacin through shed skin of Python molurus bivittatus, as evaluated with a Franz cell. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 36, 89 - 94.

- Espinal, M. Restrepo, L. Narváez, C. (16 de Abril de 2016). Effect of pectins on the mass transfer kinetics of monosaccharides, aminoacids, and a corn oil-in-water emulsion in a Franz diffusion cell. *Food Chemistry*, 209, 144 - 153.
- Fox, L. T., Gerber, M., du Prezz, J. L., du Plessis, J., & Hamman, J. H. (January de 2014). Skin permeation enhancement effects of the gel and whole-leaf materials of Aloe vera, Aloe marlothii and Aloe ferox. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(1), 96–106.
- Frank Netzlafla a , Karl-Heinz Kostka b , Claus-Michael Lehr a, Ulrich F. Schaefer a. (2006). measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells in vitro. Limitations shown by transport data testing. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 44-50.
- Franz, T. (1978). The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man. *Curr Probl Dermatol*, 58-68.
- Franz, T. J. (March de 1975). Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. *Journal of Investigative Dermatology*, 64, 190-195.
- Gantiva, M., Yurquina, A., & Martínez, F. (2010). Solution Thermodynamics of Ketoprofen in Ethanol + Water Cosolvent Mixtures. *J. Chem. Eng. Data.*, 55(1), 113–118.
- Gudnasona, K. Solodovab, S. Vilardellc, A. Massonb, M. Sigurdsson, S. Jonsdottira, F. (03 de Enero de 2017). Numerical simulation of Franz diffusion experiment: Application to drug loaded soft contact lenses. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 38, 18–27.
- Hachem, J. P., Crumrine, D., Fluhr, J., Brown, B. E., Feingold, K. R., & Elias, P. M. (2003). pH Directly Regulates Epidermal Permeability Barrier Homeostasis, and Stratum Corneum Integrity/Cohesion. *The Journal of Investigative Dermatology*, 121, 345-353.
- Herwadkar, A., Sachdeva, V., Taylor, L. F., Silver, H., & Banga, A. K. (February de 2012). Low frequency sonophoresis mediated transdermal and intradermal delivery of ketoprofen. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), 289-296.
- Hortolá Duran, M., Bozaco Freixes, J., Martín , D. I., Guitart Peraire, C., & Berrozpe Domenech, J. (s.f.). Estudio de correlaciones entre permeación transdérmica de benzodiazepinas y parámetros fisicoquímicos y moleculares. *Biofarmacia y Farmacocinética*, 337.
- Iannacone, J., & Alvarino, L. (2007). Ecotoxicidad acuática de dos colorantes y de tres antiparasitarios de importancia en acuicultura en *Daphnia magna*. *Ecología Aplicada*, 6(1-2), 101-110.

- Janani, N. S., Kumar, B. G., Balakrishna, P., Surthi, D., Kumar, S. M., & Mantry, S. (2014). A review on Strat-M membrane. *International Journal of Innovative Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(4), 962-977.
- Jiang, Xiaoyun. Xu, Mingyu. Qi, Haitao. (2010). The fractional diffusion model with an absorption term and modified. *In Nonlinear Analysis: Real World Applications*, 11, 262-269.
- Karadzovska, D., & Riviere, J. E. (2013). Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(5), 569-576.
- Klimundová, J. Šatinský, H. Sklenářová, P. Solich, D. (15 de Mayo de 2006). Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell,. *sciencedirect*, 69, 730-735.
- Kristof, J. Miyamoto, H. Tran, A. Blajan, M. Shimizu, K. (02 de JUN de 2017). Feasibility of transdermal delivery of Cyclosporine A using plasma discharges. . *Biointerphases*, 12.
- Kumar, P. Sanghvi, P. Collins, P. Charles, C. (1993). *Comparison of Diffusion Studies of Hydrocortisone Between the Franz Cell and the Enhancer Cell*. (Vol. 19). pittsburgh: Journal of Drug Development and Industrial Pharmacy.
- Larissa Zhou, Kendra Nyberg, Amy C. Rowat. (01 de Septiembre de 2015). Understanding diffusion theory and Fick's law through food and cooking. *Advances in Physiology Education*, 39, 192-197.
- Lozano, H., & Martinez, F. (2006). Thermodynamics of partitioning and solvation of ketoprofen in some organic solvent/ buffer and liposome systems. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(4), 602-613.
- Lucero, M. Claro, C. Casas, M. Jiménez-Castellanos, M. (13 de Septiembre de 2012). Drug diffusion from disperse systems with a hydrophobically modified polysaccharide: Enhancer® vs Franz cells. *Carbohydrate polymers*, 92, 149 - 156.
- Lucía Lhez, Nora B. Pappano y Nora B. (2010). Estudio ex vivo de la liberación transdérmica de enalapril. *Universidad Nacional de San Luis*, 41-47.
- M.D Vlachou, D.M Rekkas, P.P Dallas y N.H Choulis. . (20 de April de 1992). Development and in vitro evaluation of griseofulvin gels using Franz diffusion cells. *International Journal of Pharmaceutics.*, 82, 47-52.
- Maestrelli, F., Gonzalez Rodriguez, M. L., Rabasco, A. M., & Mura, P. (2005). Preparation and characterisation of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes for transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 298(1), 55-67.

- Mahato, R. I., & Narang, A. S. (2011). *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery* (Segunda ed.). CRC Press Taylor & Francis Group.
- María V. Debandi, Nora J. François, Marta E. Daraio. (2011). Evaluación de distintas membranas para liberación in vitro de principios activos anticelulíticos. . *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 2, 97.
- Martínez, F., Tello, M., & Gómez, A. (2000). Solventes orgánicos como sistemas de reparto en modelación QSAR. *Revista Colombiana De Ciencias Químico Farmacéuticas*(29), 16.
- Martinez-Pla, J. J., Martin-Biosca, Y., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R. M., & Medina-Hernandez, M. J. (2004). Evaluation of the pH effect of formulations on the skin permeability of drugs by biopartitioning micellar chromatography. *Science Direct*, 255-262.
- Merck Millipore Corporation. (2015). *Merck Millipore*. Obtenido de http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Strat-M-Membrane-for-Transdermal-Diffusion-Testing,MM_NF-C112892
- Molina, R. G. (2011). Estudios de difusión a través de piel de formulaciones liposómicas de aciclovir. *UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID FACULTAD DE FARMACIA* .
- Nguyen, H. Banga, A. (MAR de 2017). Fabrication, characterization and application of sugar microneedles for transdermal drug delivery. . *Therapeutic deliver*, 8, 249-264,.
- Oltra Noguera, D. M. (2010). *Estudio de la variabilidad de la permeabilidad intestinal de fármacos. Estudios in vitro e in situ*. Tesis Doctoral, Universitat de Valencia, Valencia.
- Paolino, D., Ventura , C. A., Nisticò , S., Puglisi, G., & Fresta, M. (2002). Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. *International Journal of Pharmaceutics*, 244(1-2), 21-31.
- PermeGear. (2015). *PermeGear*. Recuperado el 08 de mayo de 2015, de permegear.com
- Pil H. Lee a , Robert Conradi b , Veerabahu Shanmugasundaram. (November de 2009). Development of an in silico model for human skin permeation based on a Franz cell skin permeability assay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 70-73.
- Rang, H., & Dale, M. (2012). *Rang and Dale's Pharmacology*. Edinburgh: Elsevier/ Churchill Livingstone.
- Rhee, Y. S., Choi, J. G., Park, E. S., & Chi, S. C. (2001). Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 228(1-2), 161-170.

- Roca, W. (2004). *Estudio de las capacidades biotecnológicas e instituciones para el aprovechamiento de la biodiversidad en los países de la Comunidad Andina*. Centro Internacional de la Papa, Lima.
- Rosenbaum, S. (2011). *Pharmacokinetics y Pharmacodinamics*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Salazar-Hernández, R., & Peralta-Miranda, P. (2014). Una mirada a la industria farmacéutica en Colombia. *FACCEA*, 4(2), 107-115.
- Sánchez de Dios, A. B. (2013). *Mecanismo de accion y óptima seleccion de codisolventes en formas farmacéuticas*. Universidad de Alcalá de Henares, Departamento de Ciencias Biomédicas, Madrid.
- Shinde Anil, Garala Kevin y More Harinath. (2008). Development and characterization of transdermal therapeutics system of tramadol hydrochloride. *Shinde Anil, Garala Kevin y More Harinath, Vol 2*, 265-269.
- Sigma-Aldrich. (2014). *sigma-aldrich.com*. Recuperado el 1 de diciembre de 2015, de https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/d9402pis.pdf
- Silverthorn, D. U. (2009). *Fisiología humana: un enfoque integrado* (Cuarta ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Simona, A. Amarob, M. Healyb, A. Cabrala, L. Pereira, V. (15 de octubre de 2016). Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. *International Journal of Pharmaceutics*, 512, 234–241.
- The United States Pharmacopeial Convention. (2017). *Farmacopea de los estados unidos de america 39, NF-34* (Vol. 1). The United States: The standard quality.
- Uchida, T., Kadhum, W. R., Kanai, S., Todo, H., Oshizaka, T., & Sugibayashi, K. (2015). Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67, 113-118.
- Vanesa Berlanga Silvente, María José Rubio Hurtado . (07 de 2012). *Clasificación de pruebas no paramétricas. Cómo aplicarlas*. Recuperado el 01 de 06 de 2017, de <http://www.raco.cat/index.php/REIRE/article/viewFile/255793/342836>
- Victoria Eugenia Ospina, Julio Cesar Mantilla, Carlos Arturo Conde, Patricia Escobar. (2014). Permeación en piel humana de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada para la optimización de tratamientos tópicos de leishmaniasis cutánea. *Cienc Salud*, 195-211.

- Villarino, N., & Landoni, M. (2006). Administraciones transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica. *Analecta Veterinaria*, 26(1), 28-37.
- Vinod P Shah, Jerome Elkins, See-Yan Lam, Jerime P. Skelly. (1 de July de 1989). Determination of in vitro drug release from hydrocortisone creams. . *International Journal of Pharmaceutics.*, 53, 53-59.
- Welling, S. H., Clemmensen, L. K., Buckley, S. T., Hovgaard, L., Brockhoff, P. B., & Refsgaard, H. H. (2015). In silico modelling of permeation enhancement potency in Caco-2 monolayers based on molecular descriptors and random forest. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 94, 152-159.
- Yiyun, C., Tongwen, X., & Rongqiang, F. (2005). Polyamidoamine dendrimers used as solubility enhancers of ketoprofen. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40(12), 1390-1393.
- Yolima Baena, Leidy J. Dallos, Rubén H. Manzo, Luisa F. Ponce D'León. (2011). Estandarización de celdas de Franz para la realización de ensayos de liberación de fármacos a partir de complejos con polielectrolitos. *Colombiana. Ciencia. Química. Farmcia*, 40, 174-188.
- Yuliya Levintova, Fotios M. Plakogiannis, Robert A. Bellantone. (23 de July de 2011). An improved in vitro method for measuring skin permeability that controls excess hydration of skin using modified Franz diffusion cells. . *International Journal of Pharmacs*, 96-106.
- Yunus Cengel, Michael Boles. (2012). *Termodinamica*. Mexico D.F.: McGraw-Hill.
- Zeb, A. Qureshi, O. Yu, C. Akram, M. Kim, H. Kim, M. Kang, J. Majid, A. Chang, S. Bae, E. . (2017). Enhanced actividad anti-reumática de gel liposomal ultradeformables metotrexato atrapado en modelo de rata de artritis inducida por adyuvante . *Journal of Pharmaceutics*, 92-100.
- Zhang, T., Oyama, T., Hidaka, H., Zhao, J., Serpone, N., & Aoshima, A. (2011). Photooxidative N-demethylation of methylene blue in aqueous TiO₂ dispersions under UV irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 140(2), 163-172.
- Zhao, W. C., Hou, Z. H., Zhang, Q., & Zheng, W. (2014). Transcellular transport characteristics of huperzine alone or in combination with ginkgolide B across Caco-2 and Madin-Darby canine kidney cell monolayer. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(11), 889-894.

11 ANEXOS

11.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE AZUL DE METILENO Y ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Principalmente se preparó una solución stock de azul de metileno a una concentración de 20 μM en medio acuoso, a partir esta solución se realizaron 5 diluciones (las soluciones que resultaron de las diluciones quedaron a una concentración de 20 μM , 10 μM , 8 μM , 4 μM , 2 μM y 1 μM), con el objetivo de realizar una curva de calibración que permita la posterior cuantificación del azul de metileno a una absorbancia a 664 nm, las mediciones se realizaron por triplicado y se obtuvo de estas el promedio.

[AM] μM	Promedio de las ABS (664 nm)	
	25 °C	37 °C
20	1,054	1,080
10	0,487	0,489
8	0,379	0,379
4	0,145	0,162
2	0,070	0,059
1	0,037	0,037

Tabla 5. Datos de las absorbancias para la curva de calibración de azul de metileno

Finalmente se realizó una regresión lineal por mínimos cuadrados, con la que se obtuvieron las ecuaciones de las rectas de Beer-Lambert, porque esto se hizo para cada una de las temperaturas establecidas en el estudio (25°C y 37°C). En la tabla 5 se muestran los valores obtenidos de las absorbancias, como se realizó por triplicado, se tomó el promedio de las tres mediciones y se elaboró a partir de estos la figura 13.

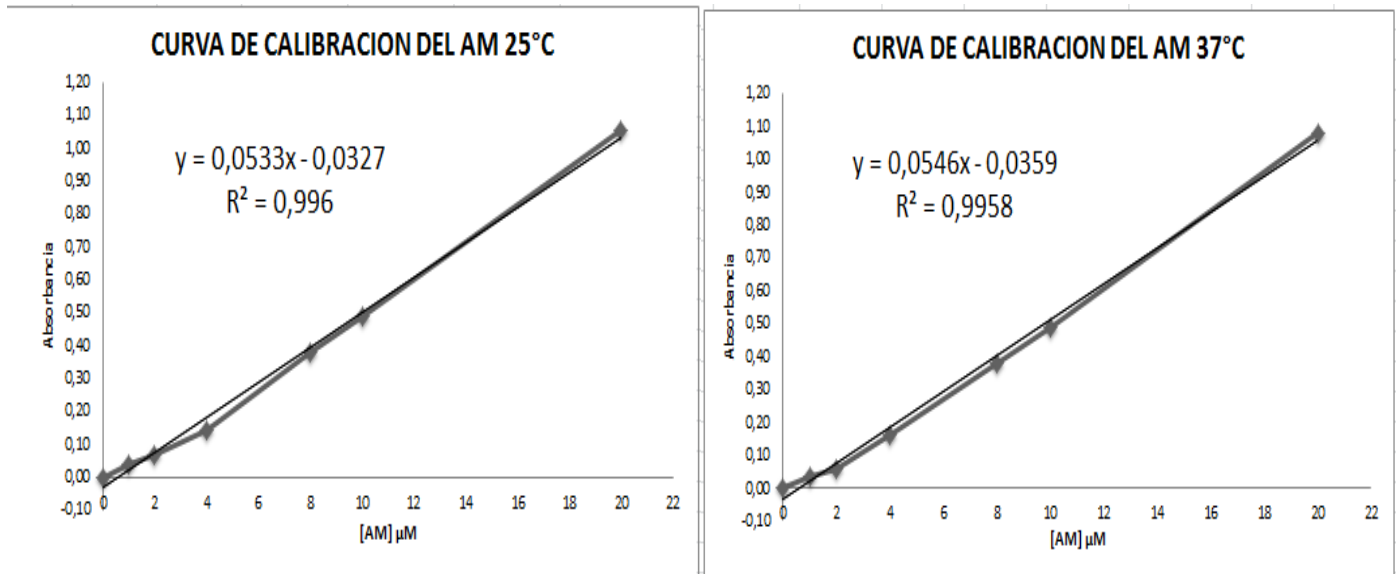


Figura 13. Gráfico de Absorbancia Vs. Concentración de azul de metileno (Curva de calibración).

A partir de esta curva de calibración se calcularon las concentraciones de azul de metileno que correspondían a las absorbancias medidas durante cada uno de los estudios, teniendo en cuenta la temperatura a la cual se desarrollaron los experimentos.

11.2 OBTENCIÓN DEL PERFIL DE PERMEABILIDAD:

Tabla 6. Datos del perfil de permeabilidad de AM a 25°C y 37°C para la celda vertical.

TIEMPO (h)	25°C vertical (360rpm, membrana de celulosa)			37°C vertical (360rpm, membrana de celulosa)		
	[AM] 1° RÉPLICA	[AM] 2° RÉPLICA	[AM] 3° RÉPLICA	[AM] 1° RÉPLICA	[AM] 2° RÉPLICA	[AM] 3° RÉPLICA
0,0	0,000	0,018	0,000	0,000	0,000	0,000
0,1	0,000	0,018	0,037	0,233	0,018	0,036
0,2	0,018	0,018	0,074	0,251	0,036	0,144
0,3	0,037	0,037	0,184	0,269	0,090	0,215
0,5	0,129	0,092	0,424	0,377	0,215	0,485
0,8	0,239	0,258	0,663	0,521	0,341	0,772
1,0	0,387	0,516	0,976	0,718	0,503	1,059
1,3	0,589	0,700	1,197	0,898	0,664	1,329
1,5	0,773	0,976	1,473	1,113	0,826	1,688
2,0	0,921	1,326	1,989	1,472	1,167	2,334
2,5	1,160	1,694	2,597	1,813	1,382	2,657
3,0	1,897	1,989	2,376	2,298	1,795	3,034
3,5	2,560	2,449	3,610	2,657	2,101	3,303
4,0	2,707	3,499	3,978	2,908	2,388	3,914
5,0	3,389	3,720	4,641	3,429	2,873	4,327
6,0	3,978	4,512	5,101	3,662	3,160	4,488
7,0	4,438	4,788	5,562	4,129	3,662	4,578
8,0	5,064	5,285	5,709	4,596	4,165	4,686

Tabla 7. Datos del perfil de permeabilidad de AM a 25°C y 37°C para la celda horizontal.

TIEMPO (h)	25°C horizontal (360rpm, membrana de celulosa)			37°C horizontal (360rpm, membrana de celulosa)		
	[AM] 1° RÉPLICA	[AM] 2° RÉPLICA	[AM] 3° RÉPLICA	[AM] 1° RÉPLICA	[AM] 2° RÉPLICA	[AM] 3° RÉPLICA
0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,1	0,000	0,000	0,018	0,000	0,018	0,018
0,2	0,018	0,018	0,074	0,018	0,054	0,036
0,3	0,037	0,018	0,147	0,108	0,126	0,072
0,5	0,147	0,129	0,331	0,090	0,449	0,233
0,8	0,295	0,258	0,479	0,180	0,916	0,449
1,0	0,516	0,479	0,608	0,413	1,382	0,682
1,3	0,718	0,773	0,773	0,844	1,939	1,005
1,5	0,921	0,958	0,939	1,364	2,496	1,346
2,0	1,584	1,492	1,547	2,567	3,662	2,101
2,5	2,265	2,192	2,118	3,339	4,111	2,908
3,0	3,020	2,873	2,652	4,309	4,632	3,788
3,5	3,849	3,683	3,131	5,260	4,847	4,668
4,0	4,678	4,512	3,720	6,050	5,242	5,637
5,0	6,188	6,059	4,880	8,007	6,086	7,271
6,0	7,716	7,845	5,967	9,695	8,133	9,192
7,0	9,484	9,429	7,164	11,508	10,952	10,844
8,0	10,810	10,608	8,416	13,232	14,093	12,747

Tabla 8. Datos del perfil de permeabilidad de AM a 240rpm, 360rpm y 480rpm para la celda vertical.

TIEMPO (h)	240rpm vertical (37°C, membrana de celulosa)			360rpm vertical (37°C, membrana de celulosa)			480rpm vertical (37°C, membrana de celulosa)		
	[AM] 1° RÉPLICA	[AM] 2° RÉPLICA	[AM] 3° RÉPLICA	[AM] 1° RÉPLICA	[AM] 2° RÉPLICA	[AM] 3° RÉPLICA	[AM] 1° RÉPLICA	[AM] 2° RÉPLICA	[AM] 3° RÉPLICA
0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,1	0,108	0,072	0,018	0,018	0,233	0,018	0,144	0,072	0,054
0,2	0,108	0,090	0,036	0,054	0,251	0,054	0,287	0,108	0,108
0,3	0,090	0,144	0,090	0,108	0,269	0,180	0,539	0,197	0,180
0,5	0,215	0,359	0,233	0,215	0,377	0,539	1,329	0,413	0,449
0,8	0,503	0,467	0,377	0,395	0,521	0,987	1,939	0,664	0,646
1,0	0,754	0,646	0,575	0,539	0,718	1,167	2,460	0,898	0,880
1,3	1,023	0,808	0,790	0,790	0,898	1,329	3,052	1,077	1,113
1,5	1,311	0,969	0,987	1,077	1,113	1,526	3,537	1,293	1,311
2,0	1,849	1,239	1,346	1,311	1,472	1,867	3,806	1,688	1,759
2,5	2,460	1,544	1,741	1,670	1,813	2,136	4,811	2,101	2,208
3,0	2,908	1,831	2,047	1,993	2,298	2,406	5,386	2,406	2,621
3,5	3,716	2,208	2,334	2,226	2,657	2,711	5,925	2,711	3,016
4,0	3,950	2,352	2,621	2,747	2,908	3,178	6,499	3,250	3,752
5,0	4,847	3,034	3,232	3,214	3,429	3,411	7,217	4,165	4,363
6,0	5,332	3,375	3,662	3,555	3,662	3,860	7,666	4,883	4,883
7,0	5,871	3,788	4,129	3,734	4,129	4,291	7,953	5,566	5,296
8,0	6,445	3,986	4,632	3,860	4,596	4,686	8,115	5,996	5,781

Tabla 9. Datos del perfil de permeabilidad de AM a 240rpm, 360rpm y 480rpm para la celda horizontal.

TIEMPO (h)	240rpm horizontal (37°C, membrana de celulosa)			360rpm horizontal (37°C, membrana de celulosa)			480rpm horizontal (37°C, membrana de celulosa)		
	[AM] 1° RÉPLICA	[AM] 2° RÉPLICA	[AM] 3° RÉPLICA	[AM] 1° RÉPLICA	[AM] 2° RÉPLICA	[AM] 3° RÉPLICA	[AM] 1° RÉPLICA	[AM] 2° RÉPLICA	[AM] 3° RÉPLICA
0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,1	0,108	0,000	0,090	0,000	0,018	0,018	0,000	0,000	0,018
0,2	0,036	0,036	0,054	0,018	0,054	0,036	0,054	0,072	0,036
0,3	0,036	0,233	0,090	0,108	0,126	0,072	0,054	0,072	0,072
0,5	0,180	0,180	0,018	0,090	0,449	0,233	0,251	0,251	0,233
0,8	0,377	0,359	0,377	0,180	0,916	0,449	0,485	0,503	0,449
1,0	0,628	0,575	0,575	0,413	1,382	0,682	0,754	0,754	0,682
1,3	0,916	0,826	1,005	0,844	1,939	1,005	1,041	1,167	1,005
1,5	1,400	1,077	1,257	1,364	2,496	1,346	1,382	1,544	1,346
2,0	1,795	1,670	1,562	2,567	3,662	2,101	2,047	2,226	2,101
2,5	2,460	2,244	2,118	3,339	4,111	2,908	2,801	3,160	2,908
3,0	3,088	2,873	2,819	4,309	4,632	3,788	3,662	3,932	3,788
3,5	3,734	3,537	3,662	5,260	4,847	4,668	4,560	4,794	4,668
4,0	4,417	4,237	4,165	6,050	5,242	5,637	5,458	5,673	5,655
5,0	5,835	5,583	5,458	8,007	6,086	7,271	6,984	7,343	7,271
6,0	6,948	6,894	6,984	9,695	8,133	9,192	8,779	8,779	9,192
7,0	8,474	8,205	8,510	11,508	10,952	10,844	10,431	10,521	10,844
8,0	9,856	9,479	10,000	13,232	14,093	12,747	12,011	12,065	12,747

Tabla 10. Datos del perfil de permeabilidad de AM con membrana de celulosa y Strat-M para la celda vertical.

TIEMPO (h)	Membrana de celulosa vertical (360rpm, 37°C)			Membrana Strat-M® vertical (360rpm, 37°C)		
	[AM] 1° RÉPLICA	[AM] 2° RÉPLICA	[AM] 3° RÉPLICA	[AM] 1° RÉPLICA	[AM] 2° RÉPLICA	[AM] 3° RÉPLIC A
0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,1	0,233	0,018	0,036	0,000	0,000	0,000
0,2	0,251	0,036	0,144	0,000	0,000	0,000
0,3	0,269	0,090	0,215	0,000	0,000	0,000
0,5	0,377	0,215	0,485	0,000	0,000	0,000
0,8	0,521	0,341	0,772	0,000	0,000	0,000
1,0	0,718	0,503	1,059	0,000	0,000	0,000
1,3	0,898	0,664	1,329	0,000	0,000	0,000
1,5	1,113	0,826	1,688	0,000	0,000	0,000
2,0	1,472	1,167	2,334	0,000	0,000	0,000
2,5	1,813	1,382	2,657	0,000	0,000	0,000
3,0	2,298	1,795	3,034	0,000	0,000	0,000
3,5	2,657	2,101	3,303	0,000	0,000	0,000
4,0	2,908	2,388	3,914	0,000	0,000	0,000
5,0	3,429	2,873	4,327	0,000	0,000	0,000
6,0	3,662	3,160	4,488	0,000	0,000	0,000
7,0	4,129	3,662	4,578	0,000	0,000	0,000
8,0	4,596	4,165	4,686	0,000	0,000	0,000

Tabla 11. Datos del perfil de permeabilidad de AM con membrana de celulosa y Strat-M para la celda horizontal.

TIEMPO (h)	Membrana de celulosa horizontal (360rpm, 37°C)			Membrana Strat-M® horizontal (360rpm, 37°C)		
	[AM] 1° REPLICA	[AM] 2° REPLICA	[AM] 3° REPLICA	[AM] 1° REPLICA	[AM] 2° REPLICA	[AM] 3° REPLICA
0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,1	0,000	0,018	0,018	0,000	0,000	0,000
0,2	0,018	0,054	0,036	0,000	0,000	0,000
0,3	0,108	0,126	0,072	0,000	0,000	0,000
0,5	0,090	0,449	0,233	0,000	0,000	0,000
0,8	0,180	0,916	0,449	0,000	0,000	0,000
1,0	0,413	1,382	0,682	0,000	0,000	0,000
1,3	0,844	1,939	1,005	0,000	0,000	0,000
1,5	1,364	2,496	1,346	0,000	0,000	0,000
2,0	2,567	3,662	2,101	0,000	0,000	0,000
2,5	3,339	4,111	2,908	0,000	0,000	0,000
3,0	4,309	4,632	3,788	0,000	0,000	0,000
3,5	5,260	4,847	4,668	0,000	0,000	0,000
4,0	6,050	5,242	5,637	0,000	0,000	0,000
5,0	8,007	6,086	7,271	0,000	0,000	0,000
6,0	9,695	8,133	9,192	0,000	0,000	0,000
7,0	11,508	10,952	10,844	0,000	0,000	0,000
8,0	13,232	14,093	12,747	0,000	0,000	0,000

11.3 TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

En cuanto el tratamiento estadístico por el que se dispusieron los datos obtenidos en los perfiles de permeabilidad a cada una de las variables operacionales, presenta algunas variantes importantes.

Se calcularon en principio las áreas bajo la curva para cada una de las réplicas realizadas para las diferentes variables operacionales, datos a partir de los cuales se obtuvo el promedio, la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación, con el cual finalmente se pudo establecer con confianza del 90% una buena reproducibilidad de los datos obtenidos en los estudios. No obstante luego de conocer los valores de %CV, se realizó una serie de pruebas no paramétricas para mostrar si existe una diferencia significativa entre los datos obtenidos para cada condición de estudio evaluada. Al estudiar el efecto de la temperatura y del tipo de membrana se utilizara el test de Mann-Whitney, debido a que en estas variables solo se evalúan dos grupos (25°C y 37°C para la temperatura, y membrana de celulosa y Strat-M para el tipo de membrana). Por otra parte, la velocidad de agitación fue sometida a un tratamiento estadístico de los datos mediante el test de Kruskal-Wallis, ya que en esta variable operacional se consideran tres grupos (240rpm, 360rpm y 480rpm).

11.3.1 Efecto de la temperatura:

Tabla 12. Resultados del test de Mann Whitney, para la comparación de la medias de AUC, al evaluar el efecto de la temperatura en la celda de Franz de tipo vertical.

Mann Whitney test	
Valor P	0,7
Diferencia significativa (P<0,05)	No

Tabla 13. Resultados del test de Mann Whitney, para la comparación de la medias de K_p , al evaluar el efecto de la temperatura en la celda de Franz de tipo vertical.

Mann Whitney test	
Valor P	0,2
Diferencia significativa (P < 0.05)	No

Tabla 14. Resultados del test de Mann Whitney, para la comparación de la medias de T_L , al evaluar el efecto de la temperatura en la celda de Franz de tipo vertical.

Mann Whitney test	
Valor P	0,4
Diferencia significativa (P < 0.05)	No

Tabla 15. Resultados del %CV al analizar el efecto de la temperatura en la celda de Franz de tipo vertical, para parámetro el K_p .

Replica	25°C Vertical (360rpm y membrana de celulosa)	37°C vertical (360 rpm y membrana celulosa)
1	1681,44	1623,84
2	1857,84	1397,04
3	2151,68	2076,56
Prome dio	1896,98	1699,14
SD	237,55	345,96
%CV	12,52	20,36

Tabla 16. Resultados del %CV al analizar el efecto de la temperatura en la celda de Franz de tipo vertical, para parámetro el T_L .

Replica	25°C Vertical (360rpm y membrana de celulosa)	37°C vertical (360 rpm y membrana celulosa)
1	1,49	0,46
2	1,31	0,94
3	0,61	0,39
Prome dio	1,14	0,60
SD	0,46	0,30
%CV	40,56	49,88

Tabla 17. Resultados del test de Mann Whitney, para la comparación de la medias de AUC, al evaluar el efecto de la temperatura en la celda de Franz de tipo horizontal.

Mann Whitney test	
Valor P	0,1
Diferencia significativa (P<0,05)	No

Tabla 18. Resultados del test de Mann Whitney, para la comparación de la medias de K_p , al evaluar el efecto de la temperatura en la celda de Franz de tipo horizontal.

Mann Whitney test	
Valor P	0,1
Diferencia significativa (P < 0.05)	No

Tabla 19. Resultados del test de Mann Whitney, para la comparación de la medias de T_L , al evaluar el efecto de la temperatura en la celda de Franz de tipo horizontal.

Mann Whitney test	
Valor P	0,4
Diferencia significativa (P < 0.05)	No

Tabla 20. Resultados del %CV al analizar el efecto de la temperatura en la celda de Franz de tipo horizontal, para parámetro el K_p .

Replic a	25°C horizontal (360rpm y membrana de celulosa)	37°C horizontal (360 rpm y membrana celulosa)
1	639,77	810,35
2	631,37	729,37
3	500,16	729,38
Promedio	590,43	765,11
SD	78,29	41,31
%CV	13,26	5,40

Tabla 21. Resultados del %CV al analizar el efecto de la temperatura en la celda de Franz de tipo horizontal, para parámetro el TL.

Replic a	25°C horizontal (360rpm y membrana de celulosa)	37°C horizontal (360 rpm y membrana celulosa)
1	1,84	1,71
2	1,87	1,15
3	1,48	1,69
Prome dio	1,73	1,52
SD	0,21	0,31
%CV	12,44	20,65

De tal manera queda demostrada la parte estadística empleada para el tratamiento de los datos obtenidos, de forma similar se desarrollaron los procedimientos estadísticos para cada una de las variables estudiadas, mediante las cuales se lograron obtener los valores P correspondientes a cada correlación entre las diferentes variables operacionales. Ahora bien se realizó una pequeña modificación estadística en el tratamiento de los datos referentes a la velocidad de agitación, ya que por ser tres condiciones a evaluar fue necesario realizar el análisis estadístico de forma diferente (test de comparación múltiple de Dunn's, y test de Kruskal-Wallis).

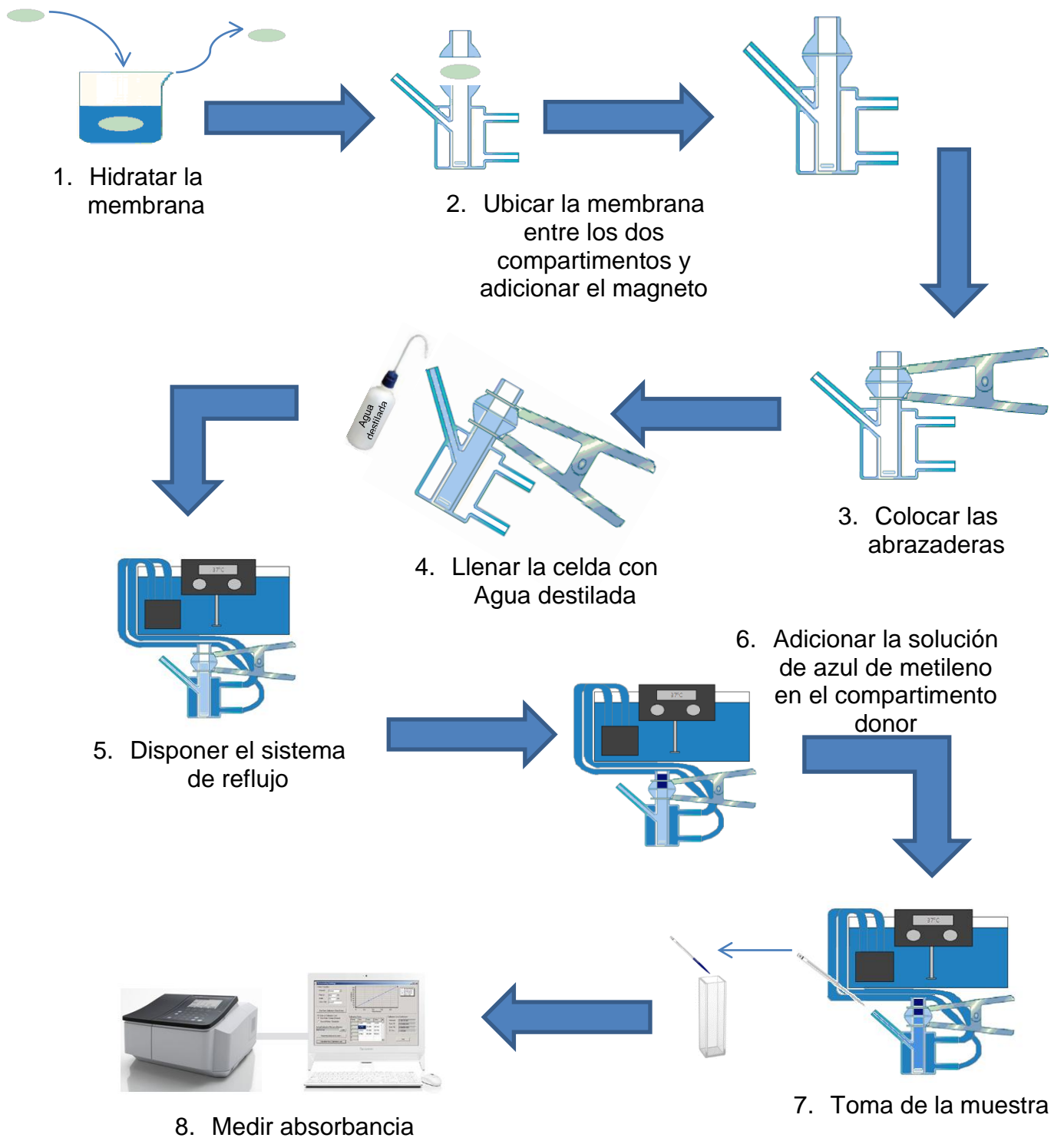
11.4 IMPACTO AMBIENTAL

En los últimos años el desarrollo de nuevos materiales y de nuevos excipientes utilizados en formulaciones de uso transdérmico, han abierto un desarrollo de nuevas posibilidades de mejorar la biodisponibilidad de fármacos de uso local, por lo que se han venido realizando estudios de permeabilidad en celdas de Franz con polímeros biodegradables, los cuales son menos contaminantes para el medio ambiente, que los solventes orgánicos anteriormente utilizados en las formulaciones, ahora bien, su implementación está basada en gran medida por los perfiles de permeabilidad obtenidos por medio de esta metodología.

Uno de los aspectos importantes es que en el experimento se emplea la molécula azul de metileno como sustrato modelo del estudio, esta es una especie que puede ser muy irritante en altas cantidades y traer consecuencias para el medio ambiente, si se tiene en cuenta el número de experimentos que se llevan a cabo dentro del estudio y a la cantidad utilizada para cada uno de ellos. La totalidad de desechos que se producen es considerable, y teniendo en cuenta las recomendaciones de la ficha técnica del azul de metileno, es necesario tener precaución con el manejo de estos residuos, debido a que estos de llegar a fuentes hídricas podrían provocar efectos nocivos, alergias, y problemas ambientales, aunque esta sustancia es comúnmente utilizada en acuicultura para tratar infecciones fúngicas.

Finalmente otro de los desechos que se producen en los estudios de permeabilidad, son las membranas de celulosa utilizadas, las cuales tienen una vida media útil no muy larga, por lo que, basados en la fichas técnicas de cada tipo de membrana (expedida por el fabricante), fueron dispuestos los residuos en la basura sin mayor riesgo sobre el medio ambiente.

11.5 Montaje celda vertical





FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Yo, Constain Salamanca Mejía, director del proyecto de grado: "*optimización metodológica para estudios de permeabilidad in vitro empleado los modelos de celda de Franz horizontal y vertical*", realizados por los estudiantes **Juan camilo Lasso reyes** y **Jhon Freddy Ruiz Durango**, certifico que los estudiantes atendieron todas las recomendaciones y correcciones realizadas por el evaluador Cristhian Javier Yarce.

Cordialmente,

Constain Salamanca Mejía

CALLE 18 No. 122-135 PANCE, A.A. 25608
PBX. 5552334 en Internet: <http://www.icesi.edu.co>
CALI - COLOMBIA