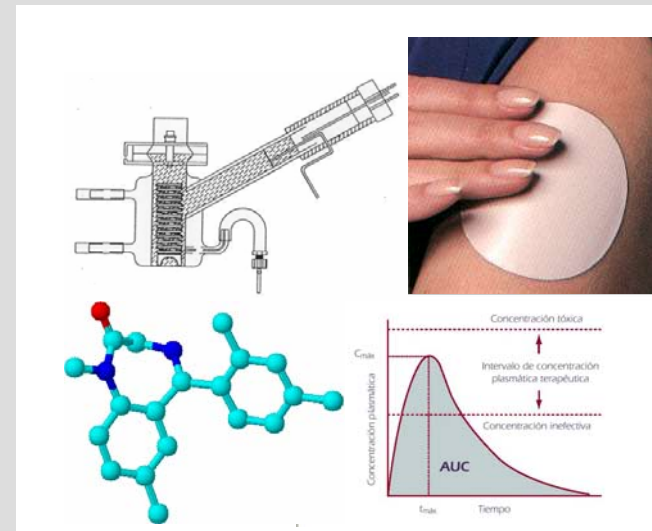




PERMEACIÓ TRANSDÈRMICA D'UNA SÈRIE DE BENZODIAZEPINES



Màrius Duran i Hortolà



Unitat de biofarmàcia i fàrmaco-cinètica
Facultat de farmàcia
Universitat de Barcelona



4. MATERIAL I MÈTODES

En aquest apartat es relacionen els materials emprats en el present treball com també la metodologia utilitzada en cadascun dels estudis realitzats:

4.1. REACTIUS, DISSOLVENTS I SOLUCIONS UTILITZADES

- Dissolució reguladora pH 7.4
Fosfat monopotàssic KH_2PO_4 M_r (136) .PA. Panreac. Ref 121509.1210
Fosfat disòdic $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ M_r (178) .PA. Panreac Ref 121677.1210
- Aigua desionitzada
- Conservant bany Maria: Nipagim/Nipasol (proporció 4/1) solució a l'1‰ .
- Fàrmacs patró i laboratoris de procedència:
Alprazolam procedent dels laboratoris UpJohn Farmacoquímica S.A. Madrid, Ref MP 284 D.
Diazepam: Núm control 1555 Laboratoris Lasa. (Ipsen-Pharma, S.A.)
Clonazepam Lot: 9707000212 procedent de Laboratoris Roche.
Lorazepam: Lot 7-D-123 procedent de Interquim S.A.
Clobazam: Codi MPC-045 Control 49700 Laboratoris Roussel
Midazolam base: Laboratoris Roche. Anàlisi 011483.
Pinazepam: N° C. 1408 Laboratoris TedecMeiji .
- Reactius per HPLC
Metanol (MetOH). PA. Panreac. Cod 221091.
- Productes per a la determinació de coeficient del repartiment
Isooctanol. (Alcohol n-otilico). Analyticals. Carlo Erba Cod. 415003
Solució reguladora fosfats pH 7.4
- Reactius per a la determinació de l'activitat superficial
Cloroform Carlo Erba per anàlisi. Code 438613.
Dipalmitoïlfosfatidilcolina (DPPC) Sigma-Aldrich. Ref. P5204.
Dimetilsulfòxid (DMSO). ACS per anàlisi. Carlo Erba Cod.445103.
D(+)-Limonè. PS. Panreac. Ref 1.63385.1610

4.2. PREPARACIÓ DE SOLUCIONS

4.2.1. Preparació solució reguladora de pH 7.4

La solució reguladora es correspon amb el fosfat SORENSEN a concentracions 1/15 M. Es prepara per a cada experiència, dissolent en 2 l d'aigua desionitzada i desgasificada els següents soluts:

- 18.17 g de KH_2PO_4
- 23.76 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Es deixa en agitació durant 15 minuts. Habitualment el pH del medi resultant és lleugerament àcid i es procedeix a l'ajust corresponent amb solució

concentrada de Na(OH). La solució resultant de pH 7.4 va ser s'utilitzada com a fase receptora i també com a solvent per a la fase donadora.

4.2.2. Preparació de la solució patró de fàrmac problema

La solució mare de cada benzodiazepina es prepara dissolent el fàrmac en metanol (MetOH). Les dilucions successives per a preparar les diferents concentracions es fan amb solució reguladora de fosfats pH 7.4. Un esquema del sistema operatiu, juntament amb la referència que s'utilitza per a la seva identificació (número indicat entre cometes, ex. "3") per a obtenir les solucions de treball, s'exposa a continuació:

Rectes Calibrat

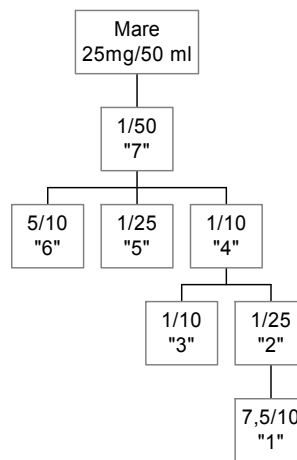


Figura 4.1 : Esquema de les dilucions realitzades per a preparar la recta de calibratge

4.2.3 Preparació de la solució d'estàndard intern

Com a estàndard intern per a l'anàlisi de cada benzodiazepina problema, s'utilitza una solució de benzodiazepina diferent. La solució de l'estàndard intern a partir de la solució mare es va preparar per dilució amb aigua desionitzada. L'esquema de preparació d'aquestes solucions d'estàndard intern és el següent :

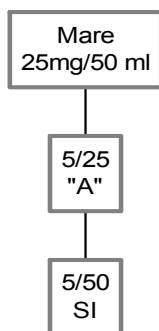


Figura 4.2 : Esquema de les dilucions realitzades per a la preparació de l'estàndard intern.

L'estàndard intern per a cadascun dels fàrmacs utilitzats es pot veure a l'apartat 4.4.1 de resolució de la metòdica per cromatografia líquida d'alta eficàcia (CLAE).

4.2.4 Preparació de la fase mòbil per CLAE

Els eluïents utilitzats pels diferents fàrmacs, per a una correcta resolució cromatogràfica, es preparaven a partir d'aigua desionitzada i MetOH filtrats (filtre 0.45µm) en les proporcions indicades en l'epígraf 4.4.1. Una vegada realitzada la barreja dels dos líquids que constitueixen la fase mòbil es desgasificava mitjançant ultrasons, durant 2-3 minuts.

4.3 APARELLS AUXILIARS / UTILLATGES.

- Balança de precisió monoplat Mettler, mod. H35 AR.
- Balança digital monoplat Mettler Toledo, mod. AT261 Delta Range^R.
- Balança granatari Mettler, mod. PJ3000.
- Pipetes i micropipetes de volum variable:
Biohit:
50-200 µl
200-1000µl
- Matrassos aforats de 100, 50, 25 i 10 mL, classe A.
- Agitador magnètic/calefactor Heidolph, mod. MR 2002.
- Bany d'ultrasons Selecta, mod. 514.
- Vòrtex/agitador de tubs Heidolph, mod. REAX 2000.
- Agitador de multitubs SBS, mod. AVV.
- pHmetre Crison "MicropH 2000"
- Centrífuga Sigma, mod. 4K10.
- Congelador Liebherr (-20°C)
- Dermatom amb acumulador Aesculap, mod. GA 630.

- Autoesterilitzador Esteribox, Inemesa.
- Equip Sation 9000 per a l'obtenció d'aigua de qualitat CLAE.
- Equip per a l'estudi de permeació transdèrmica de fàrmacs Microette, compost per:
 - Sistema d'agitació termostatitzat per cel·les de Franz
 - Sistema automatitzat de presa de mostres.
- Equip Kontron de cromatografia líquida d'alta eficàcia compostat per:
 - 2 bombes d'injecció KONTRON, mod. 420.
 - Sistema de vàlvules KONTRON, mod. LCS 870.
 - Injector automàtic KONTRON, mod. 460.
 - Detector ultraviolat de longitud d'ona variable KONTRON, mod. 432.
 - Software sistema controlador, Data system 450.
 - Columna Novapack C18 Radial-Pak 4 μ m(8*10mm) Waters.
 - Mòdul de compressió radial RCM (8*10mm) Waters.
 - Precolumna Guard-PackTM Inserts, Nova-PakTM C18 Waters.
 - Mòdul de pre-columna Waters.

4.4 METÒDICA ANALÍTICA PER CLAE

La separació cromatogràfica es deu al coeficient de repartiment del solut entre dues fases líquides immiscibles, de manera que la fase estacionària serà un líquid fixat sobre les partícules sòlides del farciment. En el cas de la cromatografia de repartiment líquid-líquid, el procés es desenvolupa en fase reversa, perquè la fase estacionària és apolar i la fase mòbil polar, de manera que les molècules polars manifesten poca afinitat pel suport hidròfob i són eluïdes amb relativa rapidesa per la fase mòbil (Snyder, 1979).

- Per a la determinació de les concentracions dels diferents fàrmacs que s'han estudiat en les mostres de treball, s'ha utilitzat la cromatografia líquida d'alta eficàcia (CLAE). El sistema de detecció s'ha fet per espectrofotometria a l'ultraviolat en la franja compresa entre 224 i 237 nm.
- Quantificació pel mètode del patró intern: La quantificació del fàrmac assajat es va realitzar per la tècnica de l'estàndard intern, establint la relació d'àrees entre l'àrea del patró i l'àrea de l'estàndard intern i correlacionant-ho amb la concentració teòrica corresponent. La justificació d'aquesta tècnica es basa a poder minimitzar els possibles errors deguts a evaporacions de les mostres i controlar les punxades del cromatògraf.

A continuació es descriuen les condicions analítiques utilitzades per a la valoració dels fàrmacs en estudi, així com les experiències realitzades per a la corresponent validació del mètode analític.



4.4.1 Resolució de la mètodica analítica per CLAE

Per a realitzar l'analítica dels fàrmacs de la sèrie de benzodiazepines estudiades s'ha utilitzat un equip cromatogràfic marca Kontron model System 400, descrit en l'apartat de material. Com a fase mòbil s'ha fet servir una barreja de metanol/aigua desionitzada amb les proporcions indicades en la taula 4.1. La fase mòbil, a un flux de 2 ml, passa a través d'una pre-columna Guard-Pak i a continuació a través d'una columna NovaPak C18 de 4 µm de mida de partícula. El volum d'injecció és de 150 µl de mostra i la detecció és per UV a la longitud d'ona expressada en la taula 4.1 donant lloc als temps de retenció T_r mitjana, que s'indiquen a la taula.

Taula 4.1: Percentatge de metanol (MetOH) a la fase mòbil (metanol/aigua), temps de retenció (T_r), longitud d'ona i estàndard intern per a cadascuna de les benzodiazepines assajades.

CONDICIONS CROMATOGRÀFIQUES				
(per a tots ells temps de resposta de 0.2 s i sensibilitat 0.05 AUFS)				
Fàrmac	T_r (min.)	Fase mòbil (% MetOH)	estàndard intern	λ (nm)
Alprazolam	3.9	65	Diazepam	224
Clobazam	2.7	70	Midazolam	232
Diazepam	6.2	65	Lorazepam	235
Pinazepam	8.9	60	Lorazepam	230
Midazolam	4.6	70	Clobazam	222
Clonazepam	2.6	70	Diazepam	237
Lorazepam	4.3	65	Diazepam	232

4.4.2 Preparació de les mostres de treball per a CLAE

Les mostres preses del compartiment receptor, corresponents a l'assaig realitzat amb cada fàrmac, obtingudes al llarg de tot l'estudi de permeació, es van analitzar per cromatografia líquida d'alta eficàcia (CLAE). Les àrees obtingudes es van interpolar en les corresponents rectes de calibratge (preparades com es detalla en la validació epígraf 4.4.3) per a obtenir les concentracions experimentals de cada mostra. Aquestes concentracions es van corregir en relació a l'efecte de dilució mecànica que es produeix en el procés de mostratge, a fi d'obtenir valors reals de la concentració de fàrmac a cada temps de presa de mostra. Els parells de valors concentració/temps defineixen el perfil de permeació transdèrmica de cada fàrmac. Mitjançant un programa adequat es va ajustar el model de permeació teòric als resultats experimentals trobats i es va obtenir la corba teòrica representativa del procés i els paràmetres de permeació que caracteritzen les propietats transdèrmiques del fàrmac.

- De cada mostra de 0.56 ml recollida en el vial (procedent de la fase receptora), pel sistema de mostratge del Microette[®] als temps

preestablerts, s'agafen 180 µl i s'afegeixen 20 µl de l'estàndard intern corresponent.

- Una vegada finalitzada l'experiència, per a determinar la concentració de la fase donadora saturada, recollim mostra directament de la solució de fàrmac situat sobre la pell (fase donadora). Centrifuguem la suspensió anterior a 4000 rpm a una temperatura màxima de 35°C durant 7 minuts. Del sobrenedant que en resulta es dissolen 50 µl en 1450 µl de solució reguladora. Es procedeix novament igual que en l'apartat anterior, es a dir, s'agafen 180 µl i s'hi afegeixen 20 µl de l'estàndard intern corresponent.
- Per a cada experiència es preparen dues rectes de calibratge del fàrmac estudiat.

4.4.3 Validació de la metòdica analítica per CLAE

Cal destacar la importància d'escollir mètodes adequats per a l'anàlisi dels compostos en general i especialment en estudis de permeació *in vitro* a través de la pell, ja que es poden identificar fonts d'error conegudes o potencials que es presenten en aquestes experiències. La qualitat final de les dades que es deriven d'una experiència és absolutament dependent de la integritat del mètode analític utilitzat (Brain 1991). És necessari emprar mètodes analítics perfectament caracteritzats i validats amb l'objectiu d'obtenir resultats fiables. Convé comprovar que el mètode és vàlid prèviament a l'anàlisi de les mostres en estudi. La validació d'un mètode analític és el procés pel qual es concreta que la metodologia utilitzada en les condicions experimentals emprades s'ajusta als requeriments per als quals el procés va ser dissenyat i per futurs estudis. S'expressa en termes analítics com selectivitat-especificitat, linealitat, exactitud i precisió, interval de treball, límit de quantificació i estabilitat (FDA, *Bioanalytical method validation*, 2001). No existeix un model únic de validació. Tampoc no existeixen acords universals a l'hora de definir certs paràmetres, i un mateix paràmetre pot ser estimat per diferents mètodes de càlcul. A més a més, els paràmetres que s'han de considerar en una validació canvien segons els requeriments legals de diferents organitzacions (CE, OMS, USP) o segons la metòdica analítica escollida (Camacho,1993). Existeix un consens internacional de les propostes fetes per la ICH que han estat acceptades per l'Agència Europea per a l'avaluació dels Productes Medicinals que estableix els criteris a seguir ICH Q2B (CPMP/ICH/281/95).

4.4.3.1 Selectivitat

És la capacitat que té un mètode analític per a mesurar exactament i específicament l'analit, sense interferències procedents de productes de degradació, impureses, matriu o altres components que puguin existir en la mostra. La selectivitat de la metòdica analítica per a mostres procedents de la fase receptora de les cel·les de Franz (i, per tant, amb contaminacions



procedents de la pell) es va comprovar en les diferents condicions cromatogràfiques.

Per comprovar la selectivitat de la metodologia analítica es van injectar per separat les següents solucions: un blanc de reactiu (solució reguladora de fosfats pH 7.4) i una solució de cadascuna de les benzodiazepines estudiades d'una concentració de 5 µg/ml. Es varen registrar els corresponents cromatogrames durant 12 minuts amb l'objectiu de detectar possibles pics cromatogràfics que puguin definir els analits. El criteri d'acceptació és que els pics que puguin interferir en el temps de retenció de l'analit han de ser menors en un 20% de la resposta del límit de quantificació.

4.4.3.2 Precisió

És el grau de dispersió entre els valors obtinguts en determinar un analit en un assaig de diversos replicats. És una mesura del grau de reproduïbilitat d'un mètode analític quan es treballa en condicions normals i s'expressa com la desviació estàndard (DE) o la desviació estàndard relativa (coeficient de variació, CV). La precisió dona idea de la distribució dels resultats entorn a la mitjana, però no dona idea de la proximitat al valor veritable. Aquest és un dels criteris més importants, junt amb l'exactitud, a tenir en compte a fi de comprovar la validesa d'una metodologia analítica. La precisió s'avalua en un mateix assaig (precisió intra-dia) i en diferents assaigs (precisió inter-dia). Es consideren com la precisió del mètode en condicions "ideals" i "reals" respectivament (Karnes, 1993). La precisió atribuïda a diferents fonts de variació té diversos noms:

- *Repetitivitat* quan el mètode es porta a terme en les mateixes condicions: per un únic analista, en un mateix laboratori, amb els mateixos instruments i reactius i en el curs d'una mateixa tanda analítica
- *Reproduïbilitat* quan es porta a terme en diferents condicions (diferent analista, dia, instrument...)
- *Robustesa* és la precisió inter-laboratoris quan es realitza en laboratoris diferents.

La precisió és el grau de concordança entre una sèrie de resultats d'una determinació analítica efectuada sobre una mostra homogènia o, expressat d'altra manera, la distribució dels valors analítics al voltant de la mitjana. Indica el grau de reproduïbilitat del mètode analític en les condicions normals de treball. Una definició molt més senzilla és la de considerar la precisió com l'estimació de la variabilitat de les mesures.

Una de les mesures de precisió és el coeficient de variació percentual que s'estima a partir de la variabilitat dels valors predits:

$$CV(\%) = \frac{D.E.}{C_{exp}} \quad \text{Equació 4.1}$$

on C_{exp} és el valor interpolat mitjà trobat pels diferents replicats de cada nivell de concentració i DE és la desviació estàndard dels interpolats de cada concentració. La precisió es calcula per a cada una de les concentracions emprades en la recta de calibratge. Tant exactitud com precisió s'han avaluat a partir dels valors de les concentracions predites per a cadascuna de les concentracions utilitzades a les mateixes rectes de calibratge utilitzades per a estudiar la linealitat. També s'expressa concretant el valor més alt i més baix trobat entre les concentracions de fàrmac emprades en la validació de la mètdica.

4.4.3.3 Exactitud

L'exactitud representa el grau de concordança entre el valor mesurat i el seu valor vertader (Castro et al., 1989). Indica la capacitat del mètode analític per a donar resultats el més propers possibles al valor vertader. Les diferències entre els valors predits (C_{exp}) i els valors teòrics o de referència (C_{teor}) constitueixen una estima absoluta de la quantificació a cada concentració, i s'ha expressat com a valor relatiu calculant l'error relatiu percentual ($E_r\%$) (mitjà de diferents determinacions):

$$E_r(\%) = \frac{(C_{exp} - C_{teor})}{C_{teor}} \cdot 100 \quad \text{Equació 4.2}$$

on C_{exp} és la concentració interpolada mitjana trobada en cada nivell de concentració i C_{teor} és la concentració de cada punt de la recta utilitzada. Per a la seva determinació s'ha calculat l'error relatiu individual i després s'ha realitzat la mitjana corresponent. S'expressa concretant el valor més alt i més baix trobat entre les concentracions de fàrmac emprades en la validació de la mètdica.

4.4.3.4 Linealitat

La linealitat és la capacitat d'un mètode analític per a obtenir respostes directament proporcionals a les concentracions de producte en un determinat àmbit o interval de concentracions. En el cas de la CLAE, la resposta prové d'un detector d'ultraviolats i, per tant, vindrà expressada en unitats d'àrea de pic cromatogràfic (mV/min). L'àmbit d'un mètode analític és l'interval entre el major i menor nivell d'analit que poden ser determinats amb certa fiabilitat.

L'àmbit de concentracions assajat pels fàrmacs de la sèrie s'ha situat entre 30 i 10.000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. L'extrem inferior es correspon amb la mínima concentració que facilita el menor pic integrable a les condicions de treball i l'extrem superior en el cas del present estudi es correspon aproximadament



a la concentració límit que es pot trobar en les condicions experimentals de treball, considerant que en les experiències de permeació transdèrmica que s'han realitzat es compleix la condició de perfecte desguàs, o condició *sink*.

Per a avaluar la linealitat del mètode s'han determinat les respostes cromatogràfiques per a diferents concentracions de fàrmacs concretades en estudis previs, analitzades per quintuplicat en jornades analítiques diferents i s'han calculat les corresponents rectes de calibratge. Cada recta de calibratge conté un mínim de 5 nivells de concentració entre 0.03 i 10 µg/ml.

Per a cadascuna de les rectes s'han determinat el coeficient de correlació, l'ordenada en l'origen, el pendent de la recta i la seva representació gràfica entre els valors de concentració experimentals i concentracions teòriques. També s'ha realitzat una anàlisi de variància dels factors de resposta normalitzats pels nivells de concentració utilitzats per a poder detectar diferències en les respostes.

4.4.3.4.1 Regressió lineal ponderada per mínims quadrats

Significació estadística del pendent: Segons Castro et al. (1989) s'ha calculat l'estadístic *t* per a calcular la significació del pendent de cada recta segons l'equació:

$$t = \frac{|b|}{s_b} \quad \text{Equació 4.3}$$

essent *b* el valor del pendent i *s_b* la seva desviació estàndard, calculable com:

$$s_b = \sqrt{\frac{S^2_{y,x}}{\sum(x - \bar{x})^2}} \quad \text{Equació 4.4}$$

on el numerador expressa el valor de la variància residual. Quan el valor calculat es superior al valor de $t_{(n-2, 0.05)}$ que pot trobar-se a les taules estadístiques, es pot concloure que el pendent és diferent de zero.

Absència d'un error sistemàtic significatiu: per a descartar l'existència d'un biaix s'ha de demostrar que el valor de l'ordenada en l'origen no és significativament diferent de zero o, el que és el mateix, que el seu interval de confiança inclou el valor (0,0). Per a cada equació de calibratge s'ha calculat l'interval de confiança ($\alpha = 0.05$) de l'ordenada en l'origen com a mesura de proporcionalitat entre la concentració i la resposta analítica.

En els procediments analítics de calibració s'utilitza de forma convencional la *regressió lineal ponderada per mínims quadrats*. En aquest model i, donat que es tracta d'un mètode cromatogràfic, es consideren les concentracions com a variable independent (x) i les àrees dels pics cromatogràfics de cada concentració com a variable dependent (y). És necessari fer aquesta distinció entre aquests dos tipus de variables donat que la regressió univariant minimitza els residuals al voltant de y , assumint que x no té error. El més adequat és assumir un error negligible associat a l'eix de les concentracions (Karnes, 1991).

En una anàlisi de regressió lineal per mínims quadrats, també s'assumeix que les variàncies són homogènies. És a dir, el mètode suposa que cada conjunt de valors de x i de y està distribuït normalment al voltant de la mitjana i que cada distribució presenta la mateixa variància (homocedasticitat). Si les variàncies no resulten homogènies (heterocedasticitat), s'hauria d'utilitzar la regressió ponderada per mínims quadrats o intentar transformar les dades de tal forma que la variància resulti homogènia (Wagner, 1983). El cas més comú de no homogeneïtat de variàncies és un augment de la variància en funció de la concentració. En aquests casos, assumir la homocedasticitat no està justificat i s'ha d'aplicar una regressió ponderada (Jonson, 1988). El factor de ponderació més adequat és l'invers de la variància en cada punt de la recta, però el quocient $1/x^2$ (essent x la concentració) és una aproximació vàlida a aquella variància (Karnes, 1991). L'efecte de la ponderació sobre la recta de calibratge suposa una certa desviació en l'exactitud dels valors predits en l'àmbit alt de la recta per a augmentar l'exactitud en els punts de l'àmbit baix.

Resumint, a fi i efecte d'uniformitzar la variabilitat al llarg de tots els punts de la recta, es realitza una ponderació de les respostes pel factor $1/C^2$ (invers de les concentracions al quadrat).

4.4.3.4.2. ANOVA: anàlisi de la variància dels factors de resposta

Una altra de les proves efectuades per a verificar la linealitat de les mètodes analítics ha estat un ANOVA d'una via dels valors de resposta normalitzats per la concentració enfront de la concentració, prèvia comprovació de les assumpcions de normalitat i homogeneïtat de variàncies. Quan les variàncies han estat diferents (diferències estadísticament significatives, $P < 0.05$) s'ha procedit a realitzar una anàlisi no paramètrica mitjançant una ANOVA de rangs (Kruskal-Wallis). Malgrat que les distribucions no han estat normals, donat que es considera l'anàlisi de la variància un test suficientment robust enfront de desviacions de la normalitat, s'han utilitzat aquests resultats.



Quan s'han detectat diferències s'ha utilitzat el test múltiple de Scheffé per a veure quins nivells són diferents entre ells.

4.4.3.5 Límits de quantificació i de detecció

S'ha calculat aquest límit com el mínim valor de la concentració emprada en la recta de calibratge que proporciona valors acceptables d'exactitud i precisió, adoptant-se a priori el criteri de considerar com a no quantificable (< LQ) els valors de concentracions inferiors a aquest valor.

El límit de quantificació (LQ) es calcula segons

$$LQ = \frac{10 * S}{P} \quad \text{Equació 4.5}$$

Essent S la desviació estàndard de la ordenada en l'origen de la recta, i P el pendent de la recta.

El límit de detecció (DL) es calcula segons

$$DL = \frac{3.3 * S}{P} \quad \text{Equació 4.6}$$

Segons ICH Q2B, *Validation of analytical Procedures: methodology*. El consens internacional (FDA, Bioanalytical method 2001) accepta en un mètode bioanalític una exactitud $\pm 20\%$ (ER%) i un valor inferior o igual al 20% (CV) per a la precisió del límit de quantificació.

4.5 DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES FÍSICO-QUÍMICS

4.5.1 Solubilitat a la solució reguladora de pH 7.4

La solubilitat de les benzodiazepines en solució reguladora a pH 7.4 es determina a fi de conèixer la concentració a saturació dels fàrmacs en la fase donadora i treballar en els estudis de permeació amb un model de dosis infinites. Per a determinar-la es prepara una suspensió, a una temperatura màxima de 35°C. S'agita durant 24 h i es centrifuga durant 7 min a 4.000 rpm. Del sobrenedant resultant es prenen 50 µl que són immediatament dissolts en 1450 µl de solució reguladora pH 7.4, seguint a continuació com s'ha descrit en l'apartat 4.4.2 de preparació de les mostres de treball.

4.5.2 Determinació del coeficient de repartiment

El coeficient de repartiment (P) és una constant físico-química característica dels fàrmacs, indicador de la seva lipofília. Es defineix com la relació entre la concentració de fàrmac en un solvent orgànic (fase lipòfila) i la concentració del principi actiu en un solvent aquós (fase aquosa). El càlcul del coeficient de repartiment es basa en considerar que les molècules de solut en la fase aquosa estan en la seva totalitat en forma no ionitzada o que la fracció ionitzada i no ionitzada es mantenen constants independentment del pH de la fase aquosa. Per al càlcul del coeficient de repartiment s'utilitza la següent equació:

$$P = \frac{[Fàrmac]_{org}}{[Fàrmac]_{aq}} \quad \text{Equació 4.7}$$

on:

- $[Fàrmac]_{org}$ és la concentració de la benzodiazepina considerada en la fase orgànica, i
- $[Fàrmac]_{aq}$ és la concentració de la benzodiazepina considerada en la fase aquosa.

En els estudis de permeació transdèrmica, el coeficient de repartiment de fàrmac, entre el vehicle que el conté i els lípids de l'estrat corni, és un dels factors que modulen el pas de fàrmacs a través de la pell (Poulin, 2001; Grafourian, 2001).

Perquè el càlcul del coeficient de repartiment sigui representatiu com a paràmetre que influeix en la permeació transdèrmica dels fàrmacs o com a descriptor a nivell predictiu del pas dels principis actius a través de la pell, s'han considerat diferents solvents orgànics. Treballs desenvolupats en aquest àmbit han proposat com a solvents l'octanol (Flynn, 1990; Potts, 1992), l'heptà (El Tayar, 1991), la dimiristoilfosfatidilcolina (Vaes, 1998), el propilenglicol dipelargonat (Leahy, 1991). Els resultats experimentals publicats en el transcurs d'aquests darrers anys han posat de manifest que l'octanol pot ser considerat com el vehicle més representatiu de l'estructura lipídica de l'estrat corni, essent el coeficient de repartiment dels fàrmacs entre octanol i aigua el valor que presenta major fiabilitat com a paràmetre representatiu del pas de fàrmacs a través de la pell, segurament perquè l'octanol és un solvent donador i acceptor de ponts d'hidrogen (Earll, 1999 ; Cronin, 1999).

El coeficient de repartiment de les benzodiazepines estudiades en aquesta Memòria s'ha calculat emprant com a fase orgànica octanol i com a fase aquosa solució reguladora de fosfats de pH 7.4, ja que en aquestes condicions és més representatiu de l'equilibri entre la solució donadora i l'estrat corni (Earll, 1999). En aquestes condicions, el paràmetre físico-químic que s'estima és l'anomenat coeficient de distribució (D), ja que en el medi aquós utilitzat les benzodiazepines poden presentar una fracció de fàrmac ionitzada i una altra no ionitzada, no acomplint-se les condicions pròpies de la definició de coeficient de repartiment de substàncies exposades anteriorment. El coeficient de distribució (D) és un paràmetre característic de la lipofòbia dels fàrmacs, però és variable en funció del pH de la fase aquosa, en contraposició al coeficient de repartiment (P), que és un paràmetre físico-químic constant i característic de cada fàrmac.

En conseqüència, el valor experimental determinat, corresponent a l'equilibri de fàrmac existent, entre la fase lipòfila i la hidròfila, s'ha calculat aplicant la següent equació:

$$D = \frac{[BZD]_{oct}}{[BZD]_{aq} + [BZD^+]_{aq}} \quad \text{Equació 4.8}$$



on :

- $[BZD]_{oct}$ és la concentració de fàrmac en la fase orgànica, en el nostre cas la benzodiazepina considerada, i
- $[BZD]_{aq}$ és la concentració de fàrmac, sense ionitzar, en la fase aquosa, en el nostre cas la benzodiazepina considerada,
- $[BZD^+]_{aq}$ és la concentració de fàrmac, ionitzat, en la fase aquosa, en el nostre cas la benzodiazepina considerada.

El coeficient de repartiment (P) es calcula a partir del coeficient de distribució (D), fent una estimació del valor d'aquest paràmetre quan es manté constant i independentment del valor del pH en el medi aquós. Les variacions del valor del coeficient de distribució depenen del valor del pK_a de cada substància, del pH del medi aquós utilitzat i que la substància considerada es comporti com a àcid o com a base. Un exemple representatiu es pot veure en la Figura 4.3 per a una substància de caràcter àcid i una altra de caràcter bàsic.

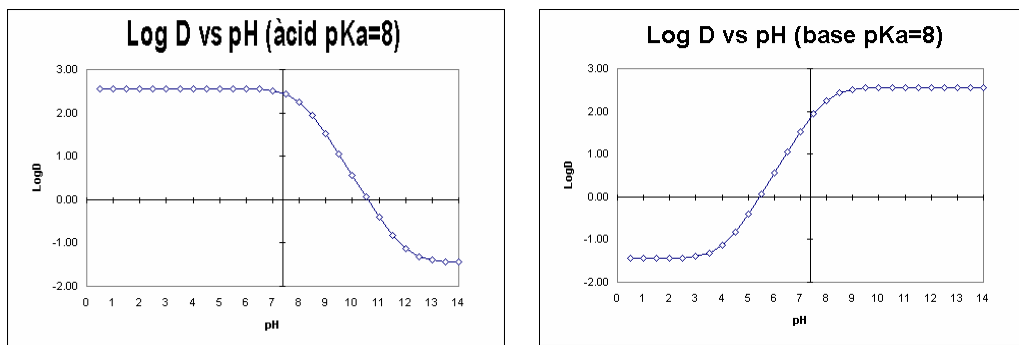


Figura 4.3 : Representació gràfica de la variació de log D per a substàncies de caràcter àcid i bàsic en funció del pH del medi.

A partir del valor del coeficient de distribució (D) s'estima el valor del coeficient de repartiment (P) de cadascuna de les benzodiazepines estudiades, en funció del seu caràcter àcid o bàsic, per aplicació directa de les següents equacions:

$$\text{Log}D_{(pH)} = \log P - \log(1 + 10^{(pH - pK_a)}) \quad \text{per àcids} \quad \text{Equació 4.9}$$

$$\text{Log}D_{(pH)} = \log P - \log(1 + 10^{(pK_a - pH)}) \quad \text{per bases} \quad \text{Equació 4.10}$$

És a dir, el log D considera la fracció ionitzada i no ionitzada de la substància.

D'acord amb l'exposat per al càlcul de log D, s'ha de tenir en compte el grau d'ionització α de la substància en el mitjà de treball. Aquest grau d'ionització, α , es pot demostrar (Dearden, 1988) que equival al pH de 7.4:

- Per a àcids febles

$$\alpha = \frac{1}{(1 + 10^{pK_a - 7.4})} \quad \text{Equació 4.11}$$

- Per a bases febles

$$\alpha = \frac{1}{(1 + 10^{7.4 - pK_a})} \quad \text{Equació 4.12}$$

Si tenim un volum de solució octanòlica que conté S mols/litre de benzodiazepina, és a dir,

$$S = \frac{C_{oct}}{MW} \quad \text{Equació 4.13}$$

C_{oct} correspon a la solubilitat de la benzodiazepina en octanol expressada en g/l i MW és el pes molecular expressat en g/mol. Afegim a la solució octanòlica anterior un volum idèntic de solució reguladora de fosfats de pH 7.4 i extraiem la fase aquosa. En l'equilibri s'ha de complir que el coeficient de distribució de la benzodiazepina equival a:

$$D = \frac{[BZD]_{oct}}{[BZD]_{aq} + [BZD^+]_{aq}} \quad \text{Equació 4.14}$$

En aquesta situació, els S mols inicials/litre seran la suma de les concentracions de les espècies següents:

$$S = [BZD]_{oct} + [BZD]_{aq} + [BZD^+]_{aq} \quad \text{Equació 4.15}$$

D'aquesta equació, efectuant un canvi de variable, es pot concloure que :

$$[BZD]_{oct} = S - [BZD]_{aq} - [BZD^+]_{aq} = S - x \quad \text{Equació 4.16}$$

essent x

$$[BZD]_{aq} + [BZD^+]_{aq} = x \quad \text{Equació 4.17}$$

i substituint,

$$D = \frac{S - [BZD]_{aq} - [BZD^+]_{aq}}{[BZD]_{aq} + [BZD^+]_{aq}} = \frac{S - x}{x} \quad \text{Equació 4.18}$$

d'on es pot calcular D a partir de x (experimentalment), i aïllant la x, queda:

$$x = [BZD]_{aq} + [BZD^+]_{aq} = \frac{S}{(1 + D)} \quad \text{Equació 4.19}$$

Igualtat que ens permet calcular la concentració total de benzodiazepina existent en la fase reguladora de fosfats de pH 7.4 en funció de la solubilitat en fase octanòlica i del coeficient de distribució. A partir de l'equació 4.14 es pot calcular la concentració de benzodiazepina en la fase octanòlica, mitjançant la següent expressió :

$$[BZD]_{oct} = D * x \quad \text{Equació 4.20}$$



4.5.2.1 Coeficient de distribució n-octanol / fosfats pH 7.4

S'ha calculat el valor del coeficient de repartiment de cada benzodiazepina i el resultat obtingut s'ha utilitzat per a caracteritzar el pas de les benzodiazepines a través de la pell i també per la predicció del seu coeficient de distribució.

Donat que bibliogràficament es coneix que les diferents benzodiazepines presenten un elevat repartiment vers la fase octanòlica, i donada la seva baixa solubilitat en aigua, la determinació experimental del coeficient de repartiment s'ha realitzat a partir d'una solució n-octanòlica de concentració coneguda de fàrmac, determinant analíticament la concentració de benzodiazepina en la fase aquosa una vegada assolit l'equilibri de repartiment entre les fases (Wong, 1988).

- **Saturació de fases:** Prèviament a l'inici de l'experiència, s'han combinat 75 ml de n-octanol i 75 ml de solució reguladora de pH 7.4 en un ampolla de vidre de tap hermètic en agitació (agitador magnètic) durant 24 hores, per a saturar cada fase en el solvent immiscible.
- **Preparació de les mostres:** A continuació, i per a cada fàrmac, s'han preparat un mínim de tres replicats per a la determinació del coeficient de distribució. Per això, s'han pesat aproximadament 20 mg de cada benzodiazepina, i s'han dissolt en 4 ml d'octanol saturat en solució reguladora. Per a garantir l'absoluta dissolució de la benzodiazepina en la fase octanòlica es van posar a l'ultrasons durant 10 minuts. Les quantitats dissoltes per a cada fàrmac s'expressen en la taula 4.2.

Taula 4.2 : Quantitats de fàrmac dissoltes en 4 ml d'octanol (saturat de solució reguladora pH 7.4)	
Fàrmac	Quantitat (mg)
Alprazolam	20.4
Pinazepam	20
Clonazepam	20
Midazolam	20.2
Diazepam	24.9
Clobazam	18.0
Lorazepam	21.6

- **Disseny experimental:** En cinc tubs cònics s'han addicionat 500 µl de la solució n-octanòlica (saturada en solució amortidora) de la benzodiazepina i 500 µl de la solució reguladora de fosfats saturada

de n-octanol. Després de tapar els tubs s'han sotmès a agitació durant un minut en vòrtex i, a continuació, durant 24 hores en un agitador a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps s'ha centrifugat el contingut (3000 rpm / 5 min / 35°C) per a separar les dues fases (ha quedat la fase aquosa a la part inferior).

- **Determinació per CLAE:** Per a la quantificació de cada benzodiazepina se n'han addicionat 180 µl (fase inferior) a cadascun dels tubs cònics, en una sèrie de microvials amb 20 µl d'una solució de cada estàndard intern analític (segons s'ha descrit en l'apartat 4.4.3) i s'han injectat 150 µl al cromatògraf.

La concentració existent en la fase octanòlica es va determinar per diferència entre la concentració inicial existent en la fase orgànica i la final en la fase aquosa. Per tant, el coeficient de distribució (D) es va calcular a partir de la següent equació (Wong, 1988; Buri 1991):

$$D = \frac{C_i - C_f}{C_f} * \frac{V_o}{V_A} = \frac{C_i - C_f}{C_f} \quad \text{Equació 4.21}$$

- C_i representa la concentració de fàrmac existent en la fase octanòlica a l'inici (abans d'assolir l'equilibri).
- C_f representa la concentració de fàrmac existent en la fase reguladora pH 7.4 al final de l'experiència. Aquest valor és numèricament equivalent a la disminució de la concentració de fàrmac en la fase octanòlica (una vegada assolit l'equilibri).
- V_o és el volum de la fase orgànica i V_A és el volum de la fase aquosa; ambdós es consideren constants durant el procés d'equilibri.

El coeficient de distribució resultant utilitzat ha estat la mitjana dels replicats realitzats per a cada fàrmac. Segons s'ha exposat en l'apartat 4.5.2, conegut el coeficient de distribució de la benzodiazepina se'n determina el coeficient de repartiment.

La importància d'aquest paràmetre (coeficient de repartiment) en els estudis de permeació transdèrmica pot reafirmar-se, per exemple, pels treballs publicats que relacionen el coeficient de repartiment dels fàrmacs amb la seva constant de permeabilitat transdèrmica. En aquest sentit està descrit en la bibliografia (Flynn, 1990) que a partir d'aquest valor es pot predir el valor del coeficient de permeabilitat fent ús, per exemple, de l'equació publicada per Potts&Guy (1992). Vegeu apartat 4.5.2.2.

4.5.2.2 Coeficient de repartiment teòric

El coeficient de repartiment teòric s'ha determinat de dues maneres :

- Mitjançant el programa KOWWIN v1.66 (USEPA 2000). El valor del coeficient de repartiment s'estableix a partir de l'estructura química dels compostos considerats (Meilan, 1995).



- A partir de Scifinder Scholar 2001, programa que també determina el coeficient de repartiment a partir de l'estructura química dels compostos considerats.

Amb els valors teòrics de $\log P$ es procedirà a establir potencials correlacions amb els valors experimentals.

4.6 ESTUDIS DE PERMEACIÓ TRANSDÈRMICA

La permeació d'un fàrmac a través de la pell és un procés de difusió passiva a favor d'un gradient de concentració concatenat entre la formulació, l'estrat corni i la capa dèrmica més interna on es troben situats els capil·lars sanguinis. L'estrat corni, que és la zona anatòmica limitant de l'absorció dels fàrmacs, constitueix una barrera física amb un alt grau d'ordenació que, en realitat, és composta per cèl·lules mortes. Per aquest motiu, les seves propietats de permeació no es veuen alterades en extraure la mostra de pell del donant (Bronaugh, 1982). Aquest fet explica que els estudis de permeació realitzats *in vitro* amb pell humana siguin molt representatius respecte als realitzats *in vivo* en voluntaris sans, encara que en aquest darrer cas els capil·lars sanguinis garantitzen que el fàrmac sigui ràpidament retirat de la dermis. Bronaugh i Wester han posat de manifest una bona correlació entre les dades *in vitro* (Bronaugh, 1989) i *in vivo* (Wester, 1992). Ja l'any 1993 ECETOC va publicar una monografia sobre permeació de fàrmacs; es tracta d'un recull bibliogràfic en què es posa de manifest que els resultats obtinguts per mètodes *in vitro* poden ser predictius de la permeació que es produiria *in vivo*. El desembre del 2000 la OECD va publicar un primer esborrany on s'expliciten l'estat de la qüestió, els consells, recomanacions i processos a seguir en el cas d'estudis de permeació transdèrmica (OECD, 2000).

En la present Memòria s'han realitzat estudis *in vitro* amb pell humana, procedent d'excedents de cirurgia reparadora, seguint les recomanacions generals descrites en la monografia europea mencionada anteriorment (ECETOC, 1993) i les d'un consens internacional sorgides en una reunió prèvia de la FDA i AAPS (Skelly, 1987). En aquestes experiències s'han emprat solucions amortidores de fosfats, tant en la fase donadora com en la receptora (condició de simetria). Com s'exposa més endavant, les solucions de tots els fàrmacs es van ajustar a pH 7.4 (el recomanat), que permet mantenir tots els fàrmacs en solució a saturació al mateix pH. Aquesta situació confereix al fàrmac la seva màxima activitat termodinàmica dins el sistema.

La metodologia general seguida en els assaigs de permeació *in vitro* i que es detalla a continuació consisteix, en línies generals, col·locar una peça de pell humana, prèviament preparada (**membrana**), entre els dos compartiments d'una **cel·la de difusió**, de forma que la pell es mantingui tensa. S'inicia l'experiència situant en un dels compartiments de la cel·la (compartiment donador) un determinat volum d'una solució saturada del compost en estudi en contacte amb l'estrat corni (**fase donadora**). Muntat el sistema, en l'altre compartiment (compartiment receptor) es quantifica l'aparició de nivells de fàrmac a l'altre costat de la pell (**fase receptora**).

A continuació es descriuen cadascun de aquests elements, el procediment a seguir, la mètodica analítica emprada i el tractament de les dades experimentals per a determinar el perfil de permeació transdèrmica de les benzodiazepines estudiades.

4.6.1 Cel·la de difusió

El model de cel·la desenvolupat per Franz consta d'un compartiment superior (compartiment donador) i una cambra inferior que constitueix el cos de la cel·la (compartiment receptor), entre els quals es situa la membrana. Es fixen ambdues peces amb unes pinces, de forma que es garanteix l'estanqueïtat del sistema (Figura 4.4). A l'interior del cos de la cel·la es situa un agitador magnètic, de forma que s'acceleri el procés de homogeneïtzació del contingut de la fase receptora. Una camisa calefactors permet controlar la temperatura de tota la cel·la. En les nostres experiències s'han utilitzat cel·les de Franz de vidre ambre, model FDC-400 (Hanson Research, S.A., Somerville), en les quals s'ha perfeccionat el disseny de les cel·les originals, allargant la zona d'agitació i cobrint amb la camisa calefactors tant la zona d'agitació com la zona de mostratge, tal com es mostra en la Figura 4.4.

El cos de la cel·la te una capacitat teòrica aproximada de 13 ml i un diàmetre de l'orifici intern de 17.5 mm, la qual cosa suposa una superfície teòrica útil per a la difusió del fàrmac de 2.54 cm². Donat que aquests paràmetres condicionen de forma molt important els càlculs per a determinar la quantitat total permeada de fàrmac, tant el volum com el diàmetre es van mesurar individualment per a cada cel·la. A continuació, en la Figura 4.4 es pot veure la imatge d'una cel·la.

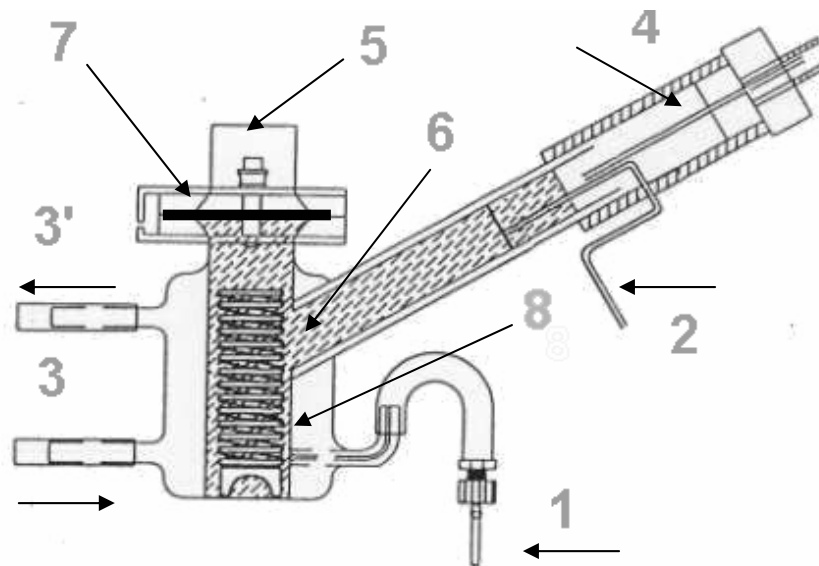


Figura 4.4. Esquema d'una cel·la de Franz utilitzada en els estudis de permeació in vitro, i que forma part d'un equip de mostratge automàtic (Microette®).



El components de la cel·la són els següents :

1. Tubuladura lateral d'entrada de fase receptora fresca (solució reguladora de pH 7.4).
2. Sifó de sobreiximent (mantenidor del nivell).
3. Entrada líquid camisa calefactora .
- 3'. Sortida líquid camisa calefactora.
4. Tubuladura de presa de mostra de la fase receptora.
5. Ubicació fase donadora (suspensió saturada de benzodiazepina).
6. Ubicació fase receptora (solució reguladora pH 7.4).
7. Membrana de difusió pell humana.
8. Molla helicoïdal, per a mantenir l'homogeneïtzació del sistema durant l'experiència.

- **Mesurament del diàmetre intern (superfície de difusió)**

Les cel·les es van numerar de l'1 al 6 segons la posició que ocupen en l'equip de mostratge (Microette[®]) amb què es realitza l'experiència i es va mesurar el diàmetre intern de la zona de difusió amb un calibratge digital. Després de mesurar diverses vegades el diàmetre de cada cel·la, es va calcular la superfície real de difusió com un valor mitjà de totes les mesures realitzades. Aquest valor és el que s'utilitza posteriorment per a normalitzar la difusió de fàrmacs a través de la pell.

- **Mesurament del volum real**

El volum real del compartiment receptor de cada cel·la de difusió es va determinar per diferència de pesada entre la cel·la, buida i plena, d'aigua destil·lada. Es pesa la cel·la buida en les mateixes condicions de l'experiència, és a dir, amb l'agitador magnètic i l'espiral en el seu interior, a més a més d'una làmina impermeable a mode de membrana entre les fases donadora i receptora (Figura 4.4). Es tapa la tubuladura capil·lar inferior per a evitar la pèrdua de líquid. Després de pesar la cel·la condicionada i buida, s'omple amb aigua destil·lada (a temperatura ambient) fins a l'enrasament de la tubuladura lateral i es torna a pesar. Asumint densitat 1 per a l'aigua destil·lada, es calcula el volum del compartiment receptor de cadascuna de les cel·les emprades per diferència de pes. Aquest valor és el que s'utilitzarà per a calcular les quantitats permeades.

4.6.2 La membrana de difusió: pell humana

En aquest estudi, com a membrana de difusió s'ha emprat pell humana de la zona abdominal, tallada en un gruix de 0.4 mm mitjançant un dermatòmetre elèctric (Aesculap S.A., Alemanya) d'acord amb les recomanacions dels organismes oficials FDA i AAPS (Skelly, 1987), a fi que els resultats obtinguts siguin el més representatius possibles respecte a la potencial utilització d'aquests fàrmacs en sistemes d'administració transdèrmica en humans. L'esmentada normativa indica que el gruix de la pell ha de ser menor de 0.5 mm. Per aquest motiu, en el present estudi s'ha emprat un gruix de pell de 0.4 mm. Tenint en compte, a més a més, el gruix de l'estrat corni (15-20 µm),

l'epidermis (50-150 μm) i la dermis (0.5-2.0 mm), el gruix de pell emprat en el present treball permet posar de manifest l'efecte tanca que aquestes estructures exerceixen sobre la penetració transdèrmica dels fàrmacs.

- **Origen de la pell**

La pell humana procedeix d'excedents de cirurgia reparadora de la zona abdominal (lipectomies) realitzada a dones d'edat mitjana 42 anys (Figura 4.5). Per a la utilització de la pell en treballs d'experimentació es va obtenir la corresponent autorització per part de la Direcció de la Clínica que subministrava les mostres. En tots els casos s'obté la pell humana sencera, que va unida al pannicle adipós o capa lipídica que es troba per sota de la dermis.

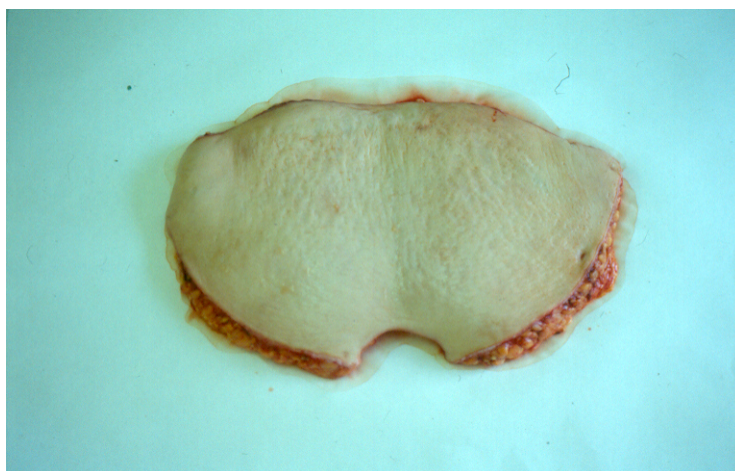


Figura 4.5: Tros de pell humana abans de ser tractada.

- **Conservació i preparació de la pell:**

Posteriorment a la intervenció quirúrgica i abans de les 8 hores següents, es va transportar el teixit dèrmic banyat en sèrum fisiològic en una nevera portàtil. En el nostre laboratori es van seccionar tant pell com pannicle en tires d'aproximadament 4 cm, i es van disposar en plaques de vidre protegides amb paper plàstic per a aplanar la pell. Seguidament es van retolar i congelar a -20°C . Transcorreguts uns quants dies, es va tallar la pell amb el dermatòmetre elèctric al gruix especificat, separant-ho del pannicle adipós, que va ser eliminat com a desfeta biològica. Les tires resultants de pell tallada al gruix corresponent es van dividir en peces iguals, d'una mida adequada per al diàmetre de les cel·les de difusió. Finalment, es van conservar a -20°C , convenientment retolades i identificades, fins a l'inici de l'experiència (Figura 4.6). El període màxim de conservació de la pell congelada, fins a ser utilitzada en l'experiència, va ser inferior a un any. Barry *et al.* van demostrar que la permeabilitat de la pell humana en aigua tritiada no es veia afectada per efecte de la congelació i descongelació fins i tot després d'estar congelada 466 dies (Harrison, 1984).



Per a la manipulació de la pell humana es van tenir en compte les precaucions de seguretat habituals quan es treballa amb material biològic exposat a agents patògens. El material emprat (dermàtom, bisturí, plaques de vidre, guants de làtex, etc.) era o bé d'un sol ús o es va desinfectar amb sabó germicida (Instrunet®) i alcohol de 96°.

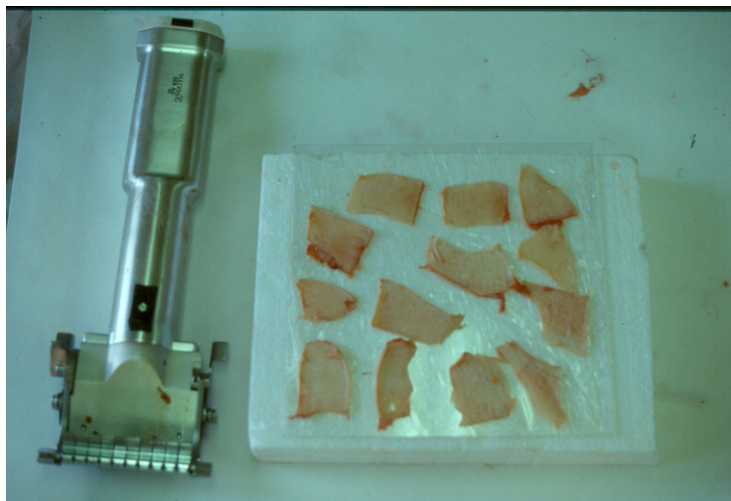


Figura 4.6: Dermàtom AESCULAP i pell tallada al gruix de 0.4 mm

- Hidratació de la pell

Les peces individuals de pell s'hidraten amb sèrum fisiològic a 4°C, durant aproximadament 24 h. Aquest procés permet simular les condicions que es tindrien *in vivo* en administrar la medicació en forma de pegat oclusiu. En aquestes condicions, la zona d'aplicació sobre la pell està coberta, i impedita l'habitual pèrdua d'aigua transepidèrmica. Per tant, la hidratació de la pell en la zona d'aplicació estaria augmentada i aquest fet sembla millorar la permeació de substàncies. Malgrat tot, encara no està clarificat el mecanisme pel qual té lloc aquest augment de la penetració de substàncies a través de la pell per acció oclusiva (Mak, 1991).

- Condicionament

Passades les 24 hores referides en l'apartat anterior es munten les membranes preparades (les làmines de pell humana) sobre les cel·les de Franz i es procedeix al funcionament del Microette^R.

4.6.3 Preparació de la fase donadora

Es va emprar, tant en la fase donadora com en la receptora, la mateixa solució reguladora de fosfats a pH 7.4 (condicions simètriques). És molt important mantenir el mateix pH en la solució donadora i receptora, perquè és un factor que condiciona en gran mesura el flux de pas d'una substància a través de la pell, sobretot per a compostos poc ionitzables i molt lipòfils (Kou, 1993).

Per a garantir que la solució donadora sigui una solució saturada es pesen les quantitats indicades en la taula 4.3 següent (excedeixen amb escreix la solubilitat) i s'addicionen a 10 ml de solució reguladora de pH 7.4 :

Taula 4.3: Quantitats pesades de cada benzodiazepina per 10 ml de solució reguladora de fosfats de pH 7.4	
Fàrmac	Quantitat (mg)
Alprazolam	80
Clobazam	52
Clonazepam	31
Diazepam	59
Lorazepam	60
Midazolam	38
Pinazepam	64

Es deixa la suspensió en agitació durant 24 h. Passat aquest temps es va posar 1 ml de suspensió sobre la pell muntada a la cel·la de Franz per a iniciar la experiència.

4.6.4 Preparació de la fase receptora

La fase receptora es correspon a una solució reguladora de pH 7.4 i es prepara tal com s'exposa en l'apartat 4.2.1.

Per a garantir que tot el fàrmac que travessa la membrana queda dissolt en la fase receptora es necessari no assolir en el medi una concentració superior al 20% de la concentració a saturació (condicions "sink") al llarg de tota l'experiència, suposant que tot el fàrmac situat en el compartiment donador passés a través de la membrana. Aquestes condicions permeten reproduir, les condicions *in vivo*. En les experiències realitzades s'aconsegueixen aquestes condicions desguàs com a conseqüència que, d'una banda, tots els productes de la sèrie presenten un caràcter relativament lipòfil i de l'altra que es va treballar amb volums de fase receptora relativament grans (13 ml). En qualsevol cas en el supòsit que arribés a permear tota la quantitat de fàrmac situat al compartiment donador, en tots els casos, al llarg de la experiència, es complirien les condicions *sink*. Es van prendre mostres de la fase receptora d'aproximadament 0.5 ml als temps establerts reposant de forma automatitzada un volum igual de solució de pH 7.4. Els nivells trobats a cada temps, corregits per les dilucions realitzades a cada presa de mostra, defineixen el perfil de permeació del fàrmac.



4.6.5 Sistema de mostratge automatitzat de les cel·les de difusió (Microette®)

La cinètica de permeació *in vitro* dels fàrmacs assajats en el present treball es va estudiar a partir del mostratge de la fase receptora de les cel·les de Franz. Aquesta presa de mostres es va realitzar de forma automàtica i simultàniament en 6 cel·les de difusió, mitjançant l'equip Microette® (Hanson Research Corp. USA). Aquest equip ha estat posat a punt i validat en el nostre laboratori; els detalls es recullen en un treball anterior al que presentem (Duran, 1994). En aquest epígraf es resumeix el seu funcionament, destacant la correcció teòrica que és necessari realitzar a partir de les concentracions experimentals presents en cada mostra. La correcció que es porta a terme té en compte l'efecte de la dilució de les successives mostres.

4.6.5.1 Descripció de l'equip de mostratge automàtic (Microette®)

Microette® és un equip automatitzat de mostratge que consta de sis cel·les de difusió; permet programar i automatitzar la presa de mostres amb reposició immediata de la fase receptora i mantenir tot el sistema a una temperatura predeterminada. Les parts principals es presenten en forma esquemàtica en la Figura 4.7.

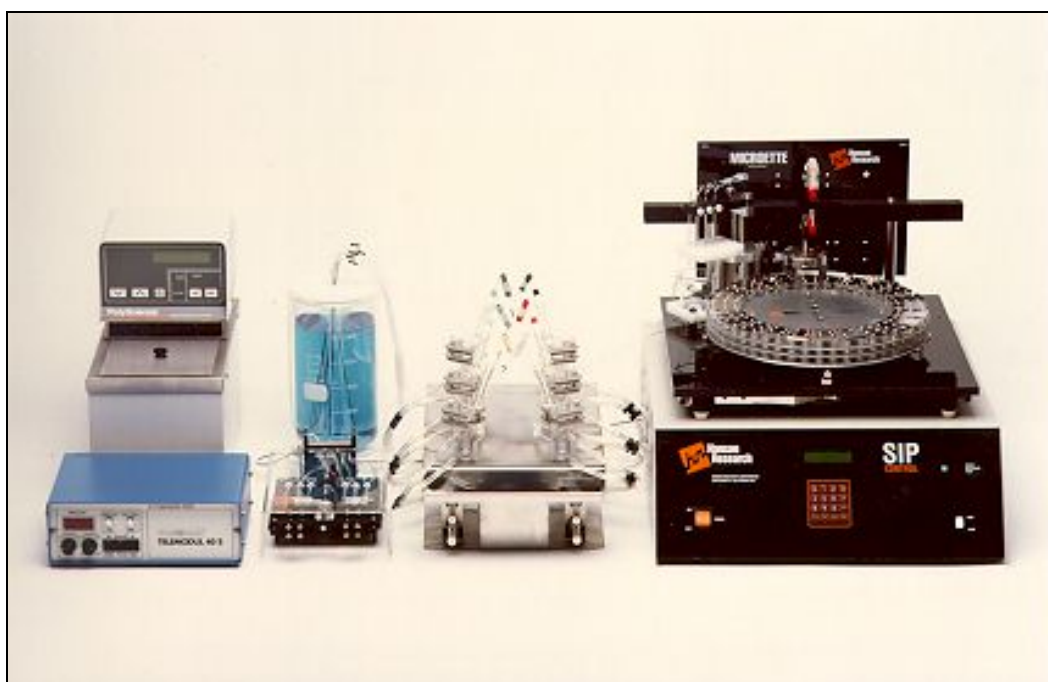


Figura 4.7. Fotografia de les parts més característiques de l'equip automatitzat de presa de mostres (Microette®) que incorpora 6 cel·les de Franz en paral·lel.

Resumint, els components més característics de l'aparell són els següents:

- Cel·la de difusió. Hi ha un **suport per a un sistema de 6 cel·les de**

Franz que permet l'agitació magnètica controlada (450 rpm). Està connectat a un **bany termostàtic**, amb recirculació de líquid, que manté les cel·les a temperatura constant (32 °C) per mitjà d'una camisa calefactora que les envolta.

- Sistema de presa de mostres. Consisteix en una **bomba de buit-pressió** que permet prendre la mostra de la fase receptora de la cel·la i dipositar-la al vial de cromatografia. És necessari fer una validació prèvia a per determinar el temps que ha d'actuar el buit per a aconseguir el volum desitjat. Aquests vials estan disposats en un tambor giratori, amb capacitat per a 100 unitats.
- Sistema de reposició. A partir d'un dipòsit sotmès a temperatura controlada que conté la fase receptora i mitjançant un **sistema de xeringues** que bombegen el líquid del dipòsit vers les cel·les es porta a terme la reposició en el mateix moment que és presa la mostra.
- Sistema de sobreixidor. Juntament amb el sistema de reposició, el sobreixidor garanteix que el volum de líquid a l'interior de les cel·les es manté constant al llarg de les successives preses de mostra. Consisteix en un sistema de conduccions per les quals es realitza el buit i es retira de les cel·les la diferència entre el volum de reposició i el volum de mostra pres. Aquest excedent es diposita en un **flascó col·lector**.
- **Controlador del sistema**. En el controlador del sistema es programen els volums i temps de presa de mostres (bomba buit-pressió), així com els volums de reposició (sistema de bombeig amb xeringues).

4.6.5.2 Ajustament del sistema Microette®

Previ al funcionament en rutina d'aquest equip de mostratge, és necessari posar a punt el mètode per a estudiar la permeació transdèrmica de les benzodiazepines i determinar una sèrie de paràmetres. D'una banda, es determina experimentalment el volum de cada una de les cel·les de difusió per a poder calcular, a cada experiència, les quantitats de fàrmac permeades. Per altra, s'ajusten la dosificació i el factor de dilució de l'aparell per a adequar-los a les condicions experimentals establertes en l'estudi de permeació de les benzodiazepines.

○ **Ajust del volum de mostra**

Donat que el mecanisme de mostratge consisteix a realitzar el buit sobre la solució receptora durant el temps necessari per què dosifiqui el volum desitjat, és necessari ajustar aquest temps per a que dosifiqui aproximadament 0.56 ml a cada mostra. El control del volum de mostra es realitza per pesada del vial abans i després de la dosificació de l'aparell, seguint un protocol de mostratge preestablert. Després de repetides dosificacions, es determina el volum de mostratge mitjà i la variabilitat global (CV%) del sistema al llarg de tota l'experiència (Duran, 1994).



○ **Temps de mostratge i programa definitiu**

La presa de mostres de la fase receptora es va realitzar en els següents temps:

0 (immediatament després d'addicionar la fase donadora), **2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h** després de situar la solució saturada de fàrmac a la cara externa de la pell (estrat corni). I una mostra **F** després d'haver finalitzat l'experiència i just abans de desmuntar l'aparell per a procedir a netejar-lo.

La resta de paràmetres necessaris per a definir el programa de biblioteca de Microette® (Nº 3) que va servir per al mostratge automàtic de les cel·les de Franz, és el següent:

PROTOCOL Núm 3.:

"Fill Time" (temps d'omplida del vial): 10 s

"Sample volume" (volum de reposició): 0.7 ml

Volum dosificat mitjà: 0.56 ml

Presa de mostres: les 2 primeres mostres a intervals de 2 h i les mostres addicionals a intervals de 4 h

Es va utilitzar aquest protocol de mostratge per a tots els fàrmacs de la sèrie estudiada.

4.6.5.3 Funcionament del sistema Microette®

El funcionament de rutina d'aquest equip de mostratge consta d'una fase prèvia de condicionament del sistema i una fase posterior en què s'inicia l'estudi de permeació; és a dir, des de l'addició de la formulació problema a la fase donadora. El desenvolupament del procés pot esquematitzar-se d'acord amb les següents etapes:

- i) Connectar la camisa calefactors de les cel·les de difusió (buides) a les conduccions del circuit termostàtic per a temperar el sistema.
- ii) Abocar acuradament el líquid que constitueix la fase receptora, prèviament sotmès a ultrasons durant 10 min, per les parets del dipòsit que abasteix el sistema. És molt important garantir l'absència d'aire, no solament en el líquid d'aquest dipòsit sinó al llarg de tot el sistema de reposició. Si no es feia així, es formarien bombolles d'aire en la membrana de difusió, per la cara de la dermis, limitant el flux de fàrmac a través de la pell.
- iii) Purgar tot el circuit de reposició amb el líquid del dipòsit mitjançant el sistema de xeringues i, seguidament, connectar les cel·les de Franz pel capil·lar inferior. Comprovar que les cel·les compten amb l'agitador magnètic i l'espiral d'agitació en el seu interior.
- iv) Omplir les cel·les amb solució receptora fins al màxim de la seva capacitat, mitjançant bombeig amb el sistema de xeringues.
- v) Situar les membranes (pell humana) sobre les cel·les de forma que quedin centrades i completament llises. Col·locar la tapa del compartiment donador i subjectar-la mitjançant pinces metàl·liques,

- assegurant-se que la membrana queda suficientment tensa.
- vi) Eliminar l'aire que pugui estar present a la cel·la per la tubuladura per on es prenen les mostres, i completar el volum de líquid fins a l'enrasament lateral.
 - vii) A continuació es posa en marxa un cicle de mostratge manual de les cel·les que representarà el blanc o control .
 - viii) Dipositar 1 ml de la fase donadora sobre la membrana i tapar-la amb Parafilm® per a evitar l'evaporació. Cinc minuts després es posa en marxa un cicle de mostratge manual de les cel·les que servirà per a iniciar la experiència de permeació i comprovar la integritat de la pell
 - ix) A continuació s'inicia el protocol de presa de mostres (PROTOCOL Núm. 3).

Tapar els vials dosificats per l'aparell l'abans millor i conservar les mostres a -20°C fins a la seva anàlisi.

4.6.6 Disseny de l'estudi

A continuació es descriuen les fases que s'han seguit per a portar a terme l'estudi comparatiu de la permeació transdèrmica dels set fàrmacs sotmesos a anàlisi. Es detallen, des de la programació i disseny de l'estudi, fins a l'obtenció dels tabulats quantitat acumulada-temps, que posteriorment permetrà fer una estimació i els paràmetres de permeació de cada benzodiazepina estudiada (Taula 4.4).

En cada experiència es van utilitzar 6 cel·les, de manera que en cada experiència s'assajaven simultàniament 6 pells de donants diferents i un fàrmac. El disseny de l'assaig s'exposa en el quadre següent. Mitjançant aquest esquema s'utilitzen sis donants i s'obtenen sis replicats per a cada benzodiazepina, de tal forma que tots els fàrmacs passen a través de les mateixes pells procedents dels mateixos donants i de la mateixa zona anatòmica. Aquest disseny permet minimitzar la variabilitat interindividual que sol presentar en aquest tipus d'estudis.

Taula 4.4: Esquema del disseny realitzat en els estudis de permeació de les set benzodiazepines (lletres de la A a la G) realitzats a través de la pell humana procedent de donants (números romans de l'I al VII)

Experiència	Cel·la					
	1	2	3	4	5	6
1	A I	A II	A III	A IV	A V	A VI
2	B I	B II	B III	B IV	B V	B VI
3	C I	C II	C III	C IV	C V	C VI
4	D I	D II	D III	D IV	D V	D VI
5	E I	E II	E III	E IV	E V	E VI
6	F I	F II	F III	F IV	F V	F VI
7	G I	G II	G III	G IV	G V	G VII



Per exemple, en les sis cel·les assajades de la experiència 4 es va estudiar en la cel·la 1 la penetració del fàrmac D a través de la pell I, en la cel·la dos la penetració del fàrmac D a través de la pell II i així successivament. En totes les experiències es va treballar amb sis mostres de pell procedents de donants diferents. En el cas del fàrmac G, es va haver d'emprar pell d'un donant diferent (el donant VII, degut a l'exhauriment de la pell del donant VI).

4.6.6.1 Presa de mostres

Una vegada muntades les sis cel·les amb la fase receptora, s'equilibra la temperatura a 35° C, es procedeix a l'inici de l'experiència, amb la seqüenciació de preses de mostra indicades en la taula 4.5

Taula 4.5: Descripció detallada de la seqüència de recollida de mostres de fase receptora amb el número d'ordre, temps entre mostres i temps acumulat.		
Número de presa	Interval temps (h)	Temps acumulat (h)
-1	Cel·la muntada, recollida de mostra de fase receptora amb pell i sense fase donadora. Temps 5 minuts abans de l'inici de l'experiència (abans de posar fase donadora amb la benzodiazepina corresponent)	
0	Cel·la muntada, recollida de mostra de fase receptora immediatament després d'addicionar la solució saturada. Inici de l'experiència. Temps zero.	
1 ^a	2	2
2 ^a	2	4
3 ^a	4	8
4 ^a	4	12
5 ^a	4	16
6 ^a	4	20
7 ^a	4	24
F	Una vegada finalitzada l'experiència abans de desmuntar	

L'objectiu de la esmentada seqüenciació té a veure amb l'intent de controlar la integritat de la pell així com les possibles impureses que pugui alliberar.

- Amb la presa de mostra -1 s'aconsegueix determinar si la pell considerada allibera substàncies alienes que podrien interferir en la mètrica analítica.
- Amb la presa anomenada 0 es comprova la integritat inicial de la pell davant la fase donadora.

Resum de les condicions de permeació

Esquemàticament es mostren en la **Taula 4.6** les condicions experimentals en què s'han portat a terme l'estudi comparatiu de permeació *in vitro* de la sèrie de benzodiazepines assajades en el present treball.

Taula 4.6. Resum de les condicions de permeació de la sèrie de benzodiazepines a través de pell humana.

Variable	Descripció o valor
Cel·la de difusió: - Volum mitjà	Cel·la de Franz vertical modificada 13.15 ml
Membrana: - Gruix - Superfície de difusió mitjana - Temps d'hidratació - Temps de conservació a -20°C	Pell abdominal de dona 0.4 mm 2.54 cm ² 24 h menys d'un any
Fase donadora:	Solució reguladora (pH 7.4) amb el fàrmac a saturació en presència de sòlid
Fase receptora:	Solució reguladora (pH 7.4) amb agitació magnètica (600 rpm)
Temps de mostratge en h (Prot. N°3)	0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 i F
Temperatura (Fase donadora)	35 ± 1 °C
Procediment analític	CLAE (veure 4.4.1)
Número de pells per fàrmac	6

- **Integritat de la membrana**

L'elevada variabilitat que presenten els estudis de permeació transdèrmica *in vitro* ve àmpliament referenciada en la bibliografia (Skelly, 1987; Wester, 1992; Liu, 1993). Southwell *et al.* van investigar la permeabilitat de la pell humana i van concloure que els resultats *in vitro* eren més variables que els obtinguts *in vivo*, comprovant, a més a més, que les característiques de les pells poden canviar o, fins i tot, alterar-se al llarg d'una experiència *in vitro* (Southwell, 1984). Poden concretar-se diverses fonts de variabilitat :



- Mostres de pell de diferents característiques: diferents individus, edats, sexe o diferents zones del cos.
- Lesions de la pell durant la preparació o l'emmagatzement. Quan es talla la pell amb el dermàtom pot alterar-se l'estrat corni. Quan el temps de emmagatzement és excessiu (més d'un any a -20°C) també pot veure's afectada l'estructura de la pell.
- Alteració de les propietats de la pell durant l'experiència de permeació, degut a la duració de l'experiència o perquè la composició de la fase donadora és molt agressiva.

Del que ha estat exposat es dedueix que és important comprovar la integritat de la pell en els estudis *in vitro* per a reduir la variabilitat global dels resultats. Un dels primers controls que es van proposar per a comprovar l'estat de la membrana a l'inici de l'experiència consisteix a mesurar el flux d'aigua tritiada a través de la pell (Bronaugh, 1986). Malgrat tot, les molècules de aigua són representatives únicament del pas de petites molècules polars a través de vies polars. Per aquest motiu Bronaugh i Stewart van emprar a més a més, cortisona marcada per a controlar també les vies no polars de permeació transdèrmica (Buchmann, 1991). Donat que realitzar aquests controls implicaria allargar considerablement els estudis de permeació i, a més a més, no es té la garantia que al final de l'experiència les membranes es mantinguin operatives, en el present treball es controla la integritat de la pell per una part a l'inici i al final de l'experiència per observació directa amb un feix de llum. El procediment consisteix a observar *de visu* i a contrallum la membrana de pell muntada sobre el *holder* corresponent, donada la facilitat de travessar les superfícies, en el cas de l'existència de discontinuïtats o porus es visualitzen punts de llum que permeten descartar la pell a utilitzar o utilitzada.

4.6.6.2 **Determinació de la concentració de fàrmac a les mostres de treball**

La determinació de la concentració de fàrmac en les mostres de treball es realitza d'acord amb l'epígraf 4.4.2. La metodologia emprada obliga a realitzar una correcció per efecte de les dilucions que realitza l'aparell.

El factor de dilució que té lloc en la fase receptora, com a conseqüència de les successives preses de mostra realitzades amb Microette[®], pot deduir-se considerant els següents passos:

- i) A l'inici de l'experiència (t_0), quan encara no s'ha pres cap mostra, la concentració de fàrmac en la fase receptora pot expressar-se així:

$$C_0 = \frac{Q_0}{V} \quad \text{Equació 4.22}$$

On Q_0 és la quantitat inicial de producte en la fase receptora (òbviament, hauria de ser zero a t_0) i V és el volum real de la cel·la de difusió.

- ii) Després d'un cicle de funcionament s'haurà pres un volum de mostra de la fase receptora (V_m) al mateix temps que l'aparell haurà reposat un volum (V_r) del líquid contingut en el dipòsit. El volum de reposició ha de ser sempre superior al volum de mostra i la diferència ($V_r - V_m$) es coneix com volum de sobreexidor; d'aquesta forma es manté constant el volum de la cel·la (V). Per tant, la quantitat de fàrmac present en la cel·la en el primer cicle seria la resultant de restar a la quantitat inicial (Q_0), les pèrdues degudes al volum de mostra (V_m) i al volum que ha sobreexidit ($V_r - V_m$). Expressat en termes de concentració seria:

$$C_1 = \frac{(Q_0 - V_m \cdot C_0) - ((V_r - V_m) \cdot C_0)}{V} = C_0 \cdot \left(1 - \frac{V_r}{V}\right) \quad \text{Equació 4.23}$$

- iii) Per tant, la concentració de fàrmac en la cel·la després del segon cicle de funcionament (C_2) es pot expressar així:

$$C_2 = C_1 \cdot \left(1 - \frac{V_r}{V}\right) = C_0 \cdot \left(1 - \frac{V_r}{V}\right)^2 \quad \text{Equació 4.24}$$

Després de n cicles de funcionament s'obté l'equació :

$$C_n = C_{n-1} \cdot \left(1 - \frac{V_r}{V}\right) = C_0 \cdot \left(1 - \frac{V_r}{V}\right)^n \quad \text{Equació 4.25}$$

- iv) Finalment, es dedueix que el factor de dilució de l'aparell és un valor constant que depèn solament del nombre de cicles realitzats (n), del volum de reposició (V_r) i del volum total de la cel·la (V), com es mostra a continuació:

$$\frac{C_n}{C_0} = \left(1 - \frac{V_r}{V}\right)^n = \text{factor de dilució} \quad \text{Equació 4.26}$$

Val a dir que, mitjançant aquest sistema de treball, les concentracions de fàrmac en la fase receptora no depenen del volum de mostra pres pel Microette® i, per tant, un volum de mostra lleugerament diferent al programat quedarà automàticament compensat per l'efecte conjunt de la reposició i el sobreeximent de la cel·la. Aquest fet serà cert sempre que la mostra presa sigui realment representativa de la concentració que, a aquest temps, hi ha a la fase receptora; és a dir, que no es donen processos que distorsionin la concentració real del fàrmac en el moment de prendre la mostra (evaporació, degradació, etc.).



Del que ha estat exposat anteriorment pot concloure's que les concentracions experimentals obtingudes per cromatografia (CLAE) s'han de corregir pel factor de dilució de l'aparell mitjançant la equació 4.26. El càlcul de la concentració a cada temps de presa de mostres (cicle) es calcula mitjançant l'equació 4.26. Aquestes concentracions corregides, multiplicades pel volum real de cada cel·la de difusió, són els valors representatius de les quantitats permeades a cada temps de mostratge.

4.6.6.3 Càlcul dels paràmetres de permeació transdèrmica

El perfil de penetració d'una substància a través de la pell ve definit experimentalment pels parells de valors quantitat permeada acumulada a cada temps. Des d'un punt de vista teòric, l'equació matemàtica que s'ajusta als valors experimentals ens permet obtenir els principals paràmetres de permeació transdèrmica que defineixen les característiques de penetració de la substància a través de la pell. El pas d'un fàrmac a través de la pell es realitza mitjançant un procés de difusió passiva, segons les lleis de Fick, d'acord amb el que ha estat exposat en el capítol 2 d'antecedents bibliogràfics.

En els estudis de permeació transdèrmica, l'aplicació de la llei de Fick es porta a terme tenint en compte les següents consideracions:

- El solut (fàrmac) difon en una sola direcció, la membrana es considera plana i homogènia quant a la seva estructura.
- El gruix de la membrana en la direcció de la difusió, presenta un valor finit ($x=l$).
- La concentració de solut (fàrmac) en la solució que es situa sobre la membrana es considera constant mentre dura el procés. S'anomena solució donadora.

El tractament matemàtic de la segona llei de Fick, tenint en compte les consideracions anteriors, permet obtenir la següent equació :

$$\frac{Q_t}{h \cdot C_0} = \left[\frac{D}{h^2} t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{n=\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \cdot e^{-\left(\frac{Dn^2\pi^2}{h^2} t\right)} \right] \quad \text{Equació 4.27}$$

on:

- Q_t = quantitat de fàrmac que ha difós a un temps t per unitat d'àrea de membrana.
- h = gruix de la membrana de pell.
- C_0 = concentració de solut (fàrmac) a la solució situada sobre la membrana (pell) a temps zero.
- t = temps considerat.
- e = nombre e
- D = coeficient de difusió del solut a través de la membrana (pell).
- n = nombre d'iteracions pel càlcul de Q_t

De l'equació 4.27 s'obté:

$$Q_t = \left[\frac{D \cdot h \cdot C_0}{h^2} t - \frac{h \cdot C_0}{6} - \frac{2 \cdot h \cdot C_0}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{n=\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \cdot e^{-\left(\frac{Dn^2\pi^2}{h^2}t\right)} \right] \quad \text{Equació 4.28}$$

Si considerem que el pas de fàrmac (solut) a través de la membrana (pell) depèn del seu coeficient de repartiment P, entre el solvent en què es troba dissolt el fàrmac i els lípids de la membrana (pell), l'equació 4.28 es pot escriure:

$$Q_t = \left[\frac{D \cdot h \cdot P \cdot C_0}{h^2} t - \frac{h \cdot P \cdot C_0}{6} - \frac{2 \cdot h \cdot P \cdot C_0}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{n=\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \cdot e^{-\left(\frac{Dn^2\pi^2}{h^2}t\right)} \right] \quad \text{Equació 4.29}$$

Reordenant aquesta equació 4.29 s'obté:

$$Q_t = h \cdot P \cdot C_0 \cdot \left[\frac{D}{h^2} t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{n=\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \cdot e^{-\left(\frac{Dn^2\pi^2}{h^2}t\right)} \right] \quad \text{Equació 4.30}$$

L'equació 4.30 considera la difusió de solut per unitat d'àrea de membrana (pell); la quantitat de solut (fàrmac) per unitat de temps que travessa (permea) per l'àrea total de la membrana (pell) es calcula d'acord amb la següent equació:

$$Q_t = A \cdot h \cdot P \cdot C_0 \cdot \left[\frac{D}{h^2} t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{n=\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \cdot e^{-\left(\frac{Dn^2\pi^2}{h^2}t\right)} \right] \quad \text{Equació 4.31}$$

on :

- A= àrea de la membrana (pell) que ha estat en contacte amb la solució que conté el solut (fàrmac).
- P= coeficient de repartiment del solut (fàrmac) entre el solvent que el conté i els lípids de membrana.

En la pràctica resulta difícil el càlcul del coeficient de repartiment (P) del solut (fàrmac) entre el solvent que el conté i els lípids de membrana (pell). També, a nivell operatiu, resulta molt complex determinar el coeficient de difusió (D) del solut (fàrmac) a través de la membrana (pell), o el gruix real de la pell (h).

Per aquesta raó, i a fi de fer operativa l'equació integrada o "tractament difusional de la segona llei de Fick", es parametriza l'equació 4.31; és a dir, es substitueixen les incògnites P, D, i h pels paràmetres que les engloben P₁ i P₂ (Okamoto, 1986) . El valor d'aquests paràmetres és com segueix:

$$P_1 = P \cdot h \quad (\text{cm}) \quad \text{Equació 4.32}$$

$$P_2 = \frac{D}{h^2} \quad (\text{t}^{-1}) \quad \text{Equació 4.33}$$

Introduint a la equació 4.31, els paràmetres P₁ i P₂, s'obté l'equació parametrizada per Okamoto :



$$Q_t = A \cdot P_1 \cdot C_0 \cdot \left[P_2 \cdot t - \frac{l}{6} - \frac{2}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{l^n}{n^2} \right) \cdot e^{-(P_2 n^2 \pi^2 t)} \right] \quad \text{Equació 4.34}$$

L'equació 4.34 és l'equació de funcionament en els estudis de permeació de soluts a través de membranes planes. En el cas de la present Memòria aquesta equació s'ajusta a les dades experimentals obtingudes de quantitat de fàrmac permeades acumulades a través de la pell en els temps considerats.

L'ajustament de l'equació teòrica 4.34 als parells de valors, quantitats permeades acumulades en funció del temps, permet obtenir els paràmetres P_1 i P_2 . Aquests paràmetres s'estimen mitjançant el programa Laplace (1991) per regressió no lineal de mínims quadrats, aplicat a un ordinador IBM Pc que opera per transformades de Laplace.

D'acord amb la llei de Fick, el valor de la constant de permeabilitat (K_p) presenta la següent expressió:

$$K_p = \frac{D \cdot P}{h} \quad \text{Equació 4.35}$$

Considerant l'equació 4.34 a partir dels valors obtinguts de P_1 i de P_2 s'estimen els principals paràmetres representatius del procés de permeació:

- K_p ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$), constant de permeabilitat
- J ($\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$), flux
- T_L (h), període de latència.

El període de latència equival al temps que transcorre des que s'inicia el procés de permeació fins que s'assoleix l'estat d'equilibri estacionari en el sistema, és a dir, a partir del temps en què la quantitat de fàrmac que permea a través de la pell ho fa d'acord amb un procés d'ordre zero.

a) Càlcul de la constant de permeabilitat (K_p)

El valor de K_p equival al producte de P_1 per P_2 ; efectivament, d'acord amb les equacions 4.32 i 4.33, s'obté:

$$P_1 \cdot P_2 = P \cdot h \cdot \frac{D}{h^2} = \frac{P \cdot D}{h} \quad \text{Equació 4.36}$$

en conseqüència :

$$K_p = P_1 \cdot P_2 \quad (\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}) \quad \text{Equació 4.37}$$

b) Càlcul del flux (J)

El valor del flux s'estima a partir de la concentració de fàrmac en la solució donadora (C_0) a temps zero, i el valor de K_p mitjançant la següent equació:

$$J = C_0 \cdot K_p \quad (\text{mcg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{t}^{-1}) \quad \text{Equació 4.38}$$

c) Càlcul del període de latència (T_l)

D'acord amb l'equació 4.34, en estat d'equilibri estacionari, és a dir, quan la quantitat de fàrmac que permea per unitat de temps és constant, des d'un punt de vista matemàtic el nombre d'iteracions és infinit.

En aquestes condicions, el terme

$$\left[\frac{2}{\pi^2} \cdot \sum_1^{\infty} \left(\frac{-I^n}{n^2} \right) \cdot e^{-(P_2 n^2 \pi^2 t)} \right]$$

val zero. Per tant l'equació 4.34, pot escriure's:

$$Q_t = A \cdot P_1 \cdot C_0 \cdot \left[P_2 \cdot t - \frac{I}{6} \right] \quad \text{Equació 4.39}$$

La representació gràfica d'una corba que relaciona quantitats permeades acumulades en funció del temps s'exposa en la figura següent:

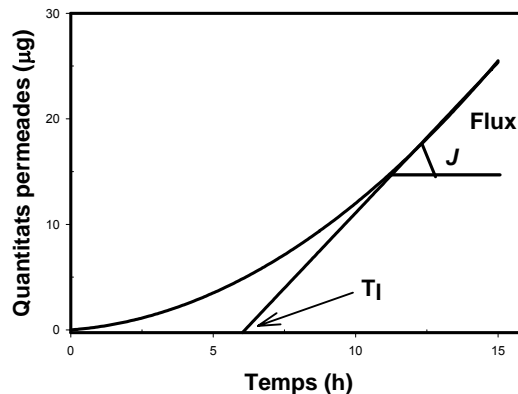


Figura 4.8 Representació gràfica de la quantitat permeada acumulada (difosa) a través de la pell, en funció del temps.

El tram recte de la corba es representatiu de l'estat d'equilibri estacionari. L'extrapolació de la recta a l'eix d'abscisses equival al període de latència (T_l). Si a l'equació 4.39 es considera el temps zero, la quantitat permeada serà també zero i el valor de t es correspon a T_l. Per tant, es pot escriure:

$$0 = A \cdot P_1 \cdot C_0 \cdot \left[P_2 \cdot T_l - \frac{I}{6} \right] \quad \text{Equació 4.40}$$

Per què es compleixi l'equació 4.35, un dels factors ha de valer zero. Donat que ni l'àrea de permeació, ni C₀, ni P₁ no poden valer zero, si ha existit permeació de



fàrmac, s'ha complir:

$$0 = \left[P_2 \cdot T_l - \frac{I}{6} \right] \quad \text{Equació 4.41}$$

d'on es dedueix que:

$$T_L = \frac{I}{6 \cdot P_2} \quad \text{Equació 4.42}$$

d) Càlcul del temps mitjà de trànsit del fàrmac a través de la pell (MTT)

Per aplicació de transformades de Laplace a la segona llei de Fick amb parametrització de l'equació resultant es pot obtenir l'equació representativa del temps mitjà de trànsit del fàrmac a través de la pell, que té per expressió matemàtica la següent :

$$MTT = \frac{1}{2 \cdot P_2} + \frac{V_1}{P_2 \cdot P \cdot V_2} \quad \text{Equació 4.43}$$

on :

- V_1 és el volum del compartiment donador,
- V_2 és el volum del tros de pell utilitzada en l'estudi.

Tenint en compte el valor del paràmetre P_1 , exposat a l'equació 4.32. Si multipliquem ambdós costats de l'equació per l'area de la pell (A), s'obté :

$$P_1 \cdot A = P \cdot h \cdot A = P \cdot V_2 \quad \text{Equació 4.44}$$

Si substituïm el valor de $P \cdot V_2$ de l'equació 4.43 pel valor equivalent de l'equació 4.44 s'obté :

$$MTT = \frac{1}{2 \cdot P_2} + \frac{V_1}{P_2 \cdot P_1 \cdot A} = \frac{1}{2 \cdot P_2} + \frac{V_1}{k_p \cdot A} \quad \text{Equació 4.45}$$

Resumint, després de l'ajustament a l'equació 4.34 de les dades experimentals es fa l'estimació dels valors dels paràmetres de funcionament P_1 i P_2 . Conegut el valor d'aquests paràmetres, per aplicació directa de les equacions 4.37; 4.38, 4.42 i 4.45, es calculen els paràmetres de permeació transdèrmica del fàrmac sotmès a estudi: constant de permeabilitat (K_p), flux (J), període de latència (T_l) i temps mitjà de trànsit a través de la pell (MTT).

Càlcul dels valors inicials o "estimes"

Com s'ha comentat abans, l'equació 4.34 s'ajusta als resultats experimentals (quantitats de fàrmac permeades acumulades en funció del temps). L'ajustament es porta a terme mitjançant el programa LAPLACE (que calcula per transformades) instal·lat en un ordinador PC. A fi de realitzar l'ajustament, és necessari disposar d'uns valors inicials ("estimes") dels paràmetres P_1 i P_2 . Per això es calcula la recta de regressió dels punts experimentals en estat d'equilibri estacionari per regressió lineal

simple per mínims quadrats (Figura 4.38). Es fa una estimació del valor de la intersecció de la recta amb l'eix d'abscisses, que es correspon amb el valor de T_1 . A partir de l'equació 4.42 es calcula el valor inicial de P_2 . El pendent de la recta equival al flux (J) i, coneguda la concentració a saturació del fàrmac problema (C_0), per aplicació directa de l'equació 4.38, es fa una estimació del valor inicial de K_p . Estimat el valor de K_p , a partir de l'equació 4.37, es calcula el valor inicial de P_1 .

L'avantatge principal de la regressió no lineal per mínims quadrats per a calcular els paràmetres de permeació, enfront al mètode més senzill que solament considera la fase terminal o d'equilibri estacionari de la corba de permeació, ja va ser apuntat per Barry (1983) i després per Shah (1993). En la regressió no lineal intervenen tots els punts experimentals disponibles, es trobin o no en estat d'equilibri, cosa que permet obtenir el perfil de permeació complet i, per tant, és possible determinar amb menor subjectivitat paràmetres que poden resultar molt importants, com el període de latència. En aquest sentit, Shah puntualitza que la linealitat en la corba de permeació s'obté després de 3 o 4 períodes de latència i que la bibliografia referent a la permeació transdèrmica de fàrmacs, en general no té en compte aquest problema. Pels motius exposats en la present Memòria, el càlcul dels paràmetres de permeació s'ha obtingut per regressió no lineal.

Prediccions de les concentracions de fàrmac en estat d'equilibri estacionari

Els nivells plasmàtics d'un fàrmac *in vivo* determinen l'eficàcia terapèutica d'un tractament; per aquest motiu és important fer una extrapolació de la concentració de benzodiazepina que hi haurà en plasma quan un fàrmac assoleixi l'estat d'equilibri estacionari en l'organisme. A partir del flux transdèrmic (J) determinat *in vitro* en aquest estudi, assumint una grandària de pegat transdèrmic de 16 cm² i coneixent l'aclariment (Cl) que exerceix un organisme per a cadascuna de les benzodiazepines assajades es pot determinar, a partir de l'igualtat ($C_{ss} = J / Cl$), aquest valor de concentració. Aquest valor ens ajudarà a decidir els probablement millors candidats de la sèrie per a ser dissenyats com a SAT.

4.6.6.4 Càlcul teòric dels valors de la constant de permeabilitat (k_p)

L'objectiu de fer una estimació dels valors teòrics de k_p de les benzodiazepines estudiades en la present Memòria és intentar obtenir una potencial correlació entre els valors teòrics d'aquest paràmetre i els experimentals trobats en el treball realitzat en aquest estudi. Els valors de log de K_p s'han calculat de dues formes:

- Mitjançant el programa DermwinTM (USEPA, 2000) s'ha estimat el valor teòric de K_p corresponent a cada benzodiazepina, per aplicació directa de l'equació publicada que utilitza per al càlcul l'equació 4.46. Aquest programa permet l'estimació del coeficient de repartiment octanol/aigua, a partir de l'estructura molecular (Meilan, 1996), que compara amb els valors existents a la base de dades per a determinar el valor a utilitzar en el càlcul de K_p .



$$\log k_p \left(\frac{cm}{h} \right) = -2.72 + 0.71 \cdot \log P - 0.0061 \cdot MW \quad \text{Equació 4.46}$$

on

P = coeficient de repartiment del fàrmac en n-octanol /aigua

MW = pes molecular del fàrmac.

- Determinació a partir de l'equació de Potts&Guy (1992) obtinguda d'un conjunt de dades experimentals d'una sèrie de fàrmacs: relaciona el valor experimental del coeficient de permeabilitat (K_p) d'un fàrmac a través de pell humana amb els valors respectius del pes molecular (MW) i del coeficient de repartiment entre n-octanol i aigua.

$$\log k_p (cm/seg) = [-6.3 \pm 0.8] + [0.71 \pm 0.06] \cdot \log P - [0.0061 \pm 0.0006] \cdot MW$$

Equació que presenta un coeficient de correlació de $r = 0.82$ i una desviació estàndard de $s = 0.75$. Segons ells la via lipídica de penetració és suficient per a explicar la permeabilitat cutània de gran quantitat de substàncies en què les propietats físiques es trobin compreses entre les següents:

$$-3 < \log K_{oct} < +6$$

i a més a més:

$$18 < MW < 750$$

Condicions que compleixen les benzodiazepines.

4.7 ESTUDI DE POSSIBLES CORRELACIONS ENTRE ELS DESCRIPTORS FÍSICO-QUÍMICS I PARÀMETRES DE PERMEACIÓ TRANSDÈRMICA

D'acord amb el descrit en la Introducció de la present Memòria, i coneixent els descriptors més habitualment utilitzats per a explicar les propietats de transferència de matèria (Kamlet, 1983), es pot establir la següent igualtat:

$$\text{Resposta} = f_1(\text{estèriques}) + f_2(\text{electròniques}) + f_3(\text{enllaç molècules}) + f_4(\text{físico químiques})$$

En el camp de la permeació transdèrmica de fàrmacs i d'acord amb els treballs publicats, es pot afirmar que les millors correlacions obtingudes fins ara consideren com a variable dependent el coeficient de permeabilitat o el seu logaritme decimal (k_p , $\log k_p$) i com a variables independents el coeficient de repartiment o el seu logaritme decimal (P, $\log P$), la mida molecular i les unions d'hidrogen. Una funció teòrica que podria presentar un bon valor predictiu per a la sèrie de benzodiazepines estudiades podria ser la següent:

$$k_p(\log k_p) = f(P(\log P), MW, \text{Temp.fusió}, \text{constant})$$

Seguint aquests criteris s'han fet prediccions de k_p (Abraham, 1995; Potts, 1995). Tot aquest plantejament neix de considerar la importància de les propietats moleculars (Hansch, 1979) com a determinants per a descriure la penetració d'un solut a través de la pell (Scheuplein, 1971). Roberts (1976) va observar que la permeabilitat de compostos fenòlics, alcohols i esteroides, corregits pel coeficient de repartiment estrat corni-aigua i per propietats estèriques, estava inversament relacionada amb el nombre de ponts d'hidrogen. Aquest aspecte va ser confirmat posteriorment aplicant una anàlisi simple de les dades amb un mètode semi-empíric amb les mateixes molècules amb què Potts i Guy havien obtingut bones correlacions (Pugh, 1994).

Els descriptors d'una estructura química caracteritzen i quantifiquen les propietats de la molècula o dels seus fragments subestructurals i de les seves propietats físico-químiques. En el cas de les correlacions estructura-activitat transdèrmica, els descriptors utilitzats es poden classificar en els següents grups:

- **Descriptors específics dels estudis transdèrmics:** Els paràmetres de permeació transdèrmica més habituals són els descrits anteriorment en l'apartat 4.6.6.3:
 - K_p ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$), constant de permeabilitat
 - T_L (h), període de latència i
 - J ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$), flux
 - P_1 i P_2 de l'equació d'Okamoto

- **Descriptors de propietats físico-químiques:** El descriptor de lipofília per excel·lència és el coeficient de repartiment (P) o el seu logaritme (logP), que es defineix com la relació de concentracions molars entre una fase de n-octanol i aigua, en estat d'equilibri. El descriptor de la hidrofília més habitual és la solubilitat del fàrmac en un solvent polar com pot ser l'aigua o una solució reguladora de pH 7.4.

- **Descriptors geomètrics o estèrics:** Aquests descriptors són indicadors de la forma i mida de la molècula. S'ha calculat el volum molecular (VM) i la superfície molecular (SM). Per això s'ha utilitzat el programa ARVOMOL, desenvolupat per Luis Fernández Pacios del Departament de Química i Bioquímica de la ETSIM de la UPM. Aquest programa té quatre algorismes de càlcul:
 - Simulació de MONTE CARLO
 - GRID/OEPP de MEYER
 - Algorisme de la divisió en cubs
 - Algorisme de GEPOL (TESSELATION)El programa dóna el valor mitjà de les superfícies i els volums calculats amb els quatre algorismes.
Cal comentar que la mida molecular es pot substituir pel pes molecular ja que òbviament es troben relacionats.



- **Descriptors electrònics:** Els descriptors electrònics són indicatius de les interaccions de tipus electrostàtic i les de pont d'hidrogen entre la molècula i el seu receptor, o entre molècules. Existeixen diferents classes de descriptors electrònics:
 - Logaritme decimal negatiu de la constant de dissociació o pK_a .
 - Mètodes de química quàntica: l'aplicació del mètode semi-empíric AM1 permet calcular una gran varietat de descriptors estereoelectrònics. Els més rellevants són:
 - QN8 : càrrega neta de l'àtom de nitrogen 8 de l'estructura base de benzodiazepina.
 - EU : energia d'unió.
 - MD : moment dipolar.

Aquest càlcul s'ha dut a terme utilitzant el programa CS Chem 3D Pro Cambridge Soft Corporation, USA (1997), realitzant prèviament una optimització de la molècula.

Pel que fa referència a les unions per pont d'hidrogen val a dir que és prou coneguda la correlació existent amb el punt de fusió de la substància, fet que permet utilitzar-lo com a descriptor electrònic.

4.7.1 Tipus de correlacions assajades

D'acord amb l'exposat anteriorment, seguint les consideracions fetes en el capítol introductori, de la present Memòria, es vol aconseguir establir correlacions lineals múltiples entre els següents descriptors:

a. Correlació entre paràmetres físico-químics

S'ha considerat com a variable dependent $\log P$ i com a variables independents els descriptors: $\log S_0$ (logaritme de la solubilitat) i PF (punt de fusió).

b. Correlació entre paràmetres de permeació i paràmetres físico-químics

S'ha considerant com a variable dependent la constant de permeabilitat (K_p) o el seu valor logotransformat ($\log K_p$) i com a variables independents els següents descriptors físico-químics:

- Coeficient de repartiment del fàrmac octanol / solució reguladora, o el seu valor logotransformat ($\log P$).
- Pes molecular de les benzodiazepines assajades, expressat en $g \cdot mol^{-1}$ (MW).
- Punt de fusió de les benzodiazepines estudiades, expressat en graus Celsius ($^{\circ}C$).
- Solubilitat de les benzodiazepines en solució reguladora de fosfats pH=7.4, expressada en $mcg \cdot ml^{-1}$.

c. Correlació entre paràmetres de permeació i paràmetres moleculars.

S'ha considerant com a variable dependent la constant de permeabilitat (K_p) o el seu valor logotransformat ($\log K_p$) i com a variables independents els següents descriptors:

- Coeficient de repartiment del fàrmac octanol / solució reguladora, o el seu valor logotransformat ($\log P$)
- EU, energia d'unió
- VM, volum molecular
- EU, energia d'unió
- QN₈, càrrega neta en el nitrogen 8 de l'estructura de la benzodiazepina

En tots els casos considerats l'estudi s'ha dut a terme amb el software LABSWARE de Compodrug d'Hongria, que és un paquet integrat amb diferents programes. Amb el programa DATMSA v 5.0 (Data File Generation for Multivariate Statistical Analysis) (Compodrug, 1985) es va generar la matriu inicial de dades. A continuació es va cercar algun tipus de correlació lineal múltiple processant les dades amb el programa ANALYSIS SLREGR v. 5.0 (Stepwise Linear Regression Analysis), prenent com a variables dependents el flux (J), el coeficient de permeabilitat (k_p) o el seu logotransformat. Les variables utilitzades en la correlació van ser: el coeficient de repartiment octanol-solució reguladora fosfats pH 7.4 (P) o el seu logotransformat, el pes molecular (MW), el punt de fusió (PF) i la solubilitat S_0 , de forma que la variable dependent es pot expressar com una funció multinial dependent d'aquests descriptors.

$$J(k_p) = f(P, MW, PF, S_0, \dots) \quad \text{Equació 4.47}$$

o més concretament es podria expressar com a :

$$J(k_p) = a \cdot P + b \cdot MW + c \cdot PF + S_0 + d \quad \text{Equació 4.48}$$

En el cas de les correlacions entre paràmetres de permeació i paràmetres físico-químics, a més a més s'ha assajat l'ajustament proposat per Flynn-Stewart (1990); aquests autors van proposar una relació hiperbòlica que correlacionava la constant de permeabilitat de les substàncies amb el valor del seu coeficient de repartiment, mitjançant la següent equació :

$$\log K_p = Y_0 + \frac{A}{\left(1 + e^{\left(\frac{-(\log P - X_0)}{B}\right)}\right)^C} \quad \text{Equació 4.49}$$

On Y_0 , X_0 , A , B i C són paràmetres d'ajustament matemàtic de la funció.

4.8 ESTUDI DE LA INTERACCIÓ ENTRE LES BENZODIAZEPINES SELECCIONADES I LES MONOCAPES ARTIFICIALS

Per a la realització de la tècnica experimental descrita en l'apartat 1.5 del capítol introductori es van utilitzar les següents solucions:



- Solució reguladora pH 7.4. Vegeu preparació de solucions, apartat 4.2.1.
- Solució de dipalmitoïlfosfatidilcolina (DPPC): es dissol 1 mg de DPPC en 1 ml de cloroform. Concentració: $1.31 \cdot 10^{-3}$ M.
- Solució patró de cada benzodiazepina : en 3 ml de dimetilsulfòxid (DMSO) es van dissoldre les següents quantitats:
Diazepam 36 mg
Alprazolam 35 mg
- Solució de penetrant/promotor :
Limonè 1% (0,07 g de limonè fins a 7 g de DMSO)
Limonè 5% (0,5 g de limonè fins a 10 g de DMSO)
- Solució de promotor amb benzodiazepina : es van agafar 3 ml de la solució de penetrant i s'hi van afegir les quantitats :
Diazepam 36 mg
Alprazolam 35 mg

Pel que fa referència als aparells / instrumentació de mesura es va utilitzar un manòmetre superficial del tipus Langmuir; en la Figura 4.9 es pot veure un model segons el disseny de Verger i de Hass (1973) que pot ser utilitzat amb doble finalitat.

- a) Registre dels processos cinètics en superfície a àrea o pressió superficial constant.
- b) Mesura i registre continu de la tensió superficial en funció de l'àrea ocupada per la monocapa (isotermes de compressió o corbes de pressió-àrea).



Figura 4.9 : Tensiòmetre superficial de Langmuir

La tensió que s'exerceix sobre la làmina de Wilhelmy de l'electrobalança es converteix en impulsos elèctrics en la seva unitat de control. El valor de la tensió elèctrica que s'obté és proporcional a la tensió superficial del líquid i es transmet amb la sensibilitat adequada a l'entrada d'elèctrode d'un potenciòmetre de lectura digital, que està connectat a la vegada a un registrador gràfic. D'aquesta manera és possible enregistrar gràficament, en funció del temps, els valors de tensió elèctrica (mV)

procedents de l'electrobalança, els quals són a la vegada proporcionals als valors de tensió superficial del líquid-problema com es pot observar en la figura 4.10.

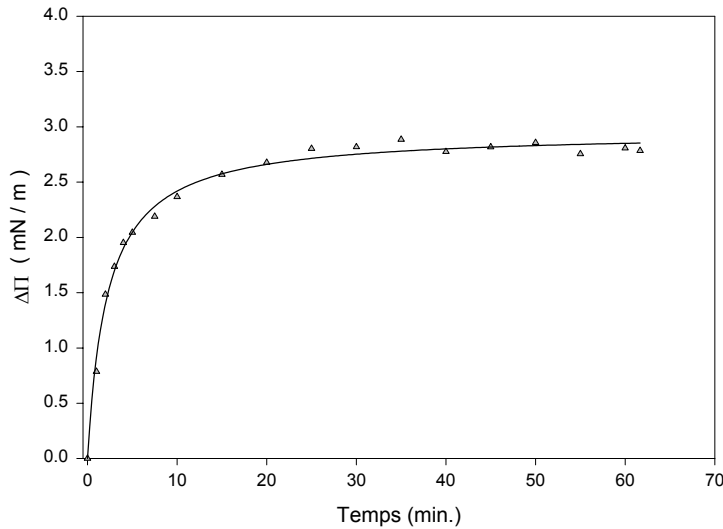


Figura 4.10: Exemple de com s'efectua el registre de la variació de la tensió superficial amb el temps

D'acord amb l'expressat en l'apartat 1.5 del capítol introductori de la present memòria, a partir de la pressió superficial $\Delta\Pi$ i de la concentració de benzodiazepina existent en la subfase es poden determinar els paràmetres més habituals en els estudis d'interfase, a partir de l'equació de Gibbs

$$A d\gamma = -\sum n_i \cdot d\mu_i \quad \text{Equació 4.50}$$

on A , és l'àrea de la interfase i n_i i μ_i són el nombre de mols i el potencial químic de la substància adsorbida, respectivament. Com que la concentració superficial en excés (Γ) està definida per:

$$\Gamma = \frac{n_i}{A} \quad \text{Equació 4.51}$$

la isoterma d'adsorció de Gibbs a temperatura constant es transforma en

$$d\gamma = -\sum \Gamma d\mu_i \quad \text{Equació 4.52}$$

i com que sabem que

$$\mu_i = \mu_0 + RT \cdot \ln a \quad \text{Equació 4.53}$$

on "a" és l'activitat del solut. Per tant, l'equació 4.50 es pot escriure

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial \ln a} \right)_T \quad \text{Equació 4.54}$$

Si es tracta d'una solució diluïda, l'activitat del solut serà proporcional a la seva concentració molar, amb què l'equació 5 queda:



$$\Gamma = -1/RT \left(\frac{\partial \gamma}{\partial \ln c} \right)_T \quad \text{Equació 4.55}$$

on c és la concentració de la substància adsorbida.

Totes les variables d'aquesta equació són mesurables experimentalment. El pendent d'una gràfica de tensió superficial (γ) d'una solució en front del logaritme neperià de la concentració ($\ln c$), a una temperatura donada, és igual a $-RT\Gamma$ i permet el càlcul de la concentració superficial en excés (Γ). L'equació 4.55 estableix que Γ és positiu quan la tensió superficial disminueix en augmentar la concentració de solut, per la qual cosa en el cas de les *pel·lícules de Langmuir*, on les quantitats de solut presents a les fases (aire i aigua) són negligibles en comparació amb les quantitats que es troben en la interfase, formant la monocapa, la concentració superficial (Γ) té un significat físic clar i és evidentment positiu; per tant, la tensió superficial disminueix degut a la presència de la monocapa. La disminució de la tensió superficial provocada per la monocapa es coneix com a pressió superficial (π)

$$\pi = \gamma_0 - \gamma_i \quad \text{Equació 4.56}$$

on γ_0 és la tensió superficial del líquid (solució aquosa) i γ_i és la tensió superficial d'aquest mateix líquid quan la interfase està ocupada per la monocapa. Això ens permet, a partir de l'equació 4.55, determinar la concentració superficial en excés en funció de la pressió superficial:

$$\Gamma = \Delta\pi / (RT \cdot \Delta \ln c) \quad \text{Equació 4.57}$$

La pressió superficial pot ser interpretada com la força per unitat de longitud que exerceixen les molècules que formen la monocapa contra les parets del recipient que conté la solució, de forma similar a les molècules d'un gas, ja que es mouen per la interfase amb un moviment brownià, com si suessin sobre el líquid (Levine, 1996).

Un altre paràmetre físico-químic important és l'anomenada àrea per molècula (*Àrea*) que es pot determinar:

$$\text{Àrea} = \frac{1}{\Gamma \cdot N} \quad \text{Equació 4.58}$$

Des d'un punt de vista experimental i tenint en compte que s'han de realitzar monocapes que simulin la membrana cel·lular, és important l'elecció del solvent, ja que condiciona el comportament de la monocapa.

A fi i efecte d'obtenir monocapes òptimes, és necessari considerar-ne el procés d'extensió, els factors que afecten la seva formació i tenir prova de la seva estructura molecular. La majoria de les vegades, les substàncies potencialment formadores de capes monomoleculares necessiten els anomenats solvents d'estensió, que faciliten la determinació de la quantitat de producte a estendre. Les característiques que hauria de complir un solvent d'estensió ideal són:

- Tenir suficient poder solvent.
- Ser químicament inert amb la substància que forma la monocapa i amb la subfase.

- Ser fàcilment purificable.
- Presentar elevada volatilitat.
- Ser poc soluble en aigua.

Seria desitjable que el solvent faciliti l'etapa d'extensió i que a continuació marxi de la interfase per evaporació. Per aquest motiu es trien solvents de punt d'ebullició entre 40 i 50°C.

El solvent utilitzat en el present treball per a dissoldre la substància formadora de monocapa va ser el cloroform.

4.8.1 Determinació de l'activitat superficial

La metodologia experimental utilitzada per a la determinació de l'activitat superficial va ser aquesta:

- Posar 70 ml de solució reguladora de fosfats de pH 7.4 en cubeta de tefló, prèviament neta amb agitació magnètica.
- Posar la làmina de Wilhelmy (Pt) (prèviament neta amb cloroform). Submergir la placa de Pt, fins una mica menys de la meitat.
- A continuació s'injecta un volum determinat de solució concentrada de benzodiazepina.
- Simultàniament, el *plotter* registra les variacions de pressió fins a valor asimptòtic estable

Per a estudiar l'activitat superficial de les benzodiazepines assajades (diazepam i alprazolam) s'han emprat concentracions creixents de benzodiazepina des de $1.53 \cdot 10^{-5}$ mols/l fins a la saturació de la interfase tampó fosfat / aire, degut al fet que aquestes concentracions són molt similars a l'existent en la fase donadora de la cel·la de Franz. Com a dissolvent s'ha usat el dimetilsulfòxid (DMSO), substància que ja s'ha demostrat que no té activitat superficial.

4.8.2 Cinètiques de penetració a àrea constant dels fàrmacs en presència i absència de promotor

Com a paràmetre representatiu de l'acció del fàrmac i/o la formulació sobre la monocapa s'ha emprat l'increment de pressió superficial ($\Delta\Pi$) que s'exerceix sobre aquella respecte a la solució lliure. Aquest augment de la pressió superficial es tradueix en una disminució de la tensió superficial de la subcapa aquosa de la monocapa, com es pot veure en la Figura. 4.11 . S'interpreta, a nivell comparatiu, que el fàrmac i/o la formulació que presenta una pressió superficial més elevada, presentarà en principi major capacitat per a travessar la membrana cel·lular.

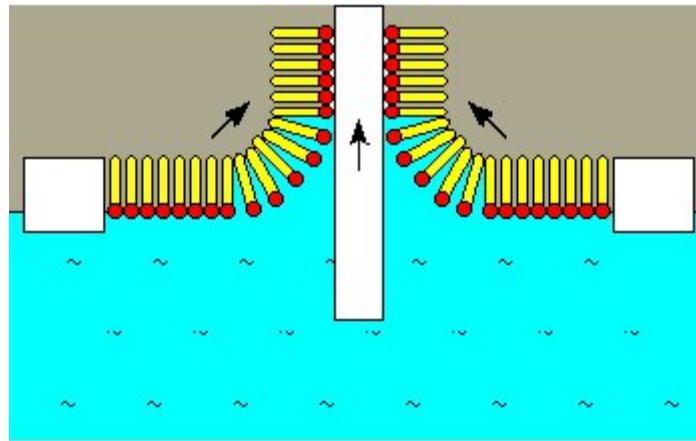


Figura 4.11: Esquema il·lustratiu de la disminució de la tensió superficial de la monocapa

Es van realitzar dos tipus d'experiències, les unes sense promotor i les altres amb promotor. La metodologia és exactament idèntica, l'única diferència és la solució patró utilitzada:

- Posar en cubeta de tefló circular, prèviament neta, 70 ml de solució reguladora de fosfats pH 7.4 amb agitació magnètica.
- En el mateix instant es posa en contacte la làmina de Wilhelmy, anotant la lectura del potenciòmetre (mV).
- A continuació, s'estén la monocapa amb una microxeringa, de forma que la pressió inicial assoleixi el valor desitjat de 5, 10 o 20 mN/m (valors de pressió operatius en aquest tipus de treballs).
- Després de deixar un temps d'estabilització es va procedir a la injecció d'un volum concret de solució de fàrmac problema de concentració $6.122 \cdot 10^{-5}$ M a la subfase. En el mateix instant s'inciava el registre de la variació de Π .

L'eficàcia de la penetració de les benzodiazepines en les monocapes es va mesurar segons la descripció feta per Reig i col (Reig, 1992). La solució lipídica de DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) es va preparar segons s'indica en l'apartat 4.8.1

Cal comentar que els estudis de determinació de l'activitat superficial de les benzodiazepines es van realitzar amb la mateixa cubeta que les cinètiques de penetració a àrea constant. Una concentració menor a la qual es va assolir l'equilibri de saturació va ser la injectada en els estudis de penetració a àrea constant.

Es van realitzar experiències amb penetrants: s'ha emprat el d-limonè com a substància penetrant, degut a la seva reconeguda acció sobre la desorganització reversible de l'estructura de l'estrat corni, facilitant el pas de substàncies a través seu, propietat observada en diversos estudis (Williams, 1990; Katayama, 1994); també per la seva baixa toxicitat (Williams, 1990). S'ha usat en les formulacions d-limonè a l'1% i al 5%, degut que s'ha comprovat que concentracions superiors al 5% no augmenten la capacitat penetrant (Boix, 1998).

Des d'un punt de vista d'aplicació pràctica, aquests estudis emprant monocapes es poden resumir així:

1. Una primera fase que estudia l'activitat superficial del fàrmac sotmès a estudi i que permet concretar la concentració òptima de treball i el temps en què s'assoleix la màxima disminució de l'activitat superficial ($\Delta\Pi$).
2. Coneguda la concentració òptima de fàrmac i el temps en què s'assoleix el màxim valor de $\Delta\Pi$, es realitza l'estudi de la cinètica de penetració del fàrmac sotmetent el sistema a tres pressions diferents (5 mN/m, 10 mN/m i 20 mN/m).

El valor de de la pressió de 20 mN/m pot considerar-se aquella a la qual en condicions normals està sotmesa la membrana (Tamn, 1986).

D'altra banda, en la present Memòria, en els estudis amb monocapes s'han assajat dues benzodiazepines, Alprazolam i Diazepam, per ser de les més utilitzades en terapèutica. Un dels objectius de l'estudi emprant monocapes ha estat disposar d'una primera aproximació de poder predictiu que poden tenir aquest tipus d'estudis a l'acció dels penetrants per a augmentar el pas de fàrmacs a través de la pell. Mitjançant els estudis de monocapes, per a un determinat fàrmac podria, en un relativament curt període de temps, seleccionar el o els penetrants, així com les concentracions òptimes per a augmentar el pas del fàrmac sotmès a estudi a través de la pell. En aquest sentit s'ha emprat en aquest treball el d-limonè en concentracions de l'1% i 5%, donat que els terpens presenten en molts casos una bona acció penetrant (Obata, 1993).

4.8.3 Ajustament matemàtic de les dades experimentals

L'ajustament matemàtic de les dades experimentals es va realitzar en una funció hiperbòlica rectangular del tipus :

$$\Delta\Pi = \frac{\Delta\pi_m t}{K + t} \quad \text{Equació 4.59}$$

on $\Delta\pi_m$ és l'increment màxim de pressió quan s'arriba a la saturació i K és el temps que es necessita per a arribar a la meitat de $\Delta\pi_m$. En definitiva són les constants d'ajustament de l'equació i $\Delta\Pi$ és la variació de pressió superficial (variable dependent) i t el temps (variable independent) obtingut a cadascuna de les experiències realitzades. El processament numèric es va realitzar mitjançant el programa SigmaPlot v5.00.

4.8.4 Relació entre diferències de pressió i constant de permeabilitat

D'acord amb el que ha estat exposat en aquest epígraf, l'increment de pressió $\Delta\Pi$ produït per la presència a la monocapa de fàrmac i/o fàrmac més promotor, equival a una mesura de la desorganització de l'estructura de la monocapa. La desorganització de la monocapa facilita el pas de les substàncies a través seu, és a dir, influeix en la capacitat intrínseca dels fàrmacs per a travessar la membrana, representada per la seva constant de permeabilitat, k_p . Per aquest motiu, en la present



Memòria es preten relacionar el valor de $\Delta\Pi$ amb el valor de k_p dels fàrmacs assajats en absència i presència de promotor.

4.9 TRACTAMENT ESTADÍSTIC DELS RESULTATS

En la validació de les metodiques analítiques es van fer servir rectes de calibratge ponderades. Aquest fet es justifica després de demostrar la heterocedasticitat de les variàncies de les concentracions mitjançant el test de Cochran. El factor de ponderació ve donat per l'invers de la variància, com es justifica a la discussió, d'aquesta manera va ser possible treballar en l'àmbit de concentracions en que es van dissenyar les rectes de calibratge (de 30 a 10000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ i de 30 a 1000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ en el cas del Clonazepam).

El tractament estadístic dels paràmetres de permeació es va portar a terme amb el paquet estadístic SPSSv.10. Els paràmetres de permeació segueixen una distribució no normal i estan millor descrits per la mediana, com a paràmetre de tendència central i l'àmbit o rang com a paràmetre de dispersió (Williams,1992). En aquest treball s'ha desenvolupat com a estudi estadístic dels paràmetres representatius de la permeació dels fàrmacs a través de la pell ($P_1, P_2, k_p, T_i, \text{MTT}$) una anàlisi de la variància de dos factors. Donat que, com s'ha comentat anteriorment, la distribució d'aquests paràmetres no segueix una distribució normal s'ha portat a terme, prèviament a l'anàlisi estadístic la transformació de les dades en número de rang. Com a factor fixe es consideren els fàrmacs i com a factor aleatori la pell. Per posar de manifest quins són els paràmetres corresponents als fàrmacs entre els quals es presenten diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$), s'ha aplicat el test de comparació múltiple de Scheffé.

L'objectiu d'aquest estudi estadístic és posar de manifest d'una banda la influència dels fàrmacs en els paràmetres de permeació controlant la variabilitat deguda a la utilització de pell procedent de diferents donants en l'anàlisi comparatiu dels paràmetres transdèrmics dels diferents fàrmacs.

L'estudi de les possibles correlacions entre els paràmetres de permeació dels fàrmacs assajats i les seves propietats físico-químiques, estèriques, electròniques es va portar a terme amb el paquet estadístic SWLREG. Només es va considerar significativa una correlació lineal entre variables quan el nivell de significació va ser més petit del 5% ($p < 0.05$). Les correlacions lineals múltiples es van considerar significatives quan les variables predictorres van resultar significatives per separat ($p < 0.05$). Per tant la significació global amb més variables predictorres ($p < 0.05$) va ser la raó necessària però no suficient per demostrar una correlació lineal múltiple amb la variable dependent. Com a funció de probabilitat s'ha triat la F-distribució que ve descrita per una ratio de la funció de distribució gamma Γ (Li, 1998).