

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA**  
**FARMACÉUTICA**



***SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE GELES  
COMO VEHÍCULOS DE MELOXICAM Y  
ACETATO  
DE VITAMINA E DE APLICACIÓN TÓPICA  
TERAPÉUTICA Y COSMÉTICA***

**TESIS DOCTORAL**

***María Muñoz de Benavides***

GRANADA 2005

**EN COLABORACIÓN CON:**

**EL CENTRO GALÉNICO DE LA FACULTAD DE FARMACIA,  
UNIVERSIDAD DE NAVARRA**



**Y EL DEPARTAMENTO FARMACÉUTICO DE LA  
FACULTAD DE FARMACIA,  
*UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA (ITALIA)***



***María Muñoz de Benavides***

GRANADA 2005

LAS DRAS. DÑA. M<sup>a</sup> ADOLFINA RUIZ MARTÍNEZ Y DÑA. VISITACIÓN GALLARDO LARA, PROFESORAS TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA,

**CERTIFICAMOS:**

Que el presente trabajo de investigación titulado *“Síntesis y caracterización de geles como vehículos de meloxicam y acetato de vitamina E de aplicación tópica terapéutica y cosmética”* ha sido realizado bajo nuestra dirección por la Lda. Dña. María Muñoz de Benavides y constituye su Tesis Doctoral.

Con esta fecha, autorizamos la solicitud de su admisión a trámite ante la Comisión de Doctorado de la Universidad de Granada junto a la presentación de la documentación necesaria para la obtención de la mención de **“Doctorado Europeo”** de esta Universidad de acuerdo con la Regulación propia del Doctorado Europeo, aprobada en Junta de Gobierno de 5 de Febrero de 2001.

Granada, a 14 de Febrero de 2005.

Dra. Visitación Gallardo Lara

Dra. M<sup>a</sup> Adolfin Ruiz Martínez

*La Doctoranda*

María Muñoz de Benavides

La autora de la presente Tesis Doctoral, Dña. María Muñoz de Benavides, ha disfrutado la *Beca de Postgrado para la Formación de Profesorado Universitario* (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte para realizar un trabajo de investigación de acuerdo con los términos de la Resolución de convocatoria de 7 de noviembre de 2000 (B.O.E. 21-11-2000), de la Secretaría de Estado de Educación y Universidades, que le fue adjudicada por resolución de 10 de Abril de 2001 de la Dirección General de Universidades, con Referencia AP2000-2859.

*Agradezco sinceramente a todos los que habéis hecho posible la lectura de esta Tesis Doctoral vuestra colaboración;*

*A las profesoras Dra. Visitación Gallardo Lara y Dra. M<sup>a</sup> Adolfina Ruiz Martínez quienes han dirigido esta Memoria de Tesis y me han acompañado con tesón e ilusión constantes en estos últimos años.*

*A todos los profesores miembros del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, especialmente a aquellos que lo han sido durante mi carrera, y que han facilitado mi trabajo de investigación e iniciación a las tareas docentes.*

*A todos los que han compartido horas de laboratorio conmigo y, así, logrado una dedicación más grata a la investigación, que a veces no lo es tanto. Muy especialmente a Maen, Bea, Yinan, Randa, Maritrini, Magda, Jesús y todos los que han ido pasando por el Departamento durante estos años.*

*A los miembros del Departamento de Física Aplicada directamente relacionados con la Reología; a los profesores D. Ángel Delgado y D. Juan de Dios García así como a los doctorandos por su disponibilidad y acogida en su laboratorio para llevar a cabo los ensayos reológicos.*

*A los miembros del Centro Galénico de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Navarra con quienes aprendí tanto, por su amabilidad y dedicación; muy especialmente a la directora del Departamento Dra. M<sup>a</sup> Jesús Renedo y a la Dra. Pilar Ygartua y Dra. María Blanco quienes de forma directa me introdujeron en el estudio de absorción transdérmica de fármacos.*

*A los miembros del Departamento Farmacéutico de la Facultad de Farmacia de la Università degli Studi di Parma (Italia) por su simpatía y hospitalidad. Menciono especialmente a la profesora Dra. Patrizia Santi quien me acogió con tanta amabilidad para tutelar mi trabajo sobre*

*acumulación y permeación de vitamina E y meloxicam en la piel a partir de la aplicación de preparaciones de administración tópica que son objeto de esta Memoria, agradeciéndole de modo particular su disponibilidad para formar parte del Tribunal encargado de juzgar la Tesis Doctoral. A ella y a su grupo de investigación, muy especialmente a la Dra. Sara Nicoli y a los doctorandos y tesinandas, mi más sincero agradecimiento.*

*Al Dr. Paolo Colombo, director del Departamento Farmacéutico de la Facultad de Farmacia de la Università degli Studi di Parma (Italia) por la suscripción de un informe favorable a la presente Memoria de Tesis para el acceso al Grado de Doctora con Mención Europea.*

*Asimismo, agradezco a los profesores Dra. Begoña Delgado-Charro y Dr. Richard Guy, director del Departamento de Farmacia y Farmacología de la Universidad de Bath (Reino Unido) la emisión del informe indicativo de la idoneidad de este trabajo, permitiéndome completar el cumplimiento de los requisitos para la obtención del Doctorado Europeo.*

*A la Unidad de Cirugía Experimental del Edificio Licio de la Fuente (SAS, Granada), por el suministro de material de experimentación, especialmente a Dña. Amalia de la Rosa, por mostrarse tan disponible a colaborar en la extracción de la piel de cerdo.*

*A los Doctores D. Salvio Serrano, profesor del Departamento de Dermatología de la Facultad de Medicina de Granada y D. Alfonso Abad, Jefe del Servicio de Cirugía del Hospital Carlos Haya de Málaga, por su colaboración en la técnica de extracción de piel de cerdo destinada al estudio de permeación "in vitro".*

*A D. Xavier París, director de los Laboratorios DOMCA, S.A. (Alhendín, Granada) y a la Dra. Pilar García que con tanta solicitud me prestaron su colaboración.*

*A mi familia que, aunque protocolariamente corresponda este enésimo lugar, os debo todo... Somos muchos, gracias a Dios, y os tengo a todos presentes. Sólo cito a tío José Antonio Muñoz-Rojas -tío Pepe- por dejarme hacer uso de algunas de las estrofas de su profusa obra en poesía de la que es, entre otros, Premio Nacional y Premio Reina Sofía de Poesía*

*Iberoamericana, que vienen a colación en esta Memoria de Tesis por su vinculación con el aceite de oliva.*

*A mis amigas del Colegio Mayor Alsajara y del Club Universitario Alfaguara con quienes he convivido durante estos últimos años compartiendo codo con codo estudio, diversión, algún contratiempo y tantas alegrías.*

*A mis amigas del Colegio de la Asunción de Málaga, a las que sigo tan unida, aunque nuestros compromisos personales y profesionales nos vayan esparciendo por el mundo.*

*A todos los que sabéis disculpar que no haya escrito vuestros nombres pero que espero os hayáis sentido aludidos en alguna de las anteriores citas.*

*Vosotros sin olor, duros olivos,  
que árbol no llamaré, que diré hermanos,  
tan amorosos, aunque tan sin manos,  
y tan serenos, aunque tan esquivos;*

...

*vosotros, cuyo tronco es lumbre luego,  
y cuyo fruto aceite que acompaña  
al hombre por su muerte y por su vida.*

José Antonio Muñoz-Rojas  
*POESÍA 1929-1980*

*INDICE*

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

## **I. PARTE TEÓRICA**

<b>I. LA PIEL.....</b>	<b>5</b>
<b>I.1. Anatomía cutánea.....</b>	<b>6</b>
<b>I.2. Histología de la piel.....</b>	<b>7</b>
<b>I.3. Clasificación de los tipos de piel.....</b>	<b>9</b>
<b>I.4. Funciones de la piel.....</b>	<b>13</b>
<b>I.5. Variaciones de la piel normal.....</b>	<b>15</b>
<b>II. FORMAS TÓPICAS.....</b>	<b>19</b>
<b>II.1. Ingredientes cosméticos: Aceites vegetales.....</b>	<b>23</b>
<b>II.1.a. El aceite de oliva.....</b>	<b>26</b>
<b>II.1.a.1. Historia.....</b>	<b>26</b>
<b>II.1.a.2. Composición química.....</b>	<b>27</b>
<b>II.1.a.3. Aplicaciones farmacéuticas y cosméticas.....</b>	<b>30</b>
<b>II.2. Terapia dermatológica.....</b>	<b>37</b>
<b>II.2.a. Formulaciones tópicas: Definición y clasificación.....</b>	<b>37</b>
<b>II.2.b. Principios activos empleados.....</b>	<b>39</b>
<b>II.2.c. Selección de vehículos.....</b>	<b>40</b>
<b>III. VEHÍCULOS DERMATOLÓGICOS.....</b>	<b>42</b>
<b>III.1. Generalidades y formación de geles.....</b>	<b>43</b>

<b>III.2.</b> Lipogeles.....	50
<b>IV. ABSORCIÓN PERCUTÁNEA.....</b>	<b>56</b>
<b>IV.1.</b> Interacciones vehículo-piel.....	56
<b>IV.2.</b> Interacciones vehículo-fármaco.....	57
<b>V. LA CUTE.....</b>	<b>59</b>
<b>V.1.</b> Características estructurales.....	59
<b>V.2.</b> Características funcionales.....	64
<b>V.3.</b> Absorbimento dérmico e transdérmico.....	65
<b>V.4.</b> Vías de penetración.....	66
<b>V.5.</b> Factores que regulan el absorbimento.....	68
<b>V.5.a.</b> Factores ligados a las características del fármaco.....	69
<b>V.5.b.</b> Factores ligados a la estructura e a las condiciones de la cute.....	70
<b>V.5.c.</b> Factores ligados a la composición de la formulación aplicada.....	71
<b>V.6.</b> Promotores químicos de absorbimento.....	71
<b>V.7.</b> Promotores físicos de absorbimento.....	74
<b>V.7.a.</b> Esquema de un sistema transdérmico ionofórico.....	75
<b>V.7.b.</b> Mecanismos de transporte.....	76
<b>V.7.c.</b> Efecto de la corriente en el tejido cutáneo.....	78
<b>V.7.d.</b> Factores que influyen en el transporte ionofórico.....	79
<b>V.7.e.</b> Utilización de la ionoforesis.....	82
<b>VI. MELOXICAM.....</b>	<b>83</b>
<b>VI.1.</b> La inflamación.....	83
<b>VI.2.</b> Consideraciones generales de AINE.....	86

<b>VI.3.</b> Oxicanes.....	90
<b>VI.4.</b> Estructura y propiedades físico-químicas.....	91
<b>VI.5.</b> Farmacodinamia y Farmacocinética.....	96
<b>VI.5.a.</b> Propiedades farmacodinámicas.....	96
<b>VI.5.b.</b> Propiedades farmacocinéticas.....	99
<b>VII. VITAMINA E</b> .....	<b>101</b>
<b>VII.1.</b> Envejecimiento cutáneo.....	101
<b>VII.1.a.</b> Alteraciones fisiológicas de la piel en función de la edad.....	103
<b>VII.1.b.</b> La agresión solar.....	104
<b>VII.1.c.</b> Envejecimiento actínico.....	105
<b>VII.2.</b> Consideraciones generales de vitaminas.....	109
<b>VII.3.</b> Estructura y propiedades físico-químicas.....	110
<b>VII.4.</b> Mecanismo de acción antioxidante.....	113
<b>VIII. REOLOGÍA</b> .....	<b>119</b>
<b>VIII.1.</b> Consideraciones generales.....	120
<b>VIII.2.</b> Conceptos básicos.....	121
<b>VIII.3.</b> Comportamiento reológico de los materiales.....	122
<b>VIII.3.a.</b> Sólidos elásticos.....	122
<b>VIII.3.b.</b> Líquidos viscosos.....	123
<b>VIII.3.c.</b> Materiales viscoelásticos.....	137
<b>VIII.3.c.1</b> Modelos viscoelásticos lineales.....	140
<b>VIII.3.c.2</b> Modelos viscoelásticos lineales en régimen oscilatorio.....	142

<b>OBJETO Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>144</b>
---------------------------------------	------------

## **II. PARTE EXPERIMENTAL**

<b>I. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>149</b>
<b>I.1. Material</b> .....	<b>149</b>
<b>I.1.a.</b> Principios activos.....	149
<b>I.1.b.</b> Composición de los lipogel.....	153
<b>I.1.c.</b> Composición de los hidrogeles.....	157
<b>I.1.d.</b> Otros productos empleados.....	158
<b>I.2. Métodos</b> .....	<b>162</b>
<b>I.2.a.</b> Elaboración de los vehículos oleosos .....	162
<b>I.2.b.</b> Elaboración de las formulaciones de meloxicam.....	164
<b>I.2.c.</b> Elaboración de las formulaciones de acetato de vitamina E.....	166
<b>I.2.d.</b> Caracterización organoléptica de las preparaciones.....	170
<b>I.2.e.</b> Caracterización reológica.....	171
<b>I.2.e.a)</b> Viscosimetría.....	172
<b>I.2.e.b)</b> Oscilometría.....	173
<b>I.2.e.c)</b> <i>Creep-recovery</i> .....	174
<b>I.2.f.</b> Ensayo de liberación en dispositivo de difusión sin membrana.....	174
<b>I.2.g.</b> Estudio de selección de membrana artificial.....	175
<b>I.2.h.</b> Ensayo de cesión en celdas de Franz con membrana artificial.....	177
<b>I.2.i.</b> Ensayo de permeación en celdas de Franz con piel animal.....	184
<b>I.2.i.a)</b> Ensayo de permeación de las formulaciones de meloxicam.....	184
<b>I.2.i.b)</b> Ensayo de permeación de las formulaciones cosméticas.....	186

<b>I.2.j.</b> Iontoforesis.....	187
<b>I.2.j.a)</b> Esquema de un sistema transdérmico iontoforético.....	188
<b>I.2.j.b)</b> Mecanismos de transporte.....	190
<b>I.2.j.c)</b> Efecto de la corriente sobre el tejido cutáneo.....	191
<b>I.2.j.d)</b> Factores que influyen en el transporte iontoforético.....	193
<b>I.2.j.e)</b> Utilización de la iontoforesis.....	196
<b>II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>199</b>
<b>II.1.</b> Caracterización organoléptica de las preparaciones.....	199
<b>II.1.a.</b> Formulaciones oleosas.....	199
<b>II.1.b.</b> Formulaciones hidrofílicas.....	202
<b>II.2.</b> Caracterización reológica de los lipogeles.....	204
<b>II.2.a.</b> Viscosimetría.....	205
<b>II.2.b.</b> Oscilometría.....	228
<b>II.2.c.</b> Creep-recovery.....	242
<b>II.3.</b> Selección de geles como vehículos.....	251
<b>II.3.a.</b> Selección de lipogeles.....	251
<b>II.3.b.</b> Selección de hidrogeles.....	254
<b>II.4.</b> Cinética de liberación de meloxicam.....	255
<b>II.4.a.</b> Ensayo de liberación en dispositivo de difusión sin membrana.....	255
<b>II.4.b.</b> Ensayo de cesión de meloxicam en celdas de difusión de Franz.....	260

<b>II.4.b.1.</b> Selección de membrana.....	261
<b>II.4.b.2.</b> Ensayo de cesión a partir de las formulaciones.....	266
<b>II.4.b.3.</b> Parametrización de las curvas.....	273
<b>II.4.c.</b> Ensayo de permeación en celdas de difusión de Franz.....	276
<b>II.5.</b> Cinética de liberación de acetato de vitamina E.....	286
<b>II.5.a.</b> Ensayo de liberación en dispositivo de difusión sin membrana.....	286
<b>II.5.b.</b> Ensayo de selección de membrana en celdas de difusión de Franz.....	294
<b>II.5.c.</b> Ensayo de permeación en celdas de Franz. Acumulación en la piel y metabolismo de acetato de vitamina E.....	296
<b>III. CONCLUSIONES</b> .....	<b>313</b>
<b>Conclusions</b> .....	<b>325</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>325</b>

## **ANEXOS**

### **ANEXO I.**

**ANEXO I.1.** Técnica de obtención de piel animal..... 1

**ANEXO I.2.** Celdas de difusión de Franz..... 7

**ANEXO II.** Caracterización organoléptica: análisis de extensibilidad..... 1

<b>ANEXO III.</b> Cálculo del área de tixotropía en el estudio viscosimétrico de las series C, D, E.....	1
<b>ANEXO IV.</b>	
<b>ANEXO IV.1.</b> Validación del método de valoración de meloxicam por espectrofotometría UV (I). Estudio estadístico.....	1
<b>ANEXO IV.2.</b> Validación del método de valoración de meloxicam por espectrofotometría UV (II). Estudio estadístico.....	14
<b>ANEXO IV.3.</b> Validación del método de valoración de meloxicam en HPLC-UV. Estudio estadístico.....	24
<b>ANEXO V.</b>	
<b>ANEXO V.1.</b> Estudio estadístico (ANOVA) de la cinética de liberación de meloxicam en el ensayo de selección de membrana en celdas de Franz.	1
<b>ANEXO V.2.</b> Comparación de muestras: Empleo de membrana Durapore y Éster de celulosa.....	13
<b>ANEXO VI.</b>	
<b>ANEXO VI.1.</b> Comparación estadística del parámetro de partición ( $KH$ ) obtenido a partir de la ecuación de permeación aplicada al ensayo de los Lipogeles 1 y 2.....	1
<b>ANEXO VI.2.</b> Comparación estadística del parámetro de difusión ( $D/H^2$ ) obtenido a partir de la ecuación de permeación aplicada al ensayo de los Lipogeles 1 y 2.....	2
<b>ANEXO VI.3.</b> Estudio estadístico de comparación del flujo de permeación de meloxicam desde Hidrogel (sin aplicación de iontoforesis) y Lipogel 2.....	3

<b>ANEXO VI.4.</b> Estudio estadístico (ANOVA) de comparación de los flujos de difusión de meloxicam en ensayo de permeación (sin iontoforesis): Lipogeles 1 y 2.....	4
<b>ANEXO VI.5.</b> Estudio estadístico (ANOVA) de comparación del flujo de difusión de meloxicam en ensayo de permeación (con y sin iontoforesis): Hidrogel (pH 4).....	5
<b>ANEXO VI.6.</b> Estudio estadístico (ANOVA) de comparación de los flujos de difusión de meloxicam en ensayo de permeación (con iontoforesis): Hidrogel (pH 4 y 7).....	6
 <b>ANEXO VII.</b>	
<b>ANEXO VII.1.</b> Validación del método de valoración de acetato de $\alpha$ -tocoferol por espectrofotometría UV (I). Estudio estadístico.....	1
<b>ANEXO VII.2.</b> Validación del método de valoración de acetato de $\alpha$ -tocoferol por espectrofotometría UV (II). Estudio estadístico.....	9
<b>ANEXO VII.3.</b> Validación del método de valoración de acetato de $\alpha$ -tocoferol por HPLC-UV (I). Estudio estadístico.....	18
<b>ANEXO VII.4.</b> Validación del método de valoración de $\alpha$ -tocoferol por HPLC-UV (II). Estudio estadístico.....	26
 <b>ANEXO VIII.</b>	
<b>ANEXO VIII.1.</b> Comparación de los perfiles de liberación de AcVE desde hidrogeles en el ensayo de difusión sin membrana.....	1
<b>ANEXO VIII.2.</b> Comparación de los perfiles de liberación de AcVE desde lipogeles en el ensayo de liberación.....	4

## **PUBLICACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Congresos Nacionales

Congresos Internacionales

Publicaciones en revistas científicas

## *INTRODUCCIÓN*

La piel es el ámbito de aplicación común a las formulaciones dermatológicas con fines terapéuticos y a los productos cosméticos.

“Existe una y solo una investigación cutánea; el investigador debe decidir si dirige la aplicación de sus resultados hacia un uso fisiológico o patológico” (Günter Stüttgen).

Con este criterio se deduce que la dermatología y la cosmetología están realmente relacionadas: cuando con unas investigaciones se alcanzan soluciones terapéuticas, al mismo tiempo se están aportando conocimientos básicos que son útiles para la ciencia cosmética (Pons L, 1995).

En el ámbito de la cosmética no se admite ningún efecto terapéutico y se excluye sistemáticamente el binomio beneficio/riesgo por ser propio del medicamento. Además, la única vía de aplicación aceptable para los productos cosméticos es la tópica, siempre que dicha aplicación se realice sobre piel sana (Doménech J, 1998).

Sobre la piel se aplican diversos tipos de formulaciones que, en cuanto a su naturaleza físico-química, pueden presentarse como polvos, preparaciones de consistencia semisólida o como preparaciones líquidas.

Resultan de gran interés los geles, preparaciones tridimensionales formadas por la adición de polímeros orgánicos, incluidas proteínas, polisacáridos y coloides sintéticos a líquidos apropiados. Los más comunes en su empleo farmacéutico son las soluciones acuosas e hidroalcohólicas. Muchos geles poliméricos presentan reversibilidad entre el estado de gel y la solución, que es la fase fluida que contiene al polímero solubilizado. Sin embargo, la formación de algunos geles poliméricos es irreversible debido a que sus cadenas están unidas mediante enlaces de tipo covalente.

Los geles pueden presentar diversos grados de rigidez en función del número de enlaces covalentes que contengan, la densidad de uniones físicas internas o, simplemente, la cantidad de líquido que los forme. Los polímeros formadores de geles dan lugar a productos con índices variables de rigidez, desde el estado de solución hasta los mucílagos, geles e hidrogeles, que son los más rígidos.

Todas estas formas gelificadas tienen aplicación farmacéutica; algunos geles tienen aplicación terapéutica por sí mismos mientras que, otros, sirven como vehículos o excipientes en la administración de fármacos (Boylan JC, 1988).

Tal es el interés del presente trabajo que ha pretendido, previa caracterización organoléptica y reológica de una serie de lipogeles elaborados a base de aceite de oliva, la selección de los más adecuados como excipientes para la administración de meloxicam –fármaco antiinflamatorio no esteroídico, AINE- como alternativa terapéutica de acción local para el tratamiento de osteoartrosis y artritis reumatoide con menor probabilidad de producir efectos adversos indeseables (Doliwa A, 2001; Gupta SK, 2002).

Asimismo, se ha desarrollado una vertiente cosmética de aplicación de los lipogeles así como de hidrogeles convencionales al emplearse como vehículos para la incorporación de acetato de vitamina E de acción antioxidante y, por tanto, eficaz en la prevención del envejecimiento cronológico cutáneo y fotoenvejecimiento.

## *I. PARTE TEÓRICA*

## **I. LA PIEL**

La piel cubre toda la superficie corporal y continúa, a nivel de los orificios naturales, con el epitelio de los aparatos digestivo, respiratorio y genitourinario. La piel es una membrana de función protectora que interviene con sus anejos –pelos, uñas y glándulas- en un gran número de actividades fisiológicas que tienden a mantener la homeostasis, esto es, la constancia del medio interno. La piel protege al organismo del medio externo de varios modos:

1. Es una barrera selectiva frente a microorganismos y sustancias químicas;
2. Es una barrera selectiva para determinadas formas de energía – calorífica, luminosa, etc.-;
3. Es un órgano en donde radican receptores nerviosos que permiten recibir información –tacto, temperatura- del medio externo (Torralba A, 1978).

La piel es el ámbito de aplicación de la ciencia cosmética que, según la definición de la Real Academia, es el “Arte de preparar productos para hermostear el cutis o cabello y conservar su belleza o frescura”.

El arte de la cosmética necesita asentarse en un conocimiento científico de la piel, ya que este conocimiento constituye la base imprescindible donde edificar el arte.

## **I.1. ANATOMÍA CUTÁNEA**

Aunque la piel puede ser descrita como una sola entidad morfológico-funcional, es realmente un órgano heterogéneo que contiene diversos “subórganos” y que varía grandemente según las regiones del cuerpo. Para apreciar las variaciones regionales de la piel basta comparar la piel de las palmas de las manos, de la cara o de las axilas. En cada una de estas regiones la piel tiene muy diferentes características de grosor, flexibilidad, marcas superficiales, pigmentación, actividad glandular y pilosidad.

El órgano más pesado de nuestra economía es la musculatura esquelética, que representa el 40% de nuestro peso corporal, seguido de la piel de la que no se pueden dar cifras concretas, puesto que su tamaño y peso dependen de la altura y grosor de la persona (Armijo M, 1998).

La superficie corporal humana y, por tanto, la extensión de la piel, ha sido calculada por diversas fórmulas. De todas ellas, la más acertada es la de Du Bois, obtenida en base a medidas de la superficie corporal logradas mediante moldes de papel aplicados sobre el cuerpo.

La coloración de la piel varía marcadamente según las diversas razas, siendo la coloración la característica fundamental en el establecimiento de las diferencias raciales. La diversa coloración se debe a la existencia de pigmentos en mayor o menor grado, a modificaciones en la circulación y a la presencia de hemoglobina en diversos grados de

oxigenación. La piel está siempre más pigmentada en las zonas descubiertas y a nivel de las areolas mamarias y áreas genitales.

La superficie cutánea no es lisa sino que presenta diversos pliegues. Estos pliegues son de varios tipos. Algunos pueden ser claramente visibles y producidos por los movimientos musculares y articulares, que aumentan o disminuyen en relación con el panículo adiposo. Citemos, por ejemplo, los pliegues de las muñecas, de los tobillos, los pliegues submamarios, etc. que, muchas veces, son de gran importancia cosmética y patológica, ya que en ellos se crean condiciones favorables para la instauración de alteraciones de la piel.

La piel humana, a excepción de las palmas de las manos y plantas de los pies, está revestida de pelo.

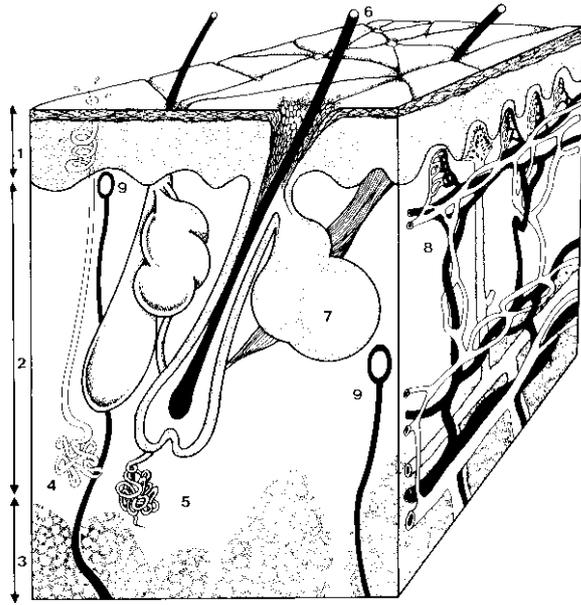
## **I.2. HISTOLOGÍA DE LA PIEL**

La piel, nuestra cubierta o membrana externa, indispensable para la vida, consta de tres capas bien diferenciadas: epidermis, dermis e hipodermis (Peyrefitte G, 1995). El contacto con el exterior se produce por medio de la epidermis, estrato celular poliestratificado de 200 micras de espesor máximo que, procedente de una capa basal germinativa, se multiplica rápidamente ("tiempo de regeneración celular" o "*turnover rate*") y va queratinizándose mientras asciende para quedar eliminada en la capa más externa. Este epitelio carece de vasos y nervios, pero tiene

dos tipos de anejos: unos, glandulares (glándulas sebáceas y sudoríparas eccrinas y apocrinas) y, otros, queratinizados (pelos y uñas). Inmediatamente por debajo, y separada por la membrana basal, se encuentra la dermis, estrato conjuntivo 20 a 30 veces mayor que la capa anterior, que alberga en su interior los plexos vasculonerviosos y sirve de sostén a los anejos. Es la capa más importante de nuestro organismo y controla totalmente al epitelio, cuya misión es precisamente proteger a la dermis de traumatismos exteriores, tanto mecánicos (con los queratinocitos) como actínicos (con los melanocitos); por ello, cuando la dermis se altera y se produce lo que conocemos como "degeneración actínica crónica", pierde el control epitelial y pueden multiplicarse las células epiteliales de un modo anormal, produciéndose elementos precancerosos y, más adelante, cancerosos. Por debajo de la dermis se encuentra la hipodermis o tejido celular subcutáneo que, además de contener algunos elementos vasculonerviosos, es un perfecto aislante del calor y sirve de protección a los órganos internos frente a los traumatismos. Debajo, existe una fascia fibrosa profunda, límite cutáneo y, en consecuencia, auténtico límite anatómico de la cirugía dermatológica.

La piel no es uniforme en toda la superficie cutánea, pues se adapta a las funciones que tiene que cumplir. Por ejemplo, en palmas y plantas tiene misión de protección y, en consecuencia, muestra una epidermis muy gruesa, con una gran capa córnea y una hipodermis también voluminosa; mientras que, en los párpados, la piel es muy fina y sensible.

**Figura 1.** Estructura de la piel:  
1, epidermis; 2, dermis; 3, hipo-  
dermis; 4, glándula sudorípara  
ecrina; 5, glándula apocrina;  
6, pelo; 7, glándula sebácea; 8,  
vasos; 9, nervios.



### **I.3. CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE PIEL**

En íntima relación con el manto ácido lipídico y la cosmética dermatológica, las secreciones que se vierten en la superficie cutánea son responsables de los “tipos base” de cutis en un individuo. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estados fisiológicos y patológicos pueden modificar la emulsión y, en consecuencia, el tipo de piel; esto se conoce como “inversión de fase”.

#### ▪ **PIEL EUDÉRMICA**

Fina, lisa, flexible y lubricada. Sólo observable en niños -“piel infantil”-, donde todos los componentes del manto ácido cutáneo lipídico están aún en las proporciones adecuadas. Disminuyendo un poco el rigor del criterio, también se considerarían eudérmicas aquellas pieles no demasiado grasas o secas, ni deshidratadas o sobrehidratadas; es decir, que se presentan como simples variaciones dentro de la normalidad (Quiroga MI, 1973).

#### ▪ **PIEL GRASA**

Brillante, engrosada y untuosa al tacto, especialmente en áreas sebóreas, como surcos nasogenianos, por predominio de la secreción sebácea. Se distinguen tres tipos:

a) Piel grasa bien hidratada, donde las excreciones de lípidos hidrofílicos, como colesterol, y el sudor están aumentados con lo que las emulsiones oleoacuosas se mantienen.

b) Piel con evidentes gotas de grasa, donde la secreción sebácea no llega a emulsificarse. Las formas localizadas y poco intensas son fisiológicas y comunes en casi todos los adolescentes.

c) Piel grasa y seca, opaca, seca al tacto y con descamación porque disminuyen los lípidos hidrofílicos y, aunque también disminuye el sudor, no se forma la emulsión. Tiene pH alcalino. Pueden, también, existir pieles mixtas con seborrea central y sequedad en las zonas laterales, que tienen gran interés cosmético.

- **PIEL ALÍPICA**

Es la llamada “piel hiperinfantil” pues es fina, blanca, seca, fisurada, congestiva e irritable debida a una insuficiente secreción lipídica, aunque la sudoral es normal. Se encuentra con frecuencia en niños y mujeres rubias y de raza celta o nórdica. Sucede por factores endógenos, como los de personas con gran labilidad neurovegetativa – pieles rosaceiformes- o externos, por el uso de jabones alcalinos, aguas calcáreas o cosméticos con energicos liposolventes.

- **PIEL DESHIDRATADA**

Piel seca por menor imbibición acuosa. Hay tres tipos:

- a) Piel seca y grasa.
- b) Deshidratación de piel eudérmica, resultado de la exposición a climas secos, como “baños de sol” que favorecen la evaporación del sudor. Esta situación puede ser reversible y restablecerse la eudermia.
- c) Piel senil por deshidratación fisiológica al decrecer la eliminación sudoral y lipídica. Disminuye la actividad de glándulas sudorales y no hay producción de hormonas foliculares y testiculares ni de mineralcorticoides por lo que se altera la hidratación tisular.

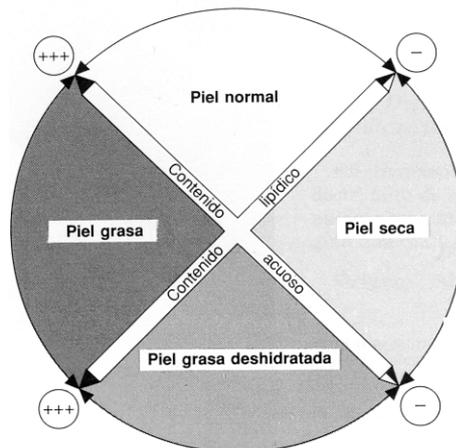
- **PIEL HIDRATADA**

Por aumento relativo de imbibición acuosa. Frecuente en estados fisiológicos como embarazo, donde aumentan los estrógenos que favorecen la hidrofilia e hidropexia cutánea y también en estados

patológicos como hiperhidrosis palmoplantar, hiperhidrosis del hiper-tiroideo, etc. Puede aparecer por contactos reiterados con agua o viento húmedo.

#### ▪ PIEL MIXTA

En una misma persona pueden coexistir seborrea en la zona centrofacial y sequedad e irritabilidad en las laterales. Son posibles otras combinaciones de variantes regionales entre zonas faciales o entre la piel de la cara y del cuerpo. El fenómeno normal de las “inversiones de fase” puede hacer suceder alternadamente en la piel de un mismo sujeto los distintos tipos de emulsión, cambiando por tanto sus características cosméticas. Esto, junto a los cambios transitorios ambientales, determinan cambios cutáneos que deberán tenerse en cuenta para aplicar los cuidados higiénicos y cosméticos no de manera genérica y rutinaria, sino acomodándolos a las particularidades y variaciones individuales.



**Figura 2.** Clasificación de los tipos de piel. Existe un equilibrio ideal que corresponde a la piel normal. A su alrededor existen numerosos matices con tendencia hacia la piel grasa o la piel seca.

#### **I.4. FUNCIONES DE LA PIEL**

Se podrían definir, en conjunto, las siguientes: protección, termorregulación, sensación, secreción, excreción, soporte y almacenamiento.

##### **- Epidermis:**

**Protección:** Mediante su especial textura y composición protege a los órganos internos de traumatismos mecánicos, físicos y químicos, a la vez que evita la pérdida de agua y electrolitos desde el interior. De traumas *mecánicos* protege mediante los estratos dérmico e hipodérmico, que actúan a modo de cojinetes y, además, con el crecimiento -engrosamiento epitelial-; de los *físicos*, como radiaciones ultravioleta (UV), mediante la pigmentación epidérmica y absorción de estas radiaciones a distintos niveles; y, de los *químicos*, impidiendo su paso a través de un epitelio celular compacto. Este último estrato y, por la misma razón, evita las pérdidas internas.

**Termorregulación:** Mediante los fenómenos de vasodilatación y vasoconstricción en los plexos vasculares cutáneos se aumenta o reduce la temperatura de la piel; y, en situaciones de calor exterior extremo, la secreción sudoral ecrina refresca la superficie cutánea.

**Sensación:** Tacto, presión, temperatura, dolor y prurito son captados por receptores sensoriales libres y/o corpúsculos sensoriales que los transmiten al sistema nervioso central por los cordones medulares dorsales.

**Secreción:** Las glándulas de secreción pueden ser *ecrinas* (ec: fuera; crina: secreción), como sucede con las sudoríparas ecrinas y, en este mismo orden, podríamos considerar la citocrinia melánica desde el melanocito; *apocrina* (apo: fuera; secreción de la parte superior de la célula), propia de las sudoríparas apocrinas y glándula mamaria; y *holocrinas* (secreción de la totalidad celular), representadas por las glándulas sebáceas y el propio epitelio epidérmico.

**Excreción:** A través de la piel se eliminan muy pocas sustancias pero no hay que olvidar que, en determinadas situaciones patológicas, al producirse grandes cantidades de capa córnea, se pueden perder elementos constitutivos del epitelio, especialmente azufre y proteínas. En la excreción también debemos considerar la *perspiratio insensibilis*, que es la pérdida de agua diaria a través de la superficie de la piel, sin relación con la secreción ecrina y que, para un varón de 70 Kg que se correspondería con una superficie de 1,80 m<sup>2</sup>, es de unos 350 ml.

- **Dermis:**

**Protección:** Ya que el tejido conjuntivo supondrá una segunda línea de defensa frente a traumatismos. Es la función más importante. Cuando se aplica una fuerza sobre la epidermis, ésta la transmite a la dermis superficial y el gel fluido que la compone la disipa haciendo que no sea fácil de romper la cohesión epidérmica. La dermis reticular es resistente a los traumas.

**Soporte:** Al mantener el sistema vasculo-nervioso y anexial.

**Almacenamiento:** Tanto en el sistema vascular como, a veces, en la sustancia fundamental.

**Aislante:** Mantiene la temperatura corporal.

- **Hipodermis:**

**Protección:** Defiende las estructuras orgánicas frente a los traumas mecánicos.

**Reserva:** Sirve de reserva y depósito de calorías por lo que, cuando la alimentación es insuficiente, el tejido adiposo de ciertas zonas disminuye. Las zonas que normalmente no se afectan cuando el individuo está hipoalimentado son las que cumplen misiones de protección como, por ejemplo, palmas y plantas.

## **I.5. VARIACIONES DE LA PIEL NORMAL**

La piel, como ya se ha visto, es el órgano que más variantes sufre en estado normal no sólo entre las diferentes personas sino también en las distintas zonas cutáneas de cada una. Estas variaciones están condicionadas por factores biológicos individuales y por otros agentes ambientales de distinta calidad e intensidad; es clásica su agrupación en

“intrínsecos” y “extrínsecos”, respectivamente.

Los factores intrínsecos son complejos y de acción parcialmente conocida como la actividad hormonal, el equilibrio neuro-endocrino, las influencias psicológicas, las particularidades genéticas, la acción cronológica, etc. Se consideran como más importantes la herencia, el sexo y la edad.

- **La herencia:**

La persona nace con un tipo de piel, condicionada por factores genéticos que determinan caracteres raciales o familiares. Estos caracteres se manifiestan precozmente en la respuesta a estímulos, así como en la posible predisposición a malformaciones y distrofias. Imponen una constitución o disposición hereditaria, morfológica y funcional de la que dependerá en gran parte el futuro dermatológico del individuo. La piel se irá adaptando paulatinamente pudiendo modificar las características hereditarias según el funcionamiento de todo el organismo, con sus particularidades de acuerdo con el sexo, la edad y el contacto directo con el mundo exterior. Esta combinación de herencia y ambiente o disposición y exposición constituye el marco que dará origen a las diversas variantes.

- **El sexo:**

La adolescencia y pubertad, después de atravesar los años de frecuente inestabilidad endocrino-sexual, conducen al establecimiento de

los caracteres morfológicos y funcionales propios de cada sexo. La piel en la mujer es lampiña, rosada, lisa y aterciopelada; en general, más tensa, tibia y grasa al tacto que en el hombre. La superficie cutánea puede presentar, dentro de un estado normal, distintos aspectos incluidos entre los siguientes extremos: piel grasosa con poros abiertos y pastosa al pellizcamiento, o bien, áspera, seca y con tendencia a la fina descamación. El interés cosmético es tan grande que ha llevado a una clasificación de los tipos anteriores.

Las reacciones vasomotoras también ejercen su influencia. La labilidad vasomotora e inestabilidad neuro-vegetativa suelen producir eritemas repentinos y fugaces que, con el tiempo, pueden llegar a constituir finas dilataciones vasculares llamadas telangiectasias y enrojecimientos permanentes que sobrevienen como consecuencia de múltiples estímulos.

El período menstrual intensifica estos trastornos funcionales e induce la aparición de dermatosis reaccionales, eccemas y urticarias debido a la sobrecarga acuosa de los tejidos y el aumento del tono simpático. La gestación puede producir pigmentaciones parduzcas en la cara que desaparecen después del parto.

En el hombre adulto es natural la presencia de barba y bigote y, algunos hábitos como el rasurado diario y la permanencia a la intemperie, pueden favorecer el desarrollo de foliculitis, sicosis, dermatitis reaccionales, atrofias y degeneraciones seniles precoces.

- **La edad:**

Cada etapa de la vida del hombre imprime a la piel caracteres propios en su estructura y actividad, en sus alteraciones menores e incluso en su patología, que determinan la conveniencia de un conjunto de cuidados higiénicos, cosméticos, terapéuticos y profilácticos peculiares. Así, se podría considerar la piel de la niñez, la pubertad y juventud, la adultez, el climaterio y la senilidad.

## **II. FORMAS TÓPICAS**

Las investigaciones sobre la biología de la piel y sus anejos se producen a un ritmo vertiginoso, proporcionando no sólo unos fundamentos sólidos para conocer mejor la fisiología cutánea, sino también nuevos enfoques que permitan sacar provecho de estos avances y aplicarlos a los productos destinados al cuidado de la piel.

Las recientes tendencias en cosmetología sólo pueden comprenderse en base a un conocimiento riguroso de la piel en el ámbito de la fisiología, bioquímica y biología, incluyendo la biología molecular. Sin embargo, las propiedades esenciales de los cosméticos, en especial su inocuidad, eficacia y cierta cualidad cosmética que permite que su uso sea agradable, dependen sobre todo de una combinación de esfuerzos científicos multidisciplinarios. Es muy importante que se comprendan con precisión los principales aspectos implicados en la toxicología cutánea y percutánea incluyendo, en particular, el fenómeno de la absorción. También deben controlarse de forma apropiada las vías a través de las cuales los cosméticos alcanzan sus objetivos. Este aspecto, a su vez, depende de la experiencia que se disponga sobre las propiedades de todos los tipos de materias primas –tanto de los ingredientes activos como de los vehículos- y del acierto de sus formulaciones. También es preciso tener en cuenta el tacto y la sensación cutánea que aporte la fórmula realizada (Pons L, 1995).

“Existe una y solo una investigación cutánea; el investigador debe decidir si dirige la aplicación de sus resultados hacia un uso fisiológico o patológico” (Günter Stüttgen).

Con este criterio está implícito que la dermatología y la cosmetología están realmente relacionadas: cuando con unas investigaciones se alcanzan soluciones terapéuticas, al mismo tiempo se están aportando conocimientos básicos que son útiles en el ámbito de la cosmética.

En la Directiva Europea de Cosméticos vigente se define un producto cosmético como “toda sustancia o preparado destinado a ser puesto en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano –epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos- o con los dientes y mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto y/o corregir los olores corporales y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado”.

Esta larga y detallada definición ha sido y sigue siendo motivo de controversia aunque en ella está implícita la doble función preventiva que deben ejercer los productos cosméticos:

- Lograr la higiene y protección del epitelio y de sus anejos;
- Propiciar su embellecimiento y la corrección de sus problemas estéticos.

En el ámbito de la cosmética no se admite ningún efecto terapéutico y se excluye sistemáticamente el binomio riesgo/beneficio por ser propio del medicamento. Además, la única vía de aplicación aceptable para los productos cosméticos es la tópica, siempre que dicha aplicación se realice sobre piel sana (Doménech J, 1998).

Los productos cosméticos, cuando se aplican correctamente, no deben provocar ningún tipo de intolerancia cutánea –en particular de carácter irritativo o alérgico-. En general, se cumplen todas estas condiciones aunque existen datos estadísticos que demuestran la incidencia esporádica de una respuesta alérgica individualizada tras la aplicación de un determinado cosmético.

Con el fin de reducir al máximo la aparición de esta intolerancia, se están llevando a cabo importantes proyectos de investigación encaminados a garantizar que los ingredientes cosméticos de cada fórmula no sean potencialmente alérgicos. Asimismo, en ciertas formulaciones se incorporan aditivos que pueden minimizar o anular cualquier riesgo de intolerancia.

El mejor conocimiento de la función barrera del estrato córneo y el convencimiento de que, si se potencia la eficacia de esta barrera se podría reducir la incidencia de problemas alérgicos, justifican los esfuerzos de investigación destinados a incluir por vía tópica los componentes que puedan reforzar este importante mecanismo de defensa.

Mediante esta estrategia científica puede convertirse en una realidad la función protectora que la legislación asigna a los productos cosméticos, lo cual incrementaría la utilidad potencial de muchos de ellos.

En este sentido, los filtros solares constituyen un ejemplo claro ya que las escasas sensibilizaciones detectadas por los dermatólogos podrían anularse si en las formulaciones se incorporan aditivos específicos capaces de incrementar la función barrera del estrato córneo.

Todo lo anterior ha ejercido una gran influencia en nuestro grupo investigador para profundizar en el estudio de los lipogeles elaborados a base de aceite de oliva atendiendo a las propiedades protectoras y regeneradoras de la piel de ciertos componentes que incluye esta grasa vegetal. Su compatibilidad con los lípidos fisiológicos confiere al aceite de oliva la capacidad de restablecer el equilibrio lipídico en el estrato córneo consiguiendo esta pretendida función protectora (Rigano L, 1999).

En determinadas circunstancias es difícil delimitar la frontera existente entre una acción cosmética y un efecto terapéutico, tanto desde el punto de vista de los problemas inestéticos o patológicos asociados con la piel como las medidas adoptadas para solucionarlos.

## **II.1. INGREDIENTES COSMÉTICOS: ACEITES VEGETALES**

Los vegetales suelen contener cantidades variables de lípidos y, en algunos géneros, especialmente aquellos que producen semillas oleaginosas, abundan los aceites. Éstos son líquidos, constituidos mayoritariamente por triglicéridos: ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga –con alta proporción de ácido oleico-, esterificados con la glicerina.

Los aceites son hidrófobos, insolubles en agua, más o menos fáciles de emulsionar. Actúan como disolventes de algunos compuestos orgánicos; poseen baja volatilidad y siempre son líquidos a 21°C.

Muchos de los aceites vegetales utilizados en cosmética son sometidos a especiales procesos de extracción y purificación a fin de que sus características organolépticas sean satisfactorias. Con frecuencia son decolorados, desodorados y sometidos a tratamientos que reduzcan su índice de acidez y peróxidos.

El riesgo de enranciamiento de las cadenas grasas insaturadas es un problema de relevancia y exige, no sólo disponer de aceites no oxidados en el momento de la formulación sino también del empleo de un determinado sistema antioxidante que se debe incorporar a la fórmula cosmética.

Además de triglicéridos, los aceites contienen casi siempre en proporciones muy bajas otros componentes lipófilos: alcoholes grasos, hidrocarburos, vitaminas, fitosteroles, lecitinas, etc.

Son precisamente estos constituyentes minoritarios los que justifican, en muchas ocasiones, su uso cosmético ya que, además de la acción hidrófoba y protectora –muy parecida a la de los aceites minerales-, poseen una capacidad eutrófica que puede mejorar las características de la piel alípica y descamante.

El uso cosmético de aceites vegetales puede ser complicado y existe la posibilidad de utilizar ésteres sintéticos estables que posean las características organolépticas deseadas a los que se incorporan los insaponificables vegetales más adecuados.

Sin embargo, es probable que en ciertos casos se utilicen aceites vegetales conocidos en proporciones incluso simbólicas como reclamo “natural” del cosmético, así como aceites “exóticos” que poseen supuestamente funciones correctoras de los inestetismos cutáneos.

Seguidamente se nombran algunos de los aceites considerados de interés cosmético:

- *Arachis hypogea*, aceite de cacahuete
- *Borrago officinalis*, aceite de borraja
- *Carthamus tinctorius*, aceite de cartamo

- *Ceratonia siliqua*, aceite de germen de algarrobo
- *Corylus avellana*, aceite de avellana
- *Cocos nucifera*, aceite de coco
- *Elaeis guineensis*, aceite de palma
- *Gossipium herbaceum*, aceite de algodón
- *Helianthus annuus*, aceite de girasol
- *Juglans regia*, aceite de nuez
- *Linum usitatissimum*, aceite de lino
- *Oenothera biennis*, aceite de onagra
- *Olea europaea*, aceite de oliva
- *Oryza sativa*, aceite de germen de arroz
- *Persea gratissima*, aceite de aguacate o avocado
- *Prunus amigdalus*, aceite de almendras dulces
- *Ricinus comunis*, aceite de ricino
- *Sesamum indicum*, aceite de sésamo
- *Soja hispida*, aceite de soja
- *Triticum sativum*, aceite de germen de trigo
- *Vitis vinifera*, aceite de uva.
- *Zea mais*, aceite de maiz.

## **II.1.a. EL ACEITE DE OLIVA**

### **II.1.a.1. HISTORIA**

El olivo, *Olea europaea*, fue introducido en la península ibérica por fenicios y griegos varios siglos a. de C. Los romanos expandieron su cultivo y mejoraron las técnicas de producción del aceite. Su comercio – por vía marítima- tuvo un papel primordial en el desarrollo de la economía mediterránea. Los aceites de Hispania, la mayor proveedora de este preciado líquido, eran considerados como los de mayor calidad y consumidos habitualmente en Roma y otras partes del Imperio.

Pero el aceite de oliva tenía también otras utilidades además de la alimentación. Era un símbolo religioso, medicinal y nutritivo. Con él se ungían reyes, atletas y recién nacidos; se utilizaba como producto de higiene y belleza; como combustible para iluminar las lámparas de los templos; como lubricante para las herramientas y enseres del campo; como impermeabilizante para fibras textiles...

La invasión árabe en España potenció aún más su cultivo y perfeccionó las técnicas de obtención de aceite. La vinculación fue tan estrecha que la palabra española “aceite” proviene del árabe “*al-zait*” que significa jugo de aceituna.

El olivo fue llevado al Nuevo Mundo por los españoles durante los siglos XVI y XVII y hoy se encuentra en California y diversas partes de Sudamérica.

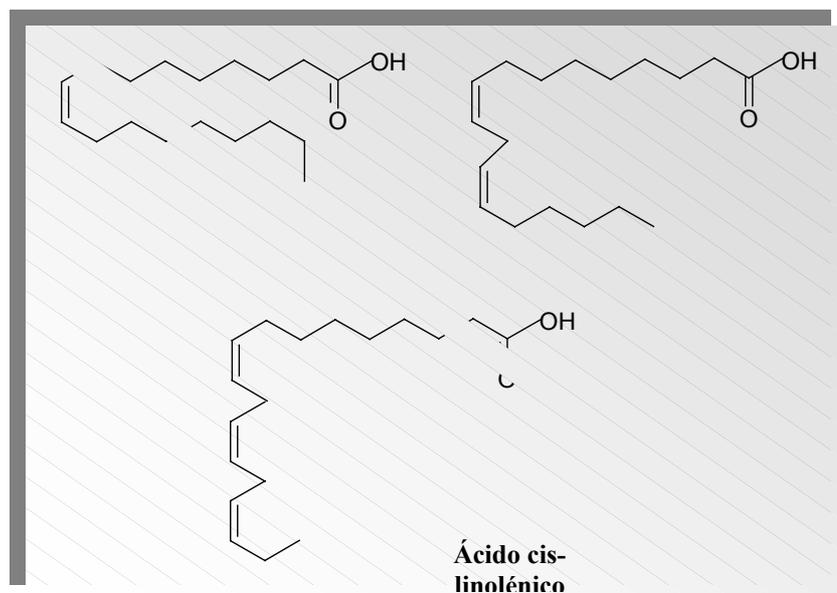
En la actualidad España es el primer país productor y exportador de aceite de oliva del mundo.

### **II.1.a.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA**

El aceite de oliva está compuesto principalmente por moléculas de triacilglicerol o triglicéridos. Químicamente hablando, estos productos derivan de la esterificación de tres moléculas de ácidos grasos con una de glicerol. De forma simplificada, la molécula de glicerol esterificada puede ser representada por la forma de “E” con ácidos grasos de mayor o menor longitud en su cadena hidrocarbonada unidos a una estructura de tres carbonos. En el caso particular del aceite de oliva, la longitud de los ácidos grasos oscila entre 12 y 24 átomos de carbono. De esta manera, los triacilgliceroles se asemejan a una molécula en forma de “E” elongada con tres extensiones que corresponden a las cadenas grasas (Ben Miled DD, 2000).

Existen diversos tipos de ácidos grasos en la naturaleza. Difieren en su longitud –o número de átomos de carbono de la cadena- así como en el tipo de enlaces químicos presentes en la misma. La mayoría de estos

enlaces carbono-carbono de la cadena son enlaces simples. Sin embargo, algunos ácidos grasos presentan dobles enlaces. Los ácidos grasos que no presentan dobles enlaces a lo largo de su cadena se denominan **ácidos grasos saturados**, tales como el ácido palmítico (16 átomos de carbono), ácido esteárico (18 átomos de carbono) y ácido araquídico (20 átomos de carbono). Aquellos ácidos grasos que, en cambio, presentan algún doble enlace a lo largo de su cadena, reciben el nombre de **ácidos grasos monoinsaturados**, como el ácido palmitoleico (16 átomos de carbono) y el ácido oleico (18 átomos de carbono). Este último es el más abundante en la naturaleza. La molécula del ácido oleico presenta un doble enlace entre el carbono en posición 9 y el carbono 10.



**Figura 3.** Estructuras de algunos de los ácidos grasos más abundantes en el aceite de oliva

El enlace simple se caracteriza por una completa capacidad de giro rotacional alrededor de su eje longitudinal mientras que el doble enlace es una estructura rígida que no permite la libertad de movimiento anterior. Este fenómeno da lugar a la esteroisomería o formación de moléculas isómeras, de igual estructura química pero diferente conformación espacial. Este cambio de forma da lugar a diferencias en cuanto a la reactividad química y, por tanto, en sus efectos sobre la salud. Cada isómero recibe un nombre: *trans* y *cis*.

Los ácidos grasos *trans* se producen como consecuencia de la modificación química artificial al convertir el aceite en margarina. Estas formas contribuyen al aumento de las lipoproteínas de tipo LDL, de conocida capacidad aterogénica, y disminuye las HDL, de carácter protector frente a esta patología.

El ácido oleico es un ácido graso *cis* o, más exactamente, un ácido C18 monoinsaturado *cis*.

Otro tipo de ácidos grasos son aquellos que presentan más de una insaturación o doble enlace a lo largo de la cadena hidrocarbonada y reciben el nombre de ácidos poliinsaturados. En el aceite de oliva el máximo número de insaturaciones que se pueden presentar en la cadena es tres, mientras que ciertos ácidos grasos procedentes del pescado pueden tener hasta seis dobles enlaces.

Cuanto mayor sea el número de dobles enlaces, el ácido graso es menos estable y más susceptible a la hidrólisis por acción de la luz, el calor, etc. Esta es la razón por la cual el aceite de oliva, constituido fundamentalmente por ácido oleico monoinsaturado, es mucho más estable al calor que otros aceites de semillas altamente insaturados.

Como ejemplo de ácido graso poliinsaturado con dos insaturaciones citamos el ácido linoleico (18 átomos de carbono). El ácido linolénico, de la misma longitud, tiene tres dobles enlaces en su cadena alifática.

Los triacilgliceroles se componen normalmente de una mezcla de ácidos grasos de los mencionados anteriormente. La forma más prevalente en el aceite de oliva es el triacilglicerol-oleico-oleico-oleico (OOO), seguido en orden de incidencia por el palmítico-oleico-oleico (POO), oleico-oleico-linoleico (OOL), palmítico-oleico-linoleico (POL), esteárico-oleico-oleico (EOO), etc.

### **II.1.a.3. APLICACIONES FARMACÉUTICAS Y COSMÉTICAS**

El aceite de oliva ha sido considerado como bálsamo medicinal desde hace siglos. Estos usos terapéuticos tradicionales se están estudiando en la actualidad y en todos los casos y en otros nuevos dichas aplicaciones tienen un fundamento científico.

## APLICACIONES TERAPÉUTICAS

- **Enfermedad coronaria:**

El aceite de oliva que aporta la dieta tiene una acción beneficiosa en el sistema cardiovascular. Numerosos estudios avalan que esta grasa ayuda a controlar la presión arterial, mejora el perfil lipídico de la sangre y, sobre todo, previene la oxidación de las lipoproteínas de bajo peso molecular –LDL-, factor clave en el desarrollo de la aterosclerosis.

Los resultados de un reciente estudio llevado a cabo por investigadores españoles publicado en *Medicina Clínica*, demuestran que para obtener el máximo beneficio del poder cardioprotector que se ha atribuido al aceite de oliva, lo mejor es consumirlo en su forma virgen.

Las conclusiones de este trabajo proceden de un estudio *in vitro* en el que se trataba de analizar el efecto protector de aceites de oliva con diferente composición fenólica –antioxidantes- y su influencia en la oxidación de las LDL.

El estudio demuestra que el poder antioxidante aumenta cuanto mayor es la concentración de fenoles. Por otro lado, teniendo en cuenta también la calidad de los compuestos fenólicos se puede afirmar que el aceite de oliva virgen es el que presenta mejores propiedades antioxidantes. Además, esto viene a ser confirmado por las elevadas concentraciones en otros antioxidantes: alfatocofeol y betacaroteno.

Los ensayos clínicos permitirán confirmar la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva sustentando así uno de los mecanismos a través de los cuales la dieta mediterránea proporciona beneficios.

Esta supuesta propiedad antioxidante llevó a la Sociedad Española de Aterosclerosis a aconsejar la ingesta diaria de aceite de oliva en sus “Recomendaciones dietéticas generales para prevenir la aterosclerosis”.

La *American Heart Association (AHA)*, sin embargo, se muestra más reacia a esta asunción y se resiste a reconocer las ventajas del consumo habitual de aceite de oliva e, incluso, advierte que el alto contenido en grasa de la dieta mediterránea eleva el riesgo de padecer obesidad. Esto ha suscitado recientemente un estudio en la Unidad de Cardiología del Hospital Reina Sofía de Córdoba para evaluar el impacto sobre la morbilidad y mortalidad cardiovascular de este producto. La hipótesis que se pretende probar es, en definitiva, que es más importante para la salud la calidad de la grasa ingerida que su cantidad.

- **Otras patologías:**

Se han publicado diversos trabajos en los que se demuestra que el aceite de oliva contribuye a reducir el riesgo de otras patologías.

- Artritis reumatoide:

Un estudio publicado en el *Journal of Clinical Nutrition*, demostró

que las personas que consumen menos aceite de oliva tienen más del doble de riesgo de desarrollar artritis reumatoide en comparación con las que ingieren mayores cantidades. Parece que el componente responsable de esta acción es el ácido oleico y su metabolito, el ácido eicosatrienoico (ETA), los cuales ejercen un efecto antiinflamatorio similar al de los ácidos grasos del grupo w-3 –que, en otros trabajos, han demostrado tener efectos beneficios en la artritis reumatoide-.

➤ Hipertensión:

Asimismo, otro trabajo publicado en *Archives of Internal Medicine* reveló que este aceite contribuye a que las personas con hipertensión, en grado leve o moderado, pueden bajar su dosis de medicación.

➤ Cáncer de mama:

La anterior publicación se hizo eco de otra investigación que aseguraba que esta grasa reduce considerablemente el riesgo de sufrir tumores de mama (Muñoz M, 1999). Este papel protector parece deberse a que los ácidos grasos esenciales influyen en la respuesta inmune, en la proliferación celular así como en el desarrollo de metástasis. Los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares tal vez aumenten el riesgo de cáncer de mama al potenciar la formación de radicales libres que dañan el ADN y aceleran así el desarrollo de tumores.

➤ Úlcera gástrica:

El aceite de oliva es capaz de reducir los ácidos gástricos y es buen coadyuvante en el tratamiento de úlceras. Además, favorece la digestión, alivia el estreñimiento y es beneficioso para el páncreas, hígado y vesícula biliar. Uno de sus componentes, la clorofila, favorece la absorción de esta grasa a nivel intestinal.

➤ Crecimiento:

Fortalece los huesos, regula el metabolismo endocrino y estimula la absorción de calcio y minerales, todo lo cual contribuye al crecimiento.

➤ Cáncer de colon:

Se ha publicado en el *Journal of Epidemiology Community Health* –de la Asociación Británica de Medicina- que el aceite de oliva puede reducir el riesgo de cáncer de colon. Se indican tres factores dietéticos claves: la carne, el pescado y el aceite de oliva. El primero, parece que aumenta la cantidad de un ácido biliar llamado ácido deoxicólico, lo que reduce la actividad del enzima oxidasa diamina, que se cree regula los cambios celulares en las paredes intestinales. El aceite de oliva ejerce el efecto contrario. En consecuencia, los autores señalan que la carne y el pescado combinados se asocian con un incremento del riesgo de cáncer de colon, mientras que una dieta rica en aceite de oliva se relaciona con un descenso de las posibilidades de desarrollar esta enfermedad. Asimismo, el efecto protector del aceite de oliva se mantiene constante con independencia de la cantidad de frutas y verduras que se ingieren en la dieta.

➤ Fotocarcinogénesis:

Se atribuye un posible efecto protector del aceite de oliva cuando se aplica en la piel después de la exposición a la radiación UVB (Budiyanto A, 2000). Esto se explicaría por el poder antioxidante ya que otras sustancias de propiedades similares –vitamina E, té verde- han demostrado serlo. El componente responsable de esta acción protectora parece ser lábil al UVB ya que el aceite no resulta efectivo cuando se aplica antes de la exposición a la radiación.

APLICACIONES COSMÉTICAS

• **Producto de higiene para el baño:**

Los antiguos griegos ya usaban el aceite de oliva para el baño. Obviando las posibles alergias, la mayoría de los aceites vegetales son compatibles con la piel. Para conseguir un efecto hidratante-emoliente de la piel seca se debe aplicar a diario este aceite sobre zonas reseca y tirantes.

• **Componente de formulaciones cosméticas:**

Se utiliza para la elaboración de mascarillas faciales con aguacate. Otros preparados cosméticos comercializados son: bálsamos labiales, champúes, lociones de manos, jabones, aceites para masaje, reblandecedores de cutículas, *serum* antienvjecimiento para el contorno de los ojos, etc. En los últimos años se emplea sin la adición de otros productos.

- **Fabricación de jabones:**

Las grasas y aceites, por la adición de sosa cáustica, producen una reacción de saponificación que da lugar a los jabones. La sosa es neutralizada en el proceso. Durante la elaboración se pueden añadir colorantes, perfumes e hidratantes como la glicerina. Generalmente, a este uso se destinan los aceites de oliva de calidad más baja e, incluso, la pasta que se forma en el proceso de extracción del aceite.

- **Pieles secas y psoriasis:**

Se pueden preparar emulsiones de tipo agua en aceite A/O para conseguir la hidratación de pieles secas e, incluso, eczemas de psoriasis. A estos preparados se pueden añadir ceras como la de abeja para adecuar la consistencia y obtener un linimento. Se utilizan, también, otros ingredientes para aumentar la viscosidad de las preparaciones: agar, derivados de la celulosa –metilcelulosa-, goma xántica, extractos de ciertas plantas, glicerina, etc. Los anteriores se emplean como espesantes, también, en la industria alimentaria.

- **Cabello:**

Un uso tradicional es el empleo sobre el cabello para fortalecerlo y aportarle suavidad.

Como ya se ha apuntado, el aceite de oliva puede servir para la elaboración de vehículos capaces de incorporar fármacos, o bien, activos

cosméticos por lo que sería de aplicación tanto en terapéutica como en cosmética.

Sin embargo, aunque son mayores los beneficios que los inconvenientes que se pueden plantear como consecuencia de la aplicación de aceite de oliva sobre la piel es preciso indicar que, en algunos pacientes, han aparecido alergias después de ser tratados con alguno de estos productos.

Se han descrito alergias asociadas a la aplicación de aceites vegetales de diversa procedencia. En el que nos ocupa también se han registrado algunos casos en hospitales de Alemania y Suiza (Jung HD, 1987; Malmkvist Padoan S, 1990).

## **II.2. TERAPIA DERMATOLÓGICA**

### **II.2.a. FORMULACIONES TÓPICAS: DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN**

Las afecciones dermatológicas se caracterizan por presentar alteraciones en la estructura y funcionalidad de la piel. Dichos procesos pueden ser de muy diversa etiología, sintomatología y tipos precisando, independientemente, muy a menudo de una medicación por vía sistémica (Del Pozo A, 1993).

No obstante, la terapéutica cutánea suele ser siempre de interés, cuanto menos como coadyuvante de otros tipos de medicación. En otras ocasiones, incluso, es la única vía para atajar muchas manifestaciones patológicas.

Con este tipo de preparados se persiguen exclusivamente efectos localizados en la piel –epidermis y/o dermis- o mucosas; debe evitarse o reducirse al máximo la absorción transcutánea de componentes o de productos activos presentes en los mismos que puedan provocar efectos secundarios no deseados.

Existen una serie de factores que tanto el dermatólogo como el farmacéutico preparador deben considerar en el momento de recetar o de diseñar un medicamento de aplicación y acción tópica.

- Elección del principio activo adecuado.
- Elección de la forma farmacéutica y excipientes idóneos.
- Consideración de los efectos dermatológicos y cosméticos del vehículo.

Tan sólo combinando adecuadamente las tres premisas anteriores y en el supuesto de que el medicamento esté correctamente aplicado, podrá obtenerse el éxito terapéutico del mismo.

## **II.2.b. PRINCIPIOS ACTIVOS EMPLEADOS**

Si bien la farmacoterapia dermatológica es muy amplia –incluye, entre otros: germicidas y antibacterianos, antiinflamatorios, anestésicos locales, astringentes, antiperspirantes, queratoplásticos, queratolíticos, fotoprotectores, emolientes, antipruriginosos, reepitelizantes, etc. (Gennaro AR, 1998)- los principios activos deben presentar una alta especificidad ya que, por ejemplo, numerosas afecciones fúngicas no se resuelven mediante la aplicación de pomadas antibióticas de acción local; numerosas infecciones bacterianas que cursan con inflamación no responden a los corticosteroides tópicos, etc. requiriendo fármacos de acción mucho más específica.

Debe, asimismo, recordarse que en piel descamada o lesionada, con pérdida de los estratos epidérmicos superiores –lo cual ocurre, por ejemplo en psoriasis, quemaduras, incisiones y otras lesiones traumáticas-, la absorción de la mayoría de principios activos puede estar notablemente incrementada, con el riesgo subsiguiente de que puedan llegar a absorberse y realizar efectos sistémicos no deseados.

Además, hay que tener precaución en elegir la forma farmacéutica, especialmente en aquellos casos en los que el área a tratar es extensa –grandes quemados o heridos- en los que los capilares están al descubierto. Formas farmacéuticas que liberen con facilidad el principio activo pueden también dar lugar a los efectos sistémicos anteriormente mencionados.

## **II.2.c. SELECCIÓN DE VEHÍCULOS**

Los vehículos dermatológicos y cosméticos deben poseer una serie de características farmacotécnicas de tipo general y, otras, más específicas relacionadas con las condiciones de su utilización concreta – objetivo terapéutico del preparado, naturaleza de las lesiones o afecciones que constituyen la indicación específica, propiedades fisico-químicas y biológicas de los principios activos que incorporan, etc.-.

Entre las características generales pueden mencionarse:

- pH: Debe ser neutro o débilmente ácido, lo más parecido al de la piel.
- Estabilidad física y química, así como compatibilidad con los principios activos que incorporan.
- Propiedades reológicas: Deben proporcionar al preparado una adecuada extensibilidad y adaptabilidad a la superficie y cavidades cutáneas. Para ello, es recomendable que posean flujos de tipo plástico-tixotrópico, caracterizados por un aumento de la fluidez durante la aplicación, seguida de una recuperación de la textura inicial después de extendido el medicamento, lo que permite mantenerlo localizado y adherido a la zona tratada.
- La posibilidad de ser eliminados de la zona tratada mediante simple lavado resulta siempre de interés. No obstante, esta recomendación no debe, en ningún caso, influir en el efecto general de la medicación como sucede, por ejemplo, en aquellas patologías que

requieren para su remisión de vehículos grasos fuertemente oclusivos y que, lógicamente, no son lavables.

- No deben manchar, en la medida de lo posible, ni la piel ni los tejidos.
- No deben presentar efectos de irritación primaria ni de hipersensibilización.

### **III. VEHÍCULOS DERMATOLÓGICOS**

Los criterios de selección y formulación de un vehículo deben establecerse, en primer lugar, basándose en el tipo de lesión cutánea sobre la que se ha de emplear. La simple apariencia o estado de la zona afectada puede ser orientativa a este respecto.

Así, en forma general, las patologías dermatológicas se pueden clasificar en tres tipos generales: procesos o lesiones agudas, crónicas y subagudas, de sintomatología intermedia a las dos anteriores. Los vehículos, a su vez, se clasifican en tres grupos en función del tipo de lesión para la que preferentemente deben ser utilizados.

La posibilidad de desecación de heridas, por un lado, y las características de oclusividad, por otro, son las dos propiedades que, de modo general, son más representativas de los vehículos empleados para la formulación de medicamentos dermatológicos empleados para el tratamiento de procesos agudos y crónicos.

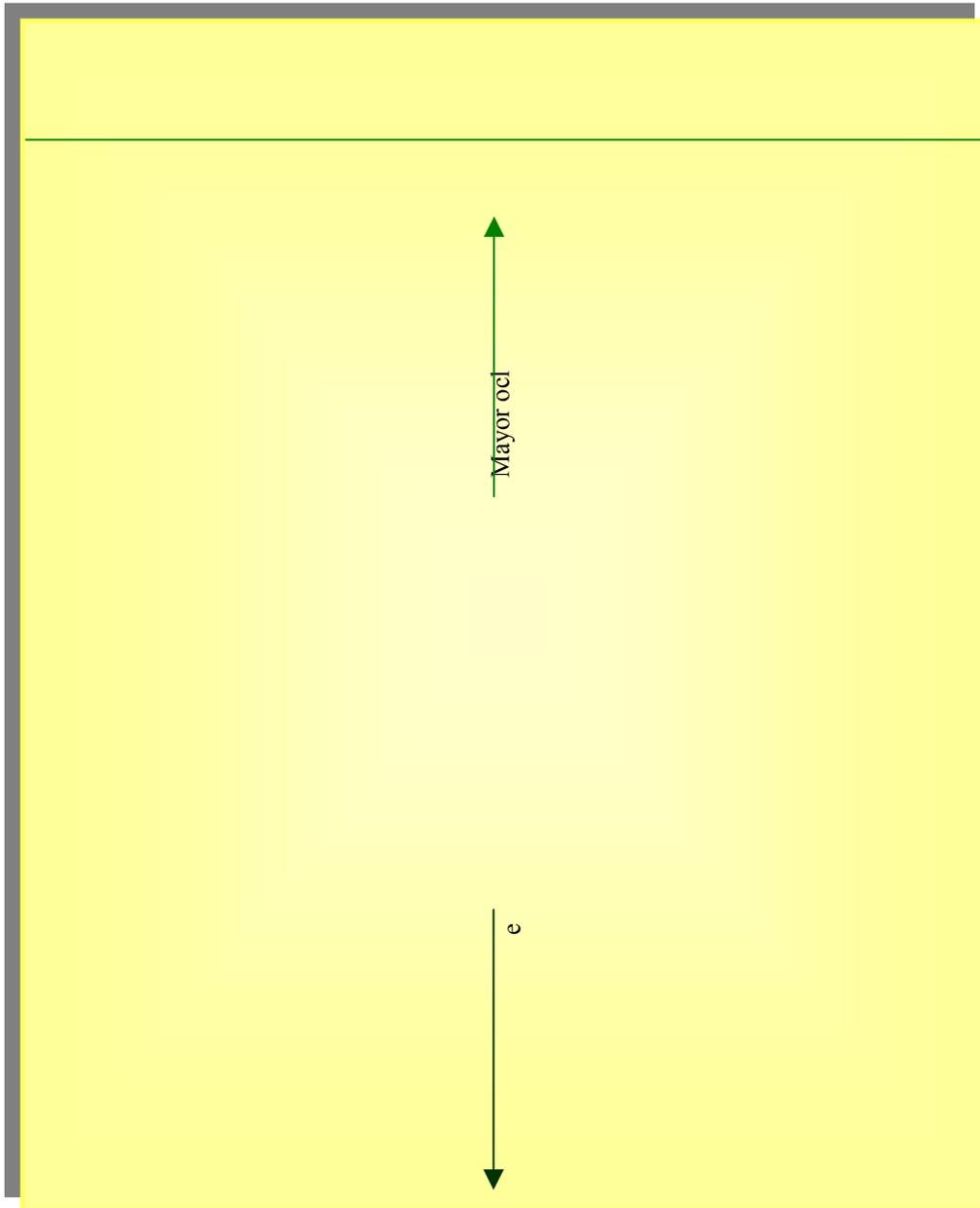
Con respecto a los vehículos empleados en la formulación de preparados para el tratamiento de sintomatologías de tipo subagudo, debe reseñarse que existe una amplia gama de productos, de naturaleza más o menos compleja, que ofrecen al formulador un amplio abanico de posibilidades referentes a las características de desecación/ oclusividad.

A continuación se exponen los principales tipos de vehículos empleados para formulaciones dermatológicas clasificados en función de los criterios anteriormente expuestos. Asimismo, se exponen las relaciones estructurales y de formulación existentes entre los mismos (Figuras 4 y 5).

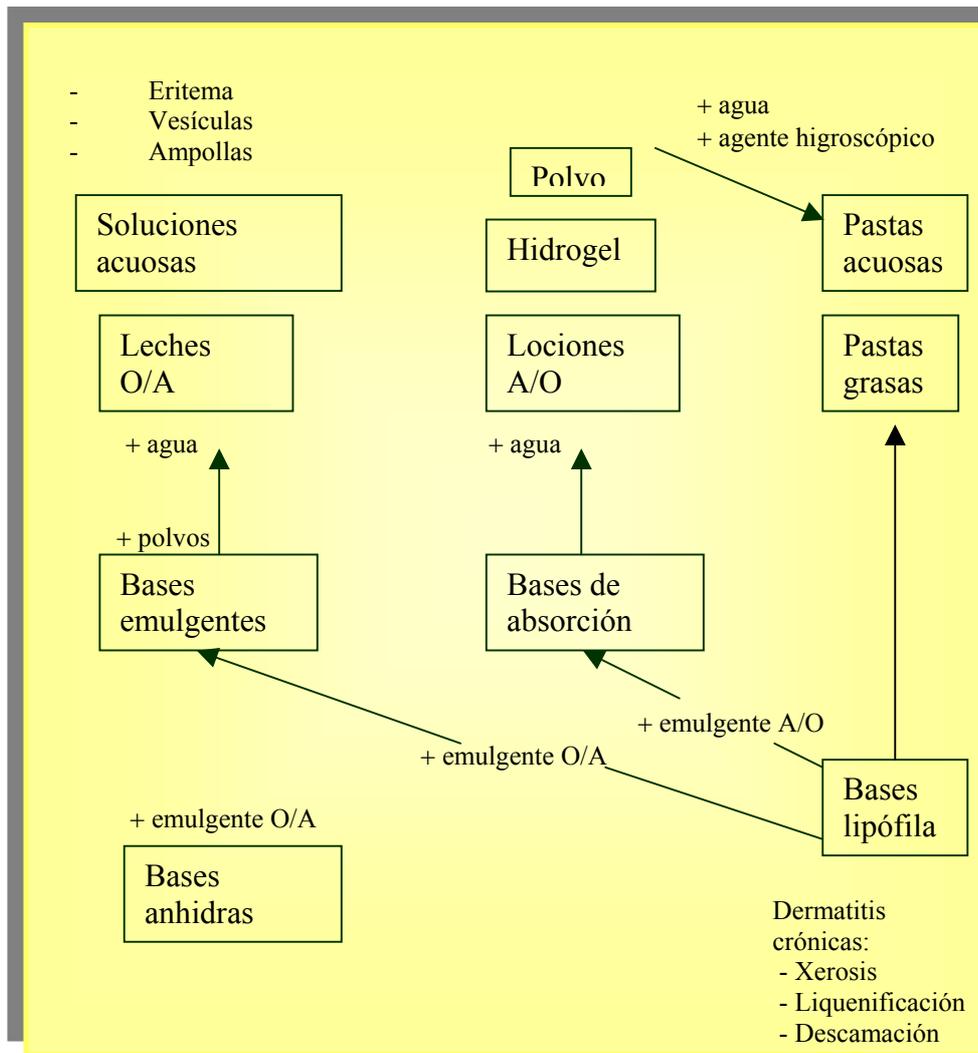
### **III.1. GENERALIDADES Y FORMACIÓN DE GELES**

Ya se ha comentado que, uno de los vehículos más utilizados en la actualidad para elaborar preparados de uso dermatológico, son los geles.

Los geles son semisólidos, transparentes u opacos, que contienen un alto porcentaje de disolvente frente al de agente gelificante. La relación de tamaño de las partículas dispersas puede variar dentro de las medidas coloidales hasta cuerpos reconocibles con luz óptica, macromoléculas, cristales iónicos o moleculares. Estas partículas sólidas están unidas entre sí y forman un armazón especial (Pena L, 1990).



**Figura 4.** Vehículos dermatológicos: Propiedades de interés en relación con el tipo de lesión a tratar.



**Figura 5.** Elección de excipientes en función de la sintomatología de la lesión cutánea.

Según la naturaleza de los enlaces químicos que condicionen el mantenimiento de la estructura hay que distinguir dos tipos de geles: de **valencia principal** y geles de **valencia secundaria**. En los primeros, las fuerzas de enlace son fuerzas de valencia principal y, por tanto, la forma total del gel se considera como una sola molécula gigante. Este tipo de geles no tienen interés para la preparación de sistemas medicamentosos cutáneos. Citamos como ejemplos el caucho y otros elastómeros.

Los geles de valencia secundaria o accesoria, en cambio, presentan como fuerzas de enlace valencias de tipo secundario, sobre todo fuerzas de Van der Waals y enlaces por puente de hidrógeno. Éstos son de interés para la preparación de geles de uso dermatológico y, como ejemplos de los mismos, destacamos los de celulosa, almidón, alginatos y tragacanto. En todos ellos, basta con aplicar pequeñas deformaciones mecánicas para destruir la reticulación (Voigt R, 1982).

Con respecto a la estructura de los geles se sabe que está formada por un armazón compuesto de elementos de la fase sólida que entran en contacto en diferentes lugares llamados puntos de adhesión que los mantienen unidos entre sí.

La fase líquida se distribuye en este armazón; es decir, que dichas partes penetran la una en la otra.

En los geles no puede distinguirse una fase externa y, otra, interna. La coherencia de la fase sólida produce la estructura flexible semisólida típica de los geles. Si la deformación de un gel provocada por la aplicación de una fuerza mecánica es reversible, al finalizar la acción de la fuerza, el gel recupera de nuevo su forma primitiva. A este comportamiento físico se denomina **elástico**. –Estos aspectos reológicos se estudiarán más adelante con más detalle-. En los excipientes de pomadas resulta poco deseable un comportamiento elástico; en cambio, es conveniente una deformabilidad de tipo **plástico**. La plasticidad o elasticidad de un gel depende en gran medida de la concentración y naturaleza de los componentes del coloide (Paulisch M, 1981).

Cuando un agente gelificante se dispersa en un disolvente apropiado se unen o entrelazan hasta formar una estructura coloidal de red tridimensional. Esta red limita el flujo del fluido por captura e inmovilización de las moléculas del disolvente. La estructura de la red es también responsable de la resistencia del gel a la deformación y, por tanto, de sus propiedades de viscoelasticidad.

Para explicar la estructura reticular de los geles se han propuesto varios modelos:

- **Estructura enrollada:** Es poco ordenada y se asocia con polímeros sintéticos tales como resinas y derivados de la celulosa.
- **Hélice:** Es una estructura más ordenada formada por el entrelazado de dos cadenas de polímero. Goma xántica y almidón son dos ejemplos típicos.

□ **Micelas de flecos:** Tiene lugar como consecuencia de la formación de puentes entre dos cadenas de polímero mediante cationes divalentes. La presentan los geles de alginato cálcico, por ejemplo.

□ **Estructura de naipes:** Es característica de los geles formados por partículas coloidales como la bentonita y el veegum.

La mayoría de los geles usados en Industria Farmacéutica así como los estudiados en este trabajo, están asociados con la estructura enrollada por lo que la discusión posterior se centrará en este modelo.

Los mecanismos de gelificación que conducen a la formación de una estructura enrollada se fundamentan en interacciones polímero-polímero y polímero-disolvente. La red del gel se va formando con sucesivos incrementos de concentración del polímero. El resultado de esto es una reducción de la distancia interparticular que lleva a un entrelazado de cadenas y desarrollo de la formación de puentes. Conforme aumenta el número de puentes las cadenas se cierran, la movilidad del disolvente se reduce y se forma el gel. Si se continúa la adición de polímero, se refuerza la red del gel consiguiendo un incremento de la resistencia y viscoelasticidad del mismo.

Aunque la red del gel está básicamente formada por las interacciones poliméricas, lo que realmente determina la integridad del gel es la mayor o menor afinidad polímero-disolvente.

La teoría clásica de geles distingue tres tipos de disolventes:

1. Disolvente libre, muy móvil.
2. Disolvente limitado por una capa de solvatación.
3. Disolvente atrapado dentro de la estructura de la red.

En un gel determinado, los porcentajes de los tres tipos de disolvente dependen de la concentración de polímero y de la afinidad del disolvente por el polímero.

La afinidad del disolvente rige la extensión de la estructura enrollada. Así, a mayor afinidad del disolvente, más se extienden las cadenas y se entrelazan con otras adyacentes hasta formar puentes. Un buen disolvente es aquel que da lugar a geles bien estructurados en los que las cadenas de polímero están interpenetradas por moléculas del disolvente, y la capa de solvatación es abundante. Esto facilita la expansión de las cadenas y la formación de la red. Por el contrario, un disolvente poco adecuado provoca que las cadenas de polímero se contraigan hasta minimizar los contactos con el disolvente; en este caso, se reduce el número efectivo de puentes y se debilita la estructura reticular del gel.

### **III.2. LIPOGELES**

En este estudio se ha utilizado un derivado de la celulosa – etilcelulosa- como polímero formador o agente gelificante sobre un

sustrato de aceite de oliva como fase dispersante. De esta manera, hemos obtenido geles de naturaleza oleosa llamados **lipogeles**.

Los geles son, por tanto, un estado intermedio entre sólido y líquido y podrían ser definidos como un sistema disperso con estructura coloidal.

La gelificación de aceites vegetales y minerales ha sido estudiada desde diversos puntos de vista –reológico, biofarmacéutico (Realdon N, 1996), microscopía electrónica, difracción de rayos X (Fukasawa J, 1989), cosmetológico, espectroscopía IR, análisis térmico diferencial (Aiache JM, 1992)- que ponen de manifiesto la estructura de verdaderos lipogeles.

El interés suscitado en Tecnología Farmacéutica por el estudio de los lipogeles responde, por las razones señaladas, a su idoneidad para la elaboración de los preparados dermatológicos ya que, por sus propiedades emolientes y elevada compatibilidad con la barrera epicutánea, pueden ser aplicados en pieles sensibles.

Esta compatibilidad es debida, precisamente, a la naturaleza de dichos preparados obtenidos a partir de aceites vegetales puesto que éstos y de manera especial el aceite de oliva, tienen en su composición moléculas de estructura análoga a los lípidos fisiológicos.

Asimismo, la capacidad emoliente, amplia difusión cutánea y mínimo poder irritante hacen a estos productos adecuados para su empleo

en este tipo de pieles especialmente sensibles.

No resulta fácil la selección de vehículos para la administración por vía tópica de fármacos destinados a pacientes con tendencia a la hipersensibilidad cutánea ya que es frecuente en ellos la aparición de reacciones alérgicas indeseables.

Por otro lado, se pueden dar circunstancias particulares en terapéutica que hagan recomendable el empleo de lipogeles como vehículos de ciertos principios activos. Tal es el caso de los preparados oftálmicos que, por su lugar de aplicación y los propios fármacos empleados, producen irritación ocular y lagrimeo. La utilización de un vehículo viscoso del tipo de los lipogeles solventaría la situación puesto que, por un lado, debido a la escasa afinidad físico-química entre el gel lipófilo y las lágrimas acuosas se conseguiría mantener la estabilidad del fármaco y, por otra parte, la viscosidad del preparado lograría una mayor retención del producto en la zona contribuyendo a prolongar la duración de la acción.

Es interesante la apreciación de Aiache (Aiache JM, 1983) que, al considerar los agentes espesantes utilizados en oftalmología, señala que la elección de los mismos estará determinada por motivos tecnológicos tales como posibilidad de filtración, resistencia a la esterilización o compatibilidad, además de los problemas de tolerancia y de las condiciones generales de orden terapéutico.

Los lipogeles comparten con el resto de los geles propiedades físicas que pueden clasificarse en transitorias y reológicas.

Las técnicas experimentales que se emplean para caracterizar estas propiedades también tienen esta clasificación. Se utilizan técnicas espectrofotométricas y térmicas para identificar la microestructura de los geles –zonas físicas de unión- y las propiedades transitorias relacionadas con ella. Por ejemplo, la espectroscopía de resonancia magnético nuclear (RMN) mide las características estructurales y dinámicas del polímero antes de la agregación y formación del gel, y la espectroscopía de dicroísmo circular mide los cambios conformacionales del polímero durante la formación de la red. Las técnicas mecánicas se emplean para determinar las propiedades reológicas de los geles. Estas técnicas emplean tanto esfuerzos de deformación pequeños que aportan los parámetros de viscoelasticidad, como esfuerzos de deformación grandes que generan perfiles de deformación completos e incluyen parámetros de deslizamiento.

### PROPIEDADES TRANSITORIAS

#### ➤ TRANSICIÓN SOL-GEL

El estado de transición sol-gel puede ser dependiente de la concentración de polímero o dependiente de la temperatura. Los métodos espectrofotométricos, como ya se ha señalado, se emplean para estudiar las transiciones sol-gel que dependen de la concentración crítica de

gelificación. Los métodos térmicos, incluida la calorimetría con escáner diferencial, se usan para medir las transiciones sol-gel o las temperaturas de fusión de los geles termorreversibles.

Algunos estudios han tratado de establecer una relación en la dependencia de la temperatura de transición sol-gel entre el calor de congelación y la concentración del polímero.

La concentración crítica de gelificación es aquella concentración por debajo de la cual no se forma una estructura macroscópica de gel bajo unas mismas condiciones experimentales; en su lugar, aparece el estado de sol entre el polímero y el disolvente. Esta concentración crítica depende de las interacciones polímero-polímero y polímero-disolvente, del carácter hidrofílico-lipofílico del polímero y del peso molecular y flexibilidad de la cadena. Además, los polímeros que requieren iones para formar geles presentan concentraciones críticas de gelificación que dependen de estos aditivos y muchas otras variables.

Hay dos puntos térmicos asociados a los geles termorreversibles. Variaciones de temperatura pueden provocar la formación del gel o bien la transición a sol en el punto de fusión. Además, algunos geles presentan temperatura de histéresis, en la que el punto de formación del gel es más bajo que el punto de fusión. El comportamiento del gel indica que las zonas de unión constituyen una serie de asociaciones, en lugar de verdaderas uniones cruzadas. Los geles de agarosa presentan temperatura de histéresis; se forma el gel a unos 40°C y funde alrededor de los 90°C.

### ➤ ESTABILIDAD FÍSICA

La mayoría de los geles presentan estructuras que no llegan a alcanzar el equilibrio; los diferentes métodos de elaboración y las condiciones influyen en el estado del gel. El gel se estabiliza físicamente conforme tiende hacia el equilibrio, lo cual confiere gran importancia a la historia de la muestra de gel que debe ser considerada en el análisis de las propiedades físicas. El tiempo de reposo refleja cambios en la microestructura del gel, donde las uniones no covalentes se rompen y vuelven a formarse. Además, en algunos geles poliméricos aparecen inestabilidades como consecuencia de esta falta de equilibrio; se pueden citar como ejemplo la retrogradación y la sinéresis.

La **retrogradación** es la reversión espontánea de una solución de polímero a un gel. El alcohol polivinílico disuelto en agua da lugar a retrogradación. **Sinéresis** es el proceso mediante el cual se libera líquido de la matriz del gel. Esta inestabilidad aparece debido al estado de falta de equilibrio del gel en su formación o debido al cambio en las condiciones ambientales. En el equilibrio, las fuerzas de contracción elástica de las cadenas de polímero se contrarrestan generalmente por las fuerzas de dilatación del disolvente, como consecuencia de la presión osmótica diferencial. Los cambios de temperatura, por ejemplo, provocan cambios de presión osmótica originando una contracción elástica en las cadenas de polímero. La respuesta de contracción expulsa el exceso de líquido fuera de la matriz. El agar y el carragaen son ejemplos de geles que presentan sinéresis.

## **IV. ABSORCIÓN PERCUTÁNEA**

### **IV.1. INTERACCIONES VEHÍCULO-PIEL**

Un vehículo, al ser aplicado sobre la piel, interacciona con ella a varios niveles y esto se manifiesta en la penetración del fármaco que transporta según diversos factores: en primer lugar, la lipofilia del fármaco en relación con el vehículo y el estrato córneo; segundo, la hidratación de la piel, que sí depende del vehículo y puede aumentarla o disminuirla -en general, la hidratación es un factor favorable para la penetración de cualquier fármaco- (Barry BW, 1983); por último, la penetración del propio vehículo, aspecto muy controvertido que merece un estudio detallado.

Los excipientes usuales, generalmente, no son capaces de penetrar por sí mismos en el estrato córneo; lo que hacen es ceder el fármaco que transportan a la superficie de la piel y, una vez disuelto el principio activo, la penetración del mismo depende de su coeficiente de reparto estrato córneo/agua superficial. El grado de penetración mejora en condiciones de hidratación –oclusión-, pero no necesariamente porque el vehículo penetre por sí mismo y arrastre consigo al fármaco. Parece que la hidratación conlleva una humectación de las células disminuyendo su densidad y, por tanto, su resistencia a la difusión (Idson B, 1983).

Por esto, durante varios años se ha tratado de buscar compuestos capaces de penetrar por sí mismos y de transportar cualquier fármaco a

las capas más internas de la piel donde interesa que actúe. Hoy día, este objetivo se ha conseguido mediante el hallazgo de los llamados “promotores de penetración”, sustancias químicas definidas que, con distintos grados de eficacia, son capaces de modificar, en teoría de forma reversible, la permeabilidad de la piel y de actuar como transportadores de los fármacos que se les asocian. Estos compuestos se clasifican en dos grupos: disolventes polares, como el dimetilsulfóxido y promotores anfílicos, tales como el propilenglicol y el ácido oleico. Estas últimas sustancias son muy efectivas y de uso bastante extendido. Se trata de moléculas anfílicas de constitución variable cuyo mecanismo de acción es sencillo y univalente. Al parecer, se intercalan entre las bicapas lipídicas intercelulares del estrato córneo, abriendo así los canales por los que penetra el promotor junto con el fármaco asociado. No tienen acción sobre la queratina. En general, estos promotores aumentan la penetración de fármacos de carácter relativamente hidrófilo que, en condiciones normales, no penetran o lo hacen muy lentamente (Benson HAE, 2005).

#### **IV.2. INTERACCIONES VEHÍCULO-FÁRMACO**

Para que exista una buena cesión del fármaco a partir de su vehículo, deben cumplirse las siguientes condiciones:

a) El *coeficiente de difusión* del fármaco en el vehículo deberá ser óptimo. El coeficiente de difusión del principio activo en un excipiente dado será máximo cuando el fármaco esté disuelto en este último. Si esto

no es posible, habrá que incorporar el principio activo en dispersión lo más finamente posible o solubilizarlo en una de las fases con ayuda del emulgente.

También hay que tener en cuenta la viscosidad del vehículo puesto que, a menor viscosidad, mayor coeficiente de difusión.

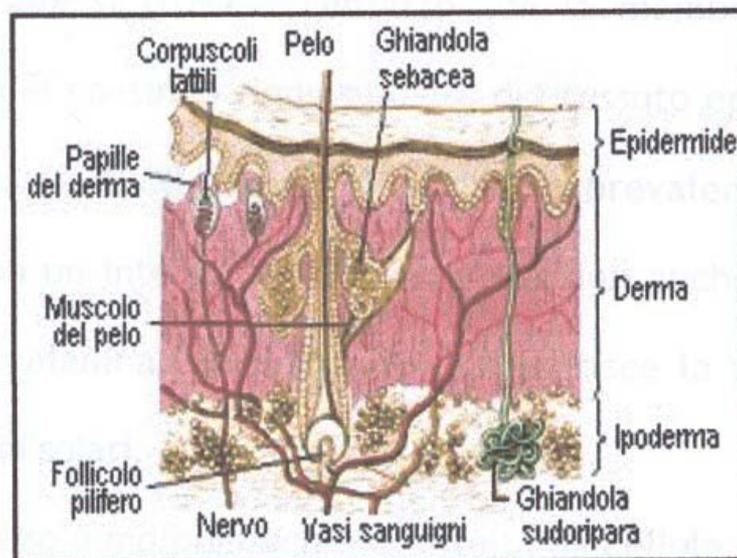
b) El fármaco deberá ser *soluble* en el excipiente pero sin poseer una afinidad especial o selectiva hacia el mismo. Un vehículo es tanto más adecuado para un principio activo cuanto menos lo retiene por afinidad selectiva pero manteniéndolo disuelto. La secuencia de los procesos que rigen la penetración del fármaco es la siguiente: disolución del vehículo, difusión en el vehículo, cesión del principio activo en la superficie de la piel y difusión a través de la misma.

c) El vehículo debe hacer permeable la barrera cutánea, ya sea por oclusión –vehículos grasos- o por penetración directa –vehículos hidrófilos-.

## V. LA CUTE

### V.1. CARATTERISTICHE STRUTTURALI

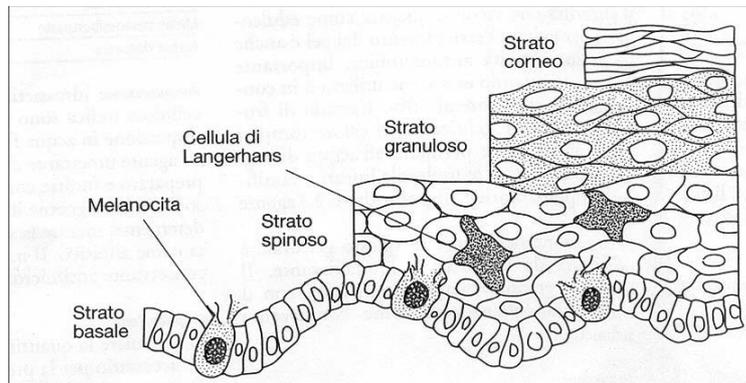
La pelle è un organo *mutilayered* che delimita l'organismo. In un individuo adulto ha un peso medio di 7 kg e una superficie di 1.8 m<sup>2</sup>. Come si evidenzia in Figura 6, si distinguono dall'esterno verso l'interno diversi strati: uno superficiale di tipo epiteliale (epidermide), uno più interno connettivale (derma) e un tessuto adiposo sottocutaneo (ipoderma) che svolge funzioni di accumulo e di isolamento.



**L'epidermide** è un epitelio squamoso pluristratificato e cheratinizzato, di spessore variabile tra i 70 e i 120  $\mu\text{m}$  nelle diverse sedi, privo di ghiandole e vasi sanguigni, la cui principale funzione è quella protettiva.

I cheratinociti rappresentano il 90% dei componenti cellulari e sono i responsabili, attraverso il loro processo di evoluzione, delle proprietà di barriera della cute. Altre cellule presenti sono i melanociti, le cellule di Langerhans e le celle di Merkel, ma nessuna di queste sembra influenzare le proprietà fisiche della barriera cutanea.

Dal punto di vista istologico l'epidermide si divide in vari strati: il più profondo è lo strato basale o germinativo a cui seguono, procedendo verso la superficie, lo strato spinoso, granuloso, lucido e corneo.



**Figura 7.** Rappresentazione schematica degli strati cutanei dell'epidermide.

Lo strato basale è il responsabile del continuo rinnovamento del tessuto epiteliale che avviene in un periodo compreso tra i 20 e i 30 giorni. I cheratinociti appartenenti a questo strato sono cilindrici, relativamente indifferenziati e sono attaccati alla lamina basale tramite gli emidesmosomi, mentre desmosomi li ancora gli uni agli altri.

La proliferazione delle cellule nello strato basale crea nuovi cheratinociti che spingono le cellule già esistenti verso la superficie. Durante questo spostamento, i cheratinociti si differenziano arrivando all'ultimo grado di differenziazione nello strato corneo. Frammisti alle cellule basali si trovano i melanociti.

Lo strato successivo è chiamato strato spinoso a causa delle numerose protuberanze a forma di spina (desmosomi) che caratterizzano la superficie cellulare. I cheratinociti conservano tutti gli organuli intracellulari ed includono dei granuli ( a volte chiamati corpi lamellari) che originano dall'apparato di Golgi.

Lo strato granuloso è costituito da cellule, ancora viventi, più appiattite e ripiene di granuli di cheratoialina. Sono più numerosi i corpi lamellari, che contengono pile di vescicole lipidiche.

Nello strato lucido le cellule sono piatte, apparentemente prive di nucleo, con citoplasma ricco di granuli di eleidina che gli conferiscono un aspetto translucido.

La struttura dello strato corneo può essere paragonata ad una struttura “calce e mattoni” dove i corneociti, completamente differenziati, sono imprigionati in una “calce” costituita da questi lipidi intercellulari. I corneociti sono piatti, e lo spazio citoplasmatico è interamente occupato da cheratina. Quando i corpi bilamellari dello strato granuloso estrudono il loro contenuto, le vescicole lipidiche appiattite si fondono dando origine a strutture multilamellari altamente organizzate.

Di particolare interesse è la costituzione dei lipidi dello strato corneo: al contrario di tutte le altre biomembrane, non contengono fosfolipidi, mentre sono costituiti da una miscela quasi equimolare di ceramidi, colesterolo e acidi grassi liberi. Questi componenti, non polari e per così dire “rigidi”, giocano un ruolo critico nella funzione di barriera dello strato corneo.

In media ci sono circa 20 strati di cellule nello strato corneo, ciascuno dei quali ha uno spessore di circa 0.5  $\mu\text{m}$ . Questa sottilissima barriera limita la perdita di acqua attraverso la superficie cutanea a circa 250 ml al giorno, un volume facilmente rimpiazzabile per il mantenimento dell'omeostasi. Modifiche nella composizione o nell'organizzazione dei lipidi hanno come conseguenza una modificazione della permeabilità cutanea, come dimostrato estraendo i lipidi cutanei con solventi organici.

L'epidermide, essendo un tessuto epiteliale è sprovvista di vasi sanguigni; l'apporto di sostanze nutritive è garantito dai capillari del

derma che arrivano fino alla lamina basale e dalla diffusione nei liquidi interstiziali presenti negli spazi intercellulari. Trattandosi di un tessuto finalizzato alla protezione, rappresenta un ostacolo all'assorbimento transdermico, permettendo la penetrazione solo a molecole di piccole dimensioni e con lipofilia relativamente elevata.

**Il derma** invece è costituito principalmente da tessuto connettivo ed ha lo scopo di supportare l'epidermide. Contiene una popolazione di cellule, chiamate fibroblasti, relativamente scarsa, immersa in un matrice di collagene e fibre di elastina. La parte più superficiale del derma, detto derma papillare, è costituita prevalentemente di fibre di elastina, mentre nella parte più profonda del derma, detta reticolare, vi sono principalmente fibre di collagene. Il derma incorpora vasi sanguigni, linfatici e terminazioni nervosa.

Molti farmaci penetrati attraverso l'epidermide possono quindi raggiungere la circolazione sistemica essendo il derma un tessuto vascolarizzato.

Il derma è caratterizzato dalla presenza degli annessi cutanei: unità pilosebacee, che comprendono follicoli piliferi, peli e ghiandole sebacee, e ghiandole sudoripare.

Infine, lo stato più profondo della pelle è rappresentato dall'**ipoderma** o tessuto adiposo sottocutaneo. E' caratterizzato dalla presenza

di adipociti, aventi la funzione di immagazzinare i trigliceridi, e da fibre di collagene che permettono di mantenere legate le cellule tra loro

## **V.2. CARATTERISTICHE FUNZIONALI**

La pelle svolge molte funzioni, che sono schematizzate come segue:

- Contenimento di tessuti e organi;
- Protezione da stimoli nocivi: funzione di barriera, localizzata principalmente nello strato corneo, che si oppone sia all'uscita di liquidi dall'organismo che all'ingresso di sostanze estranee. La pelle si comporta come una barriera, non solo nei confronti delle sostanze estranee, ma anche nei confronti dei microrganismi, delle radiazioni solari, del calore e della corrente elettrica;
- Funzione sensoriale legata alla presenza di terminazioni nervose, ricezione di stimoli tattili, dolorosi e termici;
- Funzione secretiva grazie alla presenza di ghiandole;
- Funzione immunitaria, svolgono un ruolo centrale le cellule di Langerhans, presentano l'antigene e sintetizzano citochine;
- Regolazione della temperatura, al mantenimento della temperatura corporea contribuiscono lo strato adiposo che è un isolante termico, l'apparato vascolare e ghiandolare;
- Regolazione della pressione sanguigna;
- Sintesi e metabolismo (Amorosa, 1986; Colombo, 2004; Finzi, 1998).

### **V.3. ASSORBIMENTO DERMICO E TRANSDERMICO**

La pelle costituisce un potenziale sito di somministrazione per numerosi farmaci destinati al trattamento di patologie sia localizzate che diffuse. Questi possono essere applicati sulla pelle con due diverse finalità: la più tradizionale è che il principio attivo eserciti la sua azione solo a livello superficiale (somministrazione topica); se invece il farmaco attraversa la pelle e giunge al circolo sistemico si parla di somministrazione sistemica (transdermica), via che evita alcuni dei problemi connessi con le tradizionali vie di somministrazione orale e parenterale. Infatti il farmaco, somministrato attraverso la cute, non subisce il metabolismo gastro-intestinale ed evita l'effetto di primo passaggio epatico. La somministrazione transdermica permette il controllo dei livelli plasmatici di farmaco, la riduzione della frequenza di somministrazione e l'immediata sospensione del trattamento per semplice rimozione del sistema. E' inoltre una via di somministrazione non invasiva che aumenta la "compliance" del paziente minimizzando traumi e rischi di infezione. Tuttavia il suo utilizzo è fortemente limitato dalla scarsa capacità che i farmaci hanno di diffondere attraverso la pelle, ciò è dovuto principalmente alle eccellenti proprietà di barriera dello strato corneo, lo strato più superficiale della pelle.

#### **V.4. VIE DI PENETRAZIONE**

L'assorbimento transdermico di farmaci può essere schematizzato in una serie consecutiva di processi di ripartizione e di diffusione, la cui fase limitante è spesso rappresentata dal superamento dello strato corneo.

L'attraversamento dello strato corneo è la fase più lenta, quella che controlla l'intero processo. Nel caso di un farmaco disciolto nel veicolo, il passaggio attraverso lo strato corneo viene descritto dalla seguente relazione:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{k \cdot C_v \cdot D_s \cdot A}{h}$$

dove:

$dQ/dt$  = velocità di comparsa del farmaco nello strato vivente dell'epidermide

$k$  = coefficiente di ripartizione fra lo strato corneo e veicolo

$C_v$  = concentrazione del farmaco disciolto nel veicolo

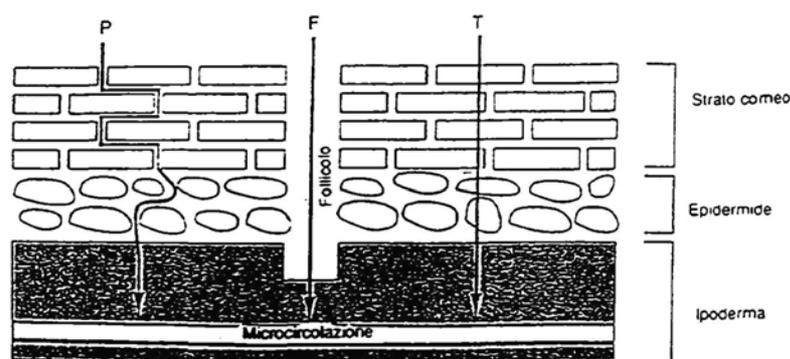
$D_s$  = coefficiente di diffusione del farmaco

$A$  = area a disposizione per l'assorbimento

$h$  = cammino diffusionale del farmaco, spesso approssimato allo spessore dello strato corneo.

Il passaggio del farmaco attraverso lo strato corneo può realizzarsi tramite diverse vie di penetrazione: la **via intracellulare** (passaggio attraverso i corneociti), la **via intercellulare** (passaggio attraverso la matrice extracellulare) e la **via annessiale**, che presuppone il passaggio

attraverso i follicoli piliferi e i dotti ghiandolari delle ghiandole sudoripare e sebacee.



**Figura 8.** Vie di penetrazione di una sostanza attraverso la pelle: (P) via intercellulare; (F) via annessiale; (T) via intracellulare.

L'importanza di queste diverse vie di penetrazione dipende dalle caratteristiche del principio attivo quali la solubilità, il coefficiente di ripartizione e la diffusività.

Il passaggio di tipo annessiale potrebbe essere in realtà poco importante dal punto di vista quantitativo: infatti solo lo 0.1-0.5 % della superficie corporea è occupata da queste strutture. Tuttavia tale via viene scelta da grosse molecole polari come steroidi ed elettroliti, che non sono in grado di attraversare la barriera cornea.

I canali intercellulari invece rappresenterebbero la via di penetrazione preferita per i composti polari ad alto peso molecolare (PM > 2000 Da).

Per le sostanze non polari invece il cammino preferenziale è quello intercellulare. Infatti la diffusione attraverso l'epidermide vivente può rappresentare una tappa limitante solo per quei farmaci caratterizzati da una lipofilia molto elevata e quindi termodinamicamente sfavoriti nella ripartizione strato corneo-tessuti viventi.

Si ricorda inoltre che un farmaco applicato sulla pelle può anche legarsi alla cheratina a livello dello strato corneo e creare una sorta di deposito, oppure può essere metabolizzato nell'epidermide vivente o nel derma.

## **V.5. FATTORI CHE REGOLANO L'ASSORBIMENTO**

I fattori che regolano l'assorbimento di un farmaco, applicato alla cute in una determinata formulazione, si possono fondamentalmente suddividere in tre gruppi:

1. Fattori legati alle caratteristiche del farmaco
2. Fattori legati alla struttura e alle condizioni della cute
3. Fattori legati alla composizione della formulazione applicata

### **V.5.a. FATTORI LEGATI ALLE CARATTERISTICHE DEL FARMACO**

Le caratteristiche principali che intervengono nella regolazione della permeabilità transdermica di una molecola sono la lipofilia e le dimensioni molecolari.

La lipofilia è un fattore-chiave per la regolazione della ripartizione di un farmaco tra la formulazione e lo strato corneo. Infatti lo strato corneo, lipofilo, non ha caratteristiche favorevoli per molecole cariche o molto polari, e il loro assorbimento attraverso la cute è molto ridotto e a volte tale da precluderne una somministrazione transdermica passiva.

Anche un'eccessiva lipofilia può essere problematica. Il farmaco prima di arrivare alla circolazione sistemica si deve ripartire fra strato corneo e epidermide, caratterizzata da un più elevato contenuto di acqua. E' importante quindi che il farmaco abbia una certa idrofilia. Un buon permeante deve quindi avere un corretto bilancio idrofilo/lipofilo.

Anche le dimensioni molecolari sono fondamentali in quanto la diffusività di un farmaco è inversamente proporzionale alle sue dimensioni. Ciò significa che molecole grandi diffondono più lentamente di quelle piccole.

### **V.5.b. FATTORI LEGATI ALLA STRUTTURA E ALLE CONDIZIONI DELLA CUTE**

Il primo fattore da considerare è l'integrità dello strato corneo, le cui caratteristiche influenzano appunto la permeabilità cutanea. I flussi di farmaco, ottenuti in assenza dello strato corneo -che può essere asportato grazie allo skin stripping- o in presenza di un danno tissutale che ne comprometta l'integrità, sono sempre più elevati dei flussi ottenuti attraverso la cute intatta.

Per ragioni non ancora del tutto chiarite, anche l'idratazione della cute è un fattore importante. Una cute idratata è infatti sempre più permeabile al passaggio di farmaci. Per questo motivo l'utilizzo di bendaggi esclusivi, che favoriscono l'idratazione, determina un aumento del flusso di alcuni farmaci attraverso la pelle. La ragione di questo incremento della permeabilità può essere legata all'idratazione degli sfingolipidi e delle ceramiche cutanee, ma l'esistenza di un chiaro legame causa-effetto non è stata ancora del tutto verificata.

E' importante anche tener presente il sito anatomico di applicazione del farmaco. E' noto che determinate regioni del corpo sono significativamente più permeabili di altre (genitali, ascelle, pelle del viso, regione post auricolare).

Inoltre una modificazione delle condizioni fisiologiche della cute, indotta per esempio dalla presenza di determinate patologie (eczemi, infezioni fungine, psoriasi) può determinare un'alterazione della composizione lipo-proteica dello strato corneo o un'anomala differenziazione delle cellule epidermiche e quindi un'alterazione della permeabilità cutanea.

#### **V.5.c. FATTORI LEGATI ALLA COMPOSIZIONE DELLA FORMULAZIONE APPLICATA**

Dal momento che la ripartizione di un farmaco tra la formulazione e strato corneo è la prima tappa determinante nel cammino verso il sito target, è chiaro che le caratteristiche chimico fisiche della formulazione giocano un ruolo determinante nella biodisponibilità.

#### **V.6. PROMOTORI CHIMICI DI ASSORBIMENTO**

Gli “enhancers” o promotori chimici sono sostanze in grado di aumentare la permeazione di una molecola attraverso la pelle, modificando la struttura della barriera cutanea.

Per essere un buon “enhancer”, una molecola deve avere determinate caratteristiche: non deve esercitare alcun effetto farmacologico ed essere specifico nella sua azione di promozione dell'assorbimento; deve agire velocemente, con durata prevedibile ed il

suo effetto deve essere completamente reversibile; deve essere chimicamente e fisicamente stabile e compatibile con tutti i componenti presenti nella formulazione.

Dovrebbe inoltre essere inodore ed incolore, non allergenico, non tossico e non irritante.

La classe dei promotori di assorbimenti cutanei comprende una vasta gamma di composti quali i solfossidi, gli alcoli, i polioli, gli alcani, gli acidi grassi, gli esteri, le amine e le amidi, i terpeni, i surfattanti, le ciclodestrine e l'acqua.

Solventi quali etanolo e glicole propilenico, possono essere considerati promotori in quanto possono aumentare l'assorbimento modificando la solubilità del permeante, però la loro azione "enhancer" non è molto elevata, poiché sono significativamente coinvolti nell'estrazione solo lipidi piuttosto polari.

Altri promotori di assorbimento sono gli acidi grassi, che presentano una porzione polare e una catena alchilica di natura apolare con la quale si inseriscono nella struttura lipidica dello strato corneo. Inoltre interagiscono con la matrice extracellulare disorganizzandola e fluidificandola, in modo da rendere più facile la diffusione attraverso lo strato corneo. L'attività di queste molecole è influenzata da diversi fattori, tra cui la lunghezza della catena, la posizione, il tipo *-cis/trans-* e il numero di doppi legami: il maggior grado di permeazione è offerto da

molecole a 12 atomi di carbonio, la più rappresentativa delle quali è l'acido laurico.

Anche il dimetilsolfossido (DMSO) è un promotore di assorbimento; i meccanismi d'azione proposti includono l'estrazione dei lipidi e delle proteine dello strato corneo, la destrutturazione dei corneociti e la delaminazione dello strato corneo. L'irreversibilità di azione di questa molecola, insieme con la tossicità legata all'utilizzo di elevate concentrazioni, che pure si sono rilevate necessarie per espletare l'effetto di promotore, rendono però questo composto inaccettabile dal punto di vista terapeutico.

Un altro tipo di *enhancer* è rappresentato da molecole di natura idrofila, tra cui i tensioattivi anionici e cationici. Essi sono in grado di aprire canali idrofili nello strato corneo, facilitando la diffusione delle molecole. Per la loro struttura, interagiscono con i domini proteici di natura idrofila dello strato corneo solubilizzando alcune porzioni della matrice extracellulare. L'efficacia della loro azione è legata alla rottura dei legami disolfuro, che comporta la liberazione di gruppi tiolici e la conseguente ritenzione di acqua.

## **V.7. PROMOTORI FISICI DI ASSORBIMENTO: IONOFORESI**

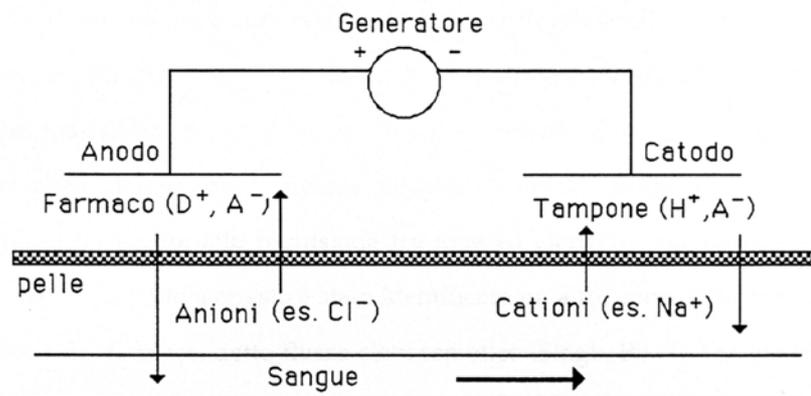
Nel processo di assorbimento passivo la via annessiale è pesantemente sfavorita dalla limitata superficie rappresentata dagli annessi cutanei. L'applicazione di corrente elettrica alla pelle aumenta il flusso di farmaco attraverso questa via che costituisce, in queste condizioni, la principale via di penetrazione.

La pelle offre una certa resistenza al passaggio della corrente elettrica. La conducibilità relativa dei diversi tessuti è correlata al loro contenuto in acqua e lo strato corneo, che contiene circa il 20 % di acqua, valore di molto inferiore al livello dei tessuti viventi (circa 70%), è quello che contribuisce maggiormente alla resistenza totale della pelle. Quando una differenza di potenziale viene applicata alla pelle, il movimento degli ioni che trasportano la corrente avverrà attraverso le vie di minor resistenza. Queste vie sono rappresentate dagli annessi della pelle e da altre imperfezioni del tessuto.

Sono state evidenziate una via intracellulare non annessiale ed una via di penetrazione intercellulare anche nel caso del trasporto ionoforetico, anche se di entità notevolmente inferiore.

### V.7.a. SCHEMA DI UN SISTEMA TRANSDERMICO IONOFRETICO

L'applicazione di corrente richiede l'utilizzo di un generatore di corrente continua. Per ragioni di sicurezza, vengono preferiti generatori che forniscono una corrente costante, a voltaggio variabile a seconda della resistenza del sistema. Esistono due tipi di ionofresi: anodica e catodica (Guy RH, 2000). La ionofresi anodica facilita il passaggio attraverso la pelle di un farmaco caricato positivamente, quella catodica invece facilita il passaggio di un farmaco caricato negativamente. Durante una ionofresi anodica il farmaco viene posto in soluzione a contatto con la pelle e con l'elettrodo positivo (anodo). L'elettrodo negativo (catodo) è a contatto con una soluzione contenente solo elettroliti, a loro volta a contatto con la pelle. I due elettrodi sono collegati ad un generatore di corrente continua di intensità costante.



**Figura 9.** Schema di un sistema transdermico ionoforetico

Quando la corrente è applicata, la molecola carica positivamente è respinta dall' anodo in direzione del tessuto sottostante, dal quale può eventualmente raggiungere i capillari sanguigni e immettersi nel torrente circolatorio.

Nella ionoforesi catodica, quando il farmaco è carico negativamente, la soluzione contenente il farmaco è posta a contatto col catodo.

La corrente applicata produce dunque un flusso di farmaco attraverso la pelle e un flusso di controioni dai tessuti ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  presenti nei fluidi extra cellulari), che mantengono l'elettroneutralità del sistema.

Oltre alla corretta polarità, la corrente applicata deve essere di opportuna intensità e durata.

#### **V.7.b. MECCANISMI DI TRASPORTO**

La corrente elettrica applicata durante la ionoforesi produce un flusso di farmaco attraverso la pelle e un flusso di controioni ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) dai tessuti che mantengono l'elettroneutralità del sistema. Questo costituisce il trasporto elettrico propriamente detto ed è chiamato elettrorepulsione, in quanto è dovuto alla repulsione tra ione ed elettrodo avente la stessa polarità.

Accanto a questo è stato identificato un altro contributo al flusso totale del farmaco, detto flusso elettrosmotico. Questo è un flusso di solvente che si verifica quando una differenza di potenziale viene applicata ai due lati di una membrana lipidica, porosa caricata elettricamente. La pelle può essere assimilata ad una membrana lipidica, porosa per la presenza degli annessi della pelle (dotti ghiandolari e follicoli piliferi) e carica poiché presenta un punto isoelettrico compreso fra 3 e 4. Al di sopra di questo valore di pH la pelle si trova carica negativamente. Questa carica negativa è il risultato di numerosi residui aminoacidici, i quali portano appunto una carica negativa (ad esempio i gruppi carbossilici). A valori fisiologici di pH, in prossimità della parete del poro (carica negativamente) si troverà un eccesso di ioni positivi (controioni).

Quando un campo elettrico viene applicato alla pelle, si determinerà la migrazione dei controioni positivi nella direzione dell'anodo al catodo.

Questa migrazione genera un movimento di liquido nella stessa direzione di migrazione del controione, dal polo positivo verso quello negativo. Il risultato di questo flusso convettivo di liquido è il trasporto anodico di tutte le sostanze presenti nella soluzione all'anodo, indipendentemente dalla presenza di cariche elettriche.

Infine, anche se in misura molto ridotta, il trasporto diffusivo di farmaco contribuisce al trasporto totale.

### V.7.c. EFFETTO DELLA CORRENTE SUL TESSUTO CUTANEO

Durante un esperimento ionoforetico la differenza di potenziale diminuisce in modo sensibile dopo circa 30 minuti dall'inizio dell'applicazione della corrente, evidenziando un'alterazione di resistenza del tessuto cutaneo (Volpato NM, 1995). Parallelamente alla diminuzione di resistenza si verifica anche un aumento della permeabilità ai farmaci. Le alterazioni di resistenza elettrica e di permeabilità riscontrate non hanno un'esatta spiegazione. Secondo alcuni autori il fenomeno sarebbe dovuto ad accumulo di ioni, proveniente dal compartimento donatore, negli strati più esterni della pelle, che provoca un aumento della conducibilità dell'epidermide. Secondo altri autori l'applicazione di corrente provoca una alterazione più o meno reversibile del tessuto cutaneo.

La densità di corrente applicata ha un'importanza fondamentale sulla reversibilità dell'alterazione. Infatti la resistenza della pelle decresce all'aumentare del voltaggio applicato e del tempo di applicazione. Applicando una densità di corrente inferiore a  $15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  per un tempo di 15-20 minuti, la diminuzione di resistenza è completamente reversibile; con densità di corrente più elevate si sono riscontrati sia effetti reversibili che irreversibili (Singh S, 1993).

E' stato anche determinato anche il tempo di recupero della pelle, cioè il tempo necessario al tessuto cutaneo per ritornare ai valori basali di

resistenza, dopo l'interruzione della corrente: anche il tempo di recupero è proporzionale al tempo di applicazione e alla densità di corrente (Oh SY, 1995).

#### **V.7.d. FATTORI CHE INFLUENZANO IL TRASPORTO IONOFORETICO**

Il trasporto ionoforetico può essere influenzato da diversi fattori come le proprietà chimico-fisiche del farmaco (dimensioni molecolari, carica), fattori formulativi (veicolo, tampone, pH, viscosità, presenza di altri ioni), fattori elettrici (intensità di corrente, corrente utilizzata), fattori biologici (spessore e integrità dello strato corneo) e altri fattori quali la durata del trattamento.

##### **1) pH**

Nella somministrazione ionoforetica, la quantità di sostanza presente nel sistema in forma ionizzata è un importante fattore per il suo trasporto. Dal momento che la maggior parte di farmaci sono acidi o basi deboli, cambiamenti di pH nella soluzione donatrice determinano una variazione nella percentuale di farmaco ionizzato. Inoltre il pH svolge un ruolo rilevante nei confronti del flusso elettrosmotico, alterando la carica di gruppi ionici all'interno della pelle ed influenzando quindi la direzione e l'entità del flusso elettrosmotico.

Il pH viene mantenuto al valore desiderato tramite l'utilizzo di tamponi. Il tampone ideale è quello che contiene ioni in concentrazioni

tali da dare un contributo minimo al trasporto di corrente, senza perdere la capacità tamponante per il mantenimento del pH.

Inoltre è importante tenere presente che il pH delle soluzioni applicate alla pelle deve essere contenuto tra 3 e 8 in modo da non produrre irritazioni e danno alla pelle.

## **2) Competizione ionica**

La presenza di ioni con carica dello stesso segno del farmaco (co-ioni) nella soluzione donatrice risulterà in una competizione ionica per il trasporto della corrente. In particolare gli ioni  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$ , piccoli e mobili, sono altamente competitivi.

## **3) Corrente**

La maggior parte degli esperimenti ionoforetici utilizza corrente continua di intensità costante. Il flusso di farmaco è direttamente proporzionale alla densità di corrente elettrica applicata: il valore di massima densità ben tollerato non può superare  $0.5 \text{ mA/cm}^2$  (Banga 1988). In alternativa alla corrente continua di intensità costante, è stato proposto l'uso di corrente continua pulsante. Pare che attenui il fenomeno di polarizzazione della pelle e lo sviluppo di possibili irritazioni.

## **4) Elettrodi**

E' molto importante anche il materiale che costituisce gli elettrodi. Gli elettrodi inerti tipo nichel, platino, acciaio, provocano elettrolisi dell'acqua con formazioni di ioni  $\text{H}^+$  all'anodo e di ioni  $\text{OH}^-$  al catodo.

Questi hanno un'elevata mobilità e di conseguenza competono con il farmaco per il trasporto della corrente; inoltre possono provocare alterazioni significative del pH che possono danneggiare la pelle e/o compromettere la stabilità della formulazione.

L'impiego di elettrodi reversibili, tipo Ag/AgCl, evita il verificarsi di questi fenomeni (Yoshida 1992). Questi elettrodi sono costituiti da una miscela d'argento e cloruro d'argento: le reazioni di ossidazione e di riduzione provocano la trasformazione dell'argento in cloruro e viceversa.

Anodo:  $\text{Ag}^0(\text{s}) + \text{Cl}^-(\text{aq}) = \text{AgCl}(\text{s}) + \text{e}^-$  ossidazione

Catodo:  $\text{AgCl}(\text{s}) + \text{e}^- = \text{Ag}^0(\text{s}) + \text{Cl}^-(\text{aq})$  riduzione

Queste reazioni hanno un potenziale redox inferiore a quello dell'acqua e quindi ne evitano l'elettrolisi.

### **5) Concentrazione e dimensioni molecolari**

L'aumento di concentrazione del farmaco nel compartimento donatore produce un aumento lineare nella permeazione, mentre sembra esistere una proporzionalità inversa fra peso molecolare e coefficiente di permeabilità.

### **6) Caratteristiche della pelle**

Lo spessore dell'epidermide condiziona la permeabilità, quindi assume importanza la regione del corpo sulla quale si applica la ionoforesi.

### **V.7.e. UTILIZZO DELLA IONOFORESIS**

La ionoforesi può essere impiegata sia per accumulare il farmaco nella pelle e nei tessuti sottostanti con lo scopo di un'azione locale, sia per promuovere l'assorbimento sistemico di farmaci con determinate caratteristiche chimico-fisiche e farmacologiche.

I farmaci ad azione sistemica attualmente utilizzati in terapia per via transdermica sono caratterizzati da piccole dimensioni ed elevata lipofilia (nitroglicerina, isosorbide di nitrato, scopolamina, clonidina, estradiolo).

L'utilizzo della ionoforesi permetterebbe invece la somministrazione di farmaci prevalentemente ionizzati e di natura idrofilica. A questa classe di composti appartiene anche il meloxicam.

## **VI. MELOXICAM**

### **VI.1. LA INFLAMACIÓN**

Desde que Celsius (s. I d.C.) describiera los signos de la inflamación –rubor, tumor, calor y dolor- a los cuales Virchow añadió otro, la pérdida de función, se han realizado numerosas investigaciones sobre el desarrollo de estos procesos inflamatorios que posibilitan la utilización exitosa de fármacos antiinflamatorios en el tratamiento de este tipo de alteraciones (González-Rodríguez M, 2002).

La inflamación es un proceso de defensa del organismo ante una agresión tisular. Esta respuesta de carácter protector tiene como último objetivo librar al organismo de la causa inicial de la lesión celular y de las consecuencias de la misma, así como de las células y restos necróticos. Si no existiera este proceso las infecciones se propagarían de forma incontrolada, las heridas no se curarían y los órganos lesionados presentarían lesiones supurativas de forma permanente (García ME, 2002).

La respuesta inflamatoria tiene lugar en el tejido conjuntivo vascularizado e implica a los constituyentes celulares y extracelulares del mismo incluyendo plasma, células circulantes y vasos sanguíneos.

Las fases iniciales de la inflamación son un proceso de reparación que no cesará hasta haber neutralizado el estímulo lesivo. Este proceso de

reparación consiste en la sustitución del tejido lesionado por células parenquimatosas nativas, por la proliferación del tejido fibroblástico – cicatrización- o, con mayor frecuencia, por la combinación de ambos mecanismos.

Sin embargo, los procesos de inflamación y reparación pueden ser perjudiciales ya que pueden constituir, por ejemplo, el mecanismo patogénico básico de las reacciones de hipersensibilidad potencialmente mortales que se originan como consecuencia de fármacos o sustancias tóxicas y, también, de algunas enfermedades crónicas como la artritis reumática, la aterosclerosis y la fibrosis pulmonar.

La inflamación en los pacientes con artritis reumatoide implica probablemente la combinación de un antígeno (gammaglobulina) con un anticuerpo (factor reumatoide) y complemento, causando la liberación local de factores quimiotácticos que atraen a los leucocitos. Estos fagocitan los complejos de antígeno, anticuerpo y complemento y también liberan las muchas enzimas contenidas en sus lisosomas. Estas enzimas lisosomales dañan entonces el cartílago y otros tejidos, y esto aumenta el grado de inflamación. También pueden intervenir inmunorreacciones mediadas por células. Durante este proceso también se liberan prostaglandinas.

Los fármacos antiinflamatorios potencian los efectos beneficiosos de la inflamación controlando, al mismo tiempo, los efectos nocivos de estos procesos.

Los procesos inflamatorios presentan dos fases bien diferenciadas: *aguda* y *crónica*. La respuesta vascular y celular de ambas está mediada por factores químicos procedentes del plasma o de las células que son activados por el propio estímulo inflamatorio. Estos mediadores pueden actuar de forma aislada, secuencial o en combinación y en fases posteriores amplifican la respuesta inflamatoria e influyen en su evolución. Las propias células y tejidos necróticos son capaces de activar por sí mismos la producción de mediadores de la inflamación. Esto es lo que ocurre en los procesos de inflamación secundarios al infarto de miocardio.

Aunque es difícil dar una buena descripción del proceso inflamatorio en términos de eventos celulares subyacentes en el tejido lesionado, algunos rasgos del proceso se aceptan generalmente como característicos del mismo: fenestración de los microvasos, filtración de los elementos sanguíneos en los espacios intersticiales y migración de leucocitos al tejido inflamado. A nivel macroscópico todo esto se acompaña generalmente de los conocidos signos, indicados más arriba, de eritema, edema, hipersensibilidad -hiperalgesia- y dolor. Durante esta compleja respuesta, mediadores químicos como la histamina, la 5-hidroxitriptamina (5-HT), la sustancia de acción lenta de la anafilaxia (SRS-A), diversos factores quimiotácticos, la bradiquinina y las prostaglandinas se liberan localmente. Células fagocíticas migran al área y puede haber ruptura de membranas lisosomales celulares con liberación de enzimas líticas. Todos estos eventos pueden contribuir a la respuesta inflamatoria. Sin embargo, cabe dudar de la importancia de la 5-HT e

histamina en la iniciación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria (Goodman A, 1981).

## **VI.2. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROÍDICOS (AINE)**

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se utilizan en terapéutica atendiendo a las tres acciones que llevan a cabo: analgésica, antipirética y antiinflamatoria. alguna de estas acciones puede ser particularmente acusada, comparativamente con las otras, en ciertos fármacos de esta familia.

La tabla 1 presenta una clasificación de fármacos eficaces en dolores de intensidad moderada, sin que alcancen nunca el techo analgésico de los opiáceos. Otra característica común de estos fármacos se refiere a sus efectos secundarios más frecuentes (Rainsford KD, 1999) entre los que siempre se da, de forma más o menos acusada, la irritación gástrica, consecuencia de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas que constituye el mecanismo de acción determinante de sus propiedades terapéuticas. Los efectos secundarios renales son mucho menos frecuentes pero vienen ocasionados también por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

**Antiinflamatorios no esteroideos:**

- **Salicilatos:** Aspirina  
*Diflunisal*
- **P-aminofenol:** Paracetamol
- **Pirazolonas:** Metamizol  
Fenilbutazona  
Azapropazona
- **Ácidos arilcarboxílicos:**  
Acético: Indometacina  
Sulindaco  
Diclofenaco  
Propiónico: Ibuprofeno  
Naproxeno
- **Oxicanes:** Piroxicam  
Meloxicam

**Tabla 1.** Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos.

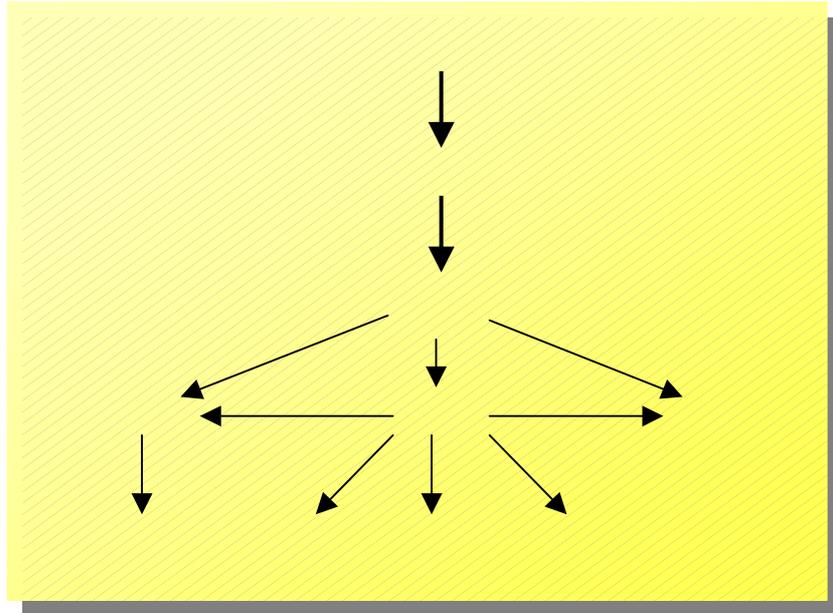
**MECANISMO DE ACCIÓN DE AINE**

El mecanismo comúnmente aceptado de los AINE es la inhibición de la enzima ciclooxigenasa que cataliza el primer paso de la ruta biosintética en la que se generan las diversas prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico (Figura 10) (Santoyo S, 1996). Debe tenerse en cuenta, no obstante, que no existe una correlación estricta entre la potencia analgésica o antiinflamatoria y el grado de

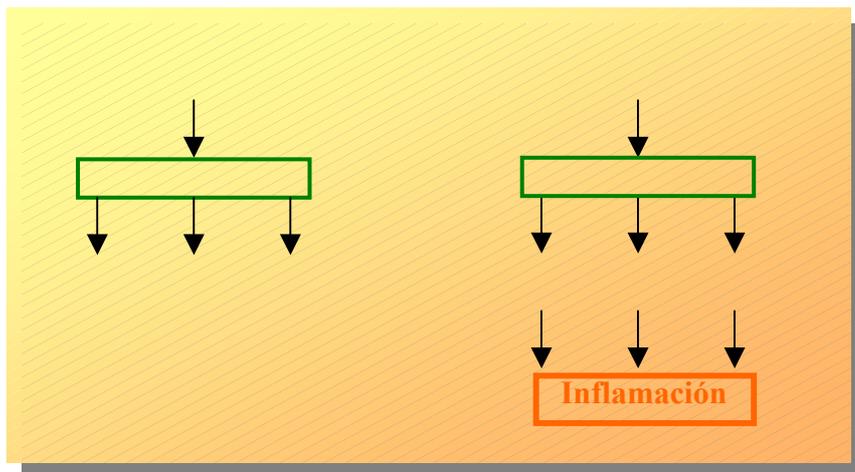
inhibición de la enzima. Otros factores tales como la inhibición de la migración leucocitaria, la neutralización de radicales libres, etc., deben influir también en la acción de los AINE. Si bien, esta clase de fármacos se denominan también analgésicos periféricos, por contraposición a los centrales (opiáceos), no cabe descartar rigurosamente en las acciones de alguno de ellos un componente central.

De acuerdo con lo anterior, la acción analgésica es debida a la prevención de la acción sensibilizadora de las prostaglandinas sobre los nociceptores mientras que la acción antipirética puede posiblemente correlacionarse con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub> y otras) a nivel del área preóptica del hipotálamo. Se sabe, de hecho, que la administración localizada de prostaglandinas en un ventrículo lateral produce fiebre. Puesto que las prostaglandinas intervienen, junto con otros mediadores, en los procesos inflamatorios agudos, la inhibición de su síntesis debe jugar también un papel en la acción antiinflamatoria de los fármacos aquí considerados.

El reciente descubrimiento de la existencia de dos formas distintas de la enzima ciclooxigenasa, COX-1 y COX-2 (Figura 11), de las que la primera es constitutiva mientras que la segunda es inducible por estímulos inflamatorios, podría quizás constituir la base racional para el desarrollo de nuevos fármacos analgésicos-antiinflamatorios.



**Figura 10.** Biosíntesis de derivados del ácido araquidónico por ciclooxigenación.



**Figura 11.** Acciones de las dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX).

### **VI.3. OXICANES**

Los oxicanes, también llamados oxicamas, son derivados tiazínicos entre los que se encuentran el *piroxicam*, *tenoxicam* y *meloxicam*. Este último parece tener una acción inhibidora selectiva sobre la COX-2. Estos fármacos presentan características estructurales y farmacocinéticas sensiblemente diferentes al resto de los AINE, pero comunes entre sí (Cantera RC, 1995):

- En la molécula hay dos anillos aromáticos
- La estructura molecular presenta tautomería
- En la molécula hay zonas apolares y, otras, de carácter polar
- Tienen comportamiento anfótero, debido a que en la molécula hay grupos de carácter ácido y básico
- Pueden formar múltiples enlaces de hidrógeno intermoleculares, con carácter aceptor y dador de protones
- También se forman enlaces de hidrógeno intramoleculares
- Forman quelatos con cationes divalentes de metales de transición
- Las moléculas son prácticamente planas con la posibilidad de giro restringida al enlace amida.

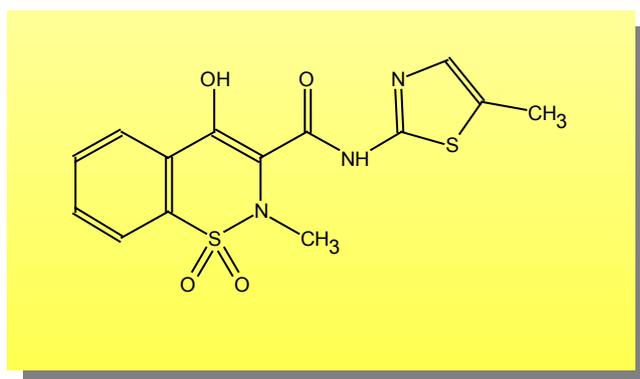
Comparten con el resto de los AINE la actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Su principal ventaja radica en su larga vida media, superior a 24 horas, que permite una única administración diaria. Se utilizan principalmente en procesos crónicos reumatológicos, y se

deben administrar durante unas dos semanas para obtener la máxima respuesta terapéutica.

Las reacciones adversas más frecuentes son a nivel gastrointestinal, aunque el riesgo de hemorragia y úlcera gástrica con piroxicam es menor que con aspirina. Pueden producir reacciones de hipersensibilidad cutánea y de fotosensibilidad (Del Río RM, 2000).

#### **VI.4. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

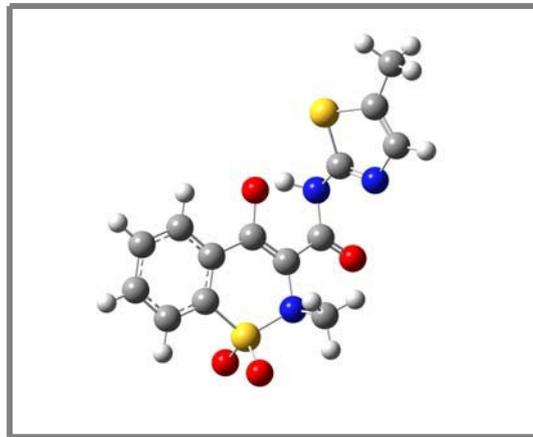
El meloxicam ( $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$ ) (Mx), 4-Hidroxi-2-metil-N-(5-metil-2-tiazolil)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida 1,1-dióxido (Figuras 12, 13), tiene una masa molecular de  $351,41 \text{ g mol}^{-1}$ .



**Figura 12.** Estructura química del meloxicam.

Fotosensible; termolábil; sensible a la acción del aire atmosférico.

El meloxicam (Mx) puede ser aislado para fines farmacéuticos mediante cristalización en solventes orgánicos no polares como el tetrahidrofurano (THF). La estructura de Mx obtenida de esta manera presenta tautomería. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, predomina la forma aniónica. El Mx puede existir en forma Z (zwitterion) en solventes polares pero se presenta exclusivamente en forma enólica (E) en solventes no polares como el THF. Otras especies moleculares como la forma catiónica se pueden presentar en condiciones ácidas (Figura 13).



**Figura 13.** Estructura tridimensional de la forma aniónica de meloxicam.

El Mx forma sales con las bases; por ejemplo, forma sal de amonio con amoníaco y sal sódica con hidróxido sódico. Al disolver el Mx en solución acuosa de hidróxido sódico con la posterior adición de ácido acético hasta alcanzar un pH 7 se obtienen cristales amarillos del sistema

ortorrómico. La forma empleada en este trabajo es la sal sódica hidrosoluble de meloxicam suministrada por SIGMA

La hidrosolubilidad de los AINES es pH-dependiente. La disminución del pH produce un incremento del cociente fármaco no-ionizado/ ionizado que conlleva una disminución de la solubilidad. La tabla 2 muestra la solubilidad de meloxicam en solución acuosa a diversos valores de pH.

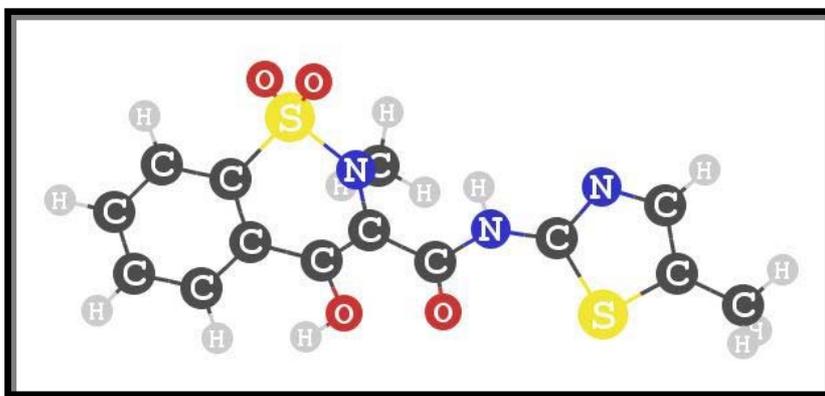
Valor de pH	Solubilidad (mg/100 ml)
1,0 (0,1 M HCl)	0,086
1,0 (tampón)	0,093
2,0 (tampón)	0,037
3,0 (tampón)	0,038
4,0 (tampón)	0,049
5,0 (tampón)	0,213
6,0 (tampón)	2,70
7,0 (tampón)	26,6
8,0 (tampón)	155
9,0 (tampón)	195
10,0 (tampón)	231

**Tabla 2.** Solubilidad de Mx a diversos valores de pH.

La solubilidad de Mx aumenta a valores de pH muy bajos indicando una segunda constante de ionización ( $pK_a$ ). A partir de estos datos se podrían estimar los valores de  $pK_a$ . El análisis espectrofotométrico UV, sin embargo, resulta más preciso para determinar dichos valores correspondientes al Mx en solución acuosa. El análisis de absorción a 360 nm en el intervalo de pH 2,5-6,5 revela un valor de  $pK_a$  de 4,18 y el análisis a 380 nm en el intervalo 0-3 revela un segundo valor de  $pK_a$  de 1,09 (Luger P, 1996). Por tanto, el comportamiento de ionización del Mx se podría resumir del siguiente modo: en solución acuosa, a valores de  $pH > 4,18$  se encuentra ionizado y la especie dominante es la forma aniónica. Sin embargo, en condiciones más ácidas ( $pH < 4,18$ ) y dependiendo de la polaridad del solvente, el meloxicam puede existir en forma enólica (enol) cetónica (zwitterion). En condiciones acuosas, la forma dominante es la zwitterion. A valores de pH bajos pueden existir especies catiónicas.

La habilidad de los compuestos para atravesar membranas por difusión lipídica depende del coeficiente de partición entre la fase acuosa y la fase lipídica de la membrana. Dado que las moléculas no ionizadas son más liposolubles el pH de la fase acuosa afecta la ionización y el coeficiente de partición ( $\log P$ ). El Mx presenta valores de  $\log P$  mayores (es decir, es más lipofílico) que el piroxicam y tenoxicam. Por ejemplo, a pH 4, el  $\log P$  de Mx es 2,34 mientras que el correspondiente al piroxicam es 1,68 y, al tenoxicam, 0,82. De entre el grupo de ácidos enólicos el Mx presenta la mayor habilidad para atravesar membranas y acceder al sitio activo del enzima COX-2.

Los estudios sobre valores de  $pK_a$ , solubilidad y  $\log P$  muestran diferencias significativas entre el Mx y el piroxicam a pesar de que la conformación de la cadena lateral de ambas moléculas es similar en condiciones semejantes de protonización. Otras diferencias moleculares parecen ser responsables de la explicación de la mayor selectividad de Mx hacia la COX-2 que hacia la COX-1. Se ha demostrado que el isómero 4' de Mx –que presenta el grupo metilo en posición 4' en lugar de en 5'– no manifiesta selectividad hacia la COX-2. Esta diversa afinidad hacia ambas isoenzimas podría ser explicada por la interacción del grupo metilo con el sitio activo de las enzimas, pero se requiere un estudio más profundo para esclarecer la función de este grupo metilo.



**Figura 14.** Estructura química de meloxicam en forma tridimensional.

La Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios otorgó la autorización de comercialización de Mx en 1996. Se clasificó como un fármaco con potencial terapéutico B –modesta mejora terapéutica–, según los criterios fijados para comparar nuevos medicamentos con los existentes en España en el momento de su autorización. Dicha categoría

corresponde a aquellos medicamentos que constituyen un avance modesto, pero real, sobre otros medicamentos disponibles en el mercado –menos reacciones adversas, menor coste del tratamiento, más cómodos para el paciente, útiles en pacientes concretos-.

## **VI.5. FARMACODINAMIA Y FARMACOCINÉTICA**

### **VI.5.a. PROPIEDADES FARMACODINÁMICAS**

Analgésico, antiinflamatorio no esteroídico y antipirético de la familia de los oxicanes. Como todos los AINE actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas bloqueando la actividad de la enzima ciclooxigenasa (COX) de la que existen dos isoformas: COX-1, constitutiva, relacionada con los efectos secundarios gastrointestinales/renales al ser inhibida por estos fármacos y de presencia constante en los tejidos; y, la COX-2, responsable de la respuesta inflamatoria e inducible por citoquinas en el lugar de la inflamación.

En los diversos estudios realizados, tanto *in vitro* como *in vivo*, el Mx ha presentado una mayor selectividad frente a la COX-2 (Dequeker J, 1998) que, en teoría, significa una mayor actividad antiinflamatoria y una mejor tolerancia comparada con los otros fármacos del grupo.

Esta inhibición selectiva ha sido demostrada *in vivo* en varios sistemas celulares: células endoteliales de aorta de bovino –para estudio

de la actividad COX-1-, macrófagos de ratón –para estudio de la actividad COX-2- y enzimas humanas recombinantes expresadas en células cos. Las evidencias demuestran que la inhibición de la COX-2 es la responsable de las acciones terapéuticas de los AINE en tanto que la inhibición COX-1 es la responsable de los efectos secundarios a nivel gástrico y renal. Los estudios clínicos realizados han demostrado una menor incidencia de efectos secundarios a nivel gastrointestinal incluyendo perforaciones, úlceras o sangrado con las dosis recomendadas de Mx en comparación con las dosis habituales de otros AINE.

En estudios comparativos con otros AINE (Gupta SK, 2002) la administración tópica de un gel de Mx presentó una eficacia similar a la de diclofenaco y piroxicam en el tratamiento de la osteoartritis; también fue similar a naproxeno y piroxicam en los casos de artritis reumatoide. En alguno de los estudios realizados sobre la seguridad del Mx, el perfil de reacciones adversas –sobre todo gastrointestinales- fue más favorable que con otros AINE –quizá debido a su mayor selectividad por la COX-2. Sin embargo, en otros, no estuvo del todo exento de este tipo de reacciones aunque su incidencia fue menor comparada con los otros fármacos de su grupo. Por el momento no hay datos concluyentes sobre su mejor tolerancia, requiriéndose más estudios y a más largo plazo para poder determinarlo.

Las reacciones adversas más frecuentes en pacientes tratados con Mx por vía oral incluidos en estudios clínicos han sido las de tipo digestivo – intolerancia gástrica- hasta un 32%. La incidencia de efectos

adversos graves –por ejemplo, ulceración gastrointestinal- ha sido de 0,2% o menos en los estudios consultados (Dequeker J, 1998; Prouse PJ, 1996). Asimismo, se pueden presentar efectos adversos en la piel –prurito y *rash* cutáneo- y en el SNC –cefalea, mareo-.

El contacto directo con meloxicam conlleva para el farmacéutico formulador cierto riesgo de irritación ocular y cutánea por lo que se advierte precaución en su manipulación. Sin embargo, los estudios llevados a cabo sobre tolerancia tisular de formulaciones de aplicación tópica de meloxicam confirman la idoneidad de dichas formulaciones para uso dermatológico en piel y mucosas (Stein P, 1996).

Se utiliza para el tratamiento sintomático de corta duración de las crisis agudas de osteoartritis así como para el tratamiento sintomático a largo plazo de la artritis reumatoide (poliartritis crónica). También está indicado para el tratamiento de la espondilitis anquilosante.

Las dosis recomendadas para las anteriores indicaciones son, por vía oral o rectal:

- Osteoartritis: 7,5 mg/24 h, incrementando en caso necesario a 15 mg/ 24 h.

- Artritis reumatoide: 15 mg/24 h. En ancianos, la dosis recomendada para el tratamiento a largo plazo es de 7,5 mg/24 h. En pacientes con riesgo aumentado de reacciones adversas, se aconseja una dosis inicial de 7,5 mg/24 h.

- Espondilitis anquilosante: 15 mg/24 h.
- Dosis máxima diaria: 15 mg.
- Pacientes dializados con insuficiencia renal grave: no superar los 7,5 mg/24 h.

Las formas de administración comercializadas en España actualmente de este fármaco son la oral y rectal. Por vía oral se debe administrar la dosis total diaria en una sola toma, durante las comidas. En el empleo por vía rectal se recomienda realizar la administración durante el tiempo más corto posible, para prevenir el posible riesgo de toxicidad local.

#### **VI.5.b. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS**

La administración por vía oral de Mx consigue una biodisponibilidad del 90%, alcanzando una concentración sérica máxima de 2,5 µg/ml (dosis única de 15 mg), al cabo de 2,5 h, o de 4,5 µg/ml (15 mg/día, después de una semana), al cabo de 6 h. El estado de equilibrio plasmático se alcanza al cabo de 3-5 días (CGCOF, 2002). Su volumen aparente de distribución (Vd) es de 0,13-0,15 l/Kg. La duración de la acción es de 24 h. Difunde a través de la barrera hematoencefálica, placentaria y lactosanguínea. El grado de unión a proteínas plasmáticas es del 99%.

El Mx se metaboliza principalmente por oxidación del grupo metilo de la molécula tiazolil en el hígado, experimentando un proceso de

recirculación enterohepática que da lugar a metabolitos sin actividad biológica significativa. Su semivida de eliminación es de 20h. Cerca de la mitad de la dosis se elimina por la orina en tanto que el resto lo hace en heces. En orina sólo se encuentran huellas del fármaco inmodificado mientras que en heces se detecta bajo esta forma cantidades inferiores al 5% de la dosis administrada. Su farmacocinética no se modifica en casos de insuficiencia renal de grados medio a moderado (Noble S, 1996).

## **VII. VITAMINA E**

### **VII.1. ENVEJECIMIENTO CUTÁNEO**

El envejecimiento, como el desarrollo, es un proceso biológico común a todos los seres vivos. Este concepto se entiende intuitivamente pero sus mecanismos de aparición y su impacto no están definidos con precisión. Además, el envejecimiento cutáneo es aún más complicado por la contribución acumulativa que ejerce la acción del medio ambiente.

Conceptualmente, el envejecimiento es una pérdida progresiva e irreversible de la capacidad homeostática que, en su estado final, es incompatible con la vida. En el caso de la piel, el envejecimiento se manifiesta por una pérdida de la capacidad funcional máxima y un incremento de la vulnerabilidad a ciertas enfermedades y a factores ambientales.

Se han postulado muchas teorías sobre el mecanismo básico del envejecimiento que pueden resumirse, a grandes rasgos, en dos grupos principales:

- Hipótesis “extrínseca” basada en que el envejecimiento es una causa directa de las eventuales contingencias vitales como, por ejemplo, el progresivo deterioro, la acumulación de productos de desecho metabólico, etcétera.
- Hipótesis “fundamentalista”, que propone la existencia de un envejecimiento programado genéticamente mediante un fenómeno

cronobiológico localizado a nivel celular o que puede ejercer una influencia sobre otros tejidos desde una localización centralizada como el cerebro.

Es difícil establecer una relación entre el envejecimiento de la piel y la expectativa de vida. Hay una gran variedad de factores ambientales y sistémicos (endocrinos, nutricionales, etc.) que afectan adicionalmente a la piel. En cualquier caso, los cambios que aparecen en la piel a lo largo de los años están más bien asociados que causados por el propio envejecimiento.

El envejecimiento cutáneo, sea de origen fisiológico o actínico, es el gran reto de la dermatología y la cosmética contemporánea. Afecta de un modo semejante al tejido epidérmico y dérmico, con implicaciones vasculares y glandulares importantes. Se caracteriza por una piel seca, arrugada y amarillenta, cabello grisáceo y la existencia de pigmentaciones y otros tipos de manchas. Todas las estructuras de la piel se ven afectadas en mayor o menor medida apareciendo en cada una de ellas una serie de manifestaciones específicas en función de sus características morfológicas y bioquímicas. La piel senil presenta una elasticidad reducida, con pérdida de tono cutáneo y una movilidad aumentada de la epidermis.

Las modificaciones más importantes que tienen lugar a grandes rasgos en la morfología de la piel incluyen la sequedad (asperezas o escamosidad), arrugas, superficie débilmente rugosa con un trazado o

dibujo ordenadamente romboidal, laxitud y una variedad de lesiones proliferativas benignas. La asociación de neoplasias benignas con el envejecimiento es especialmente destacable y casi con seguridad representa una pérdida progresiva de homeostasis proliferativa. Aunque no son habituales en la temprana adolescencia, existe una serie de manifestaciones dermatológicas vinculadas al envejecimiento que están presentes en la mayoría de los individuos con edades superiores a los 40 años y su probabilidad aumenta en edades más avanzadas.

#### **VII.1.a. ALTERACIONES FISIOLÓGICAS DE LA PIEL EN FUNCIÓN DE LA EDAD**

Ciertas funciones importantes de la piel se alteran con la edad. A continuación, se indican de forma esquemática algunas de dichas modificaciones aunque hay que tener en cuenta que, en muchos casos, los diversos fenómenos inherentes al envejecimiento están interrelacionados o están solapados entre sí. Estos cambios inducen un deterioro de las condiciones fisiológicas de la piel que se manifiestan, por ejemplo, en una frecuencia aumentada de xerosis, dermatitis y prurito:

- Disminución de la capacidad proliferativa de los queratinocitos en pieles normales y patológicas, así como de la capacidad reparativa en la piel dañada.
- Disminución de la función barrera del estrato córneo. La absorción percutánea de sustancias hidrófobas no se modifica, siendo menor la de moléculas hidrofílicas.

- Disminución de la percepción sensorial e incremento del umbral de dolor cutáneo frente al calor radiante
- Disminución de la producción de sebo
- Predisposición a la hipotermia
- Disminución de la adhesión dermis-epidermis y, por tanto, mayor propensión a producirse desgarros de la piel, abrasiones superficiales, tendencia a la formación de ampollas
- Disminución de la producción de vitamina D
- Diversas modificaciones biofísicas y bioquímicas tales como la disminución del contenido en agua del estrato córneo, incremento del pH de la superficie facial, disminución de la relación colágeno soluble e insoluble, alteraciones de la elastina dérmica, etcétera.

### **VII.1.b. LA AGRESIÓN SOLAR**

La Tierra está sometida de forma ininterrumpida a las radiaciones electromagnéticas que proceden del sol.

Esta radiación ondulatoria presenta longitudes de onda crecientes desde  $10^{-1}\text{Å}$  hasta  $10^{14}\text{Å}$ , y en ella se incluyen, además de los rayos gamma, los rayos X, las radiaciones ultravioletas, la luz visible, las radiaciones infrarrojas y las ondas hertzianas.

Hasta la Tierra llegan grandes cantidades de energía, la mayoría de las cuales corresponden a los rayos gamma y rayos X. Pero la existencia del oxígeno y ozono en nuestra atmósfera realiza una sorprendente

filtración que impide el paso de los citados rayos e incluso retiene las longitudes de onda más cortas del ultravioleta (UVC). Se considera que sólo el 7,15% de la energía que incide sobre la atmósfera terrestre alcanza la superficie de nuestro planeta.

Por sus características y su situación dentro del espectro de radiación, se conoce como luz infrarroja a la que se extiende entre los 700 nm y 3000 nm; se identifica como luz visible a la que se halla entre los 400 nm y los 700 nm; mientras que la luz ultravioleta (UV) se sitúa entre los 100nm y los 400 nm.

Sólo una pequeña parte de la luz UV alcanza la superficie terrestre: las zonas denominadas A (320nm-400nm) y B (290 nm-320nm). Los valores de las radiaciones solares que superan la atmósfera terrestre se reparten aproximadamente de la siguiente forma: 50% corresponde al infrarrojo, 47,5% a la luz visible y 2,5% corresponde al UV. Aunque la contribución de esta última es pequeña, su acción sobre el ser humano es causante del 99% de los efectos indeseables de la radiación solar.

### **VII.1.c. ENVEJECIMIENTO ACTÍNICO**

La luz solar provoca en la piel humana efectos destructivos precoces, ya que siempre se manifiestan síntomas de envejecimiento prematuro y se incrementa el riesgo de cáncer cutáneo.

Se admite que el envejecimiento de los seres vivos está ligado al envejecimiento de sus células y a las alteraciones que sufren las macromoléculas que ocupan los espacios extracelulares.

El envejecimiento fisiológico se muestra primero y claramente en las células diferenciadas, que son las que desarrollan una actividad metabólica precisa de forma ininterrumpida y no poseen recambio de sus estructuras. Esto no ocurre con las células no diferenciadas que entran en mitosis y se renuevan completamente.

A lo largo de la evolución de los seres vivos, éstos han pasado de vivir en condiciones anaerobias a hacerlo en condiciones aerobias, lo cual ha permitido emplear el oxígeno para producir energía y ha forzado a las células a desarrollar mecanismos de defensa capaces de neutralizar la toxicidad del oxígeno. Este planteamiento es el fundamento de la teoría de los radicales libres.

En la cadena respiratoria mitocondrial es la citocromo oxidasa el enzima responsable de la metabolización de más del 95% del oxígeno, mediante una reducción tetravalente sin formación de compuestos intermedios. Pero el 5% del oxígeno se consume mediante una reacción univalente en la cual se producen varios compuestos intermedios, denominados radicales libres. Son moléculas –o fragmentos de moléculas- que contienen uno o más electrones no pareados en su órbita externa, cuya enorme facilidad de reacción propaga un encadenamiento de acciones responsables de diversas lesiones oxidativas. Cada célula

posee los mecanismos celulares –enzimáticos- precisos para frenar el proceso y reparar los daños, pero las células diferenciadas son las que, al carecer de recambio, con el tiempo pierden parte de su capacidad reparadora y sufren la agresión oxidativa en sus proteínas, sus ácidos nucleicos y sus lípidos insaturados.

La radiación UV incrementa de forma importante el número de radicales libres producidos y, con ello, el número de lesiones oxidativas no reparadas que alteran el metabolismo y son responsables del envejecimiento precoz de los epitelios normalmente descubiertos. Es fácil comprender que el nivel de envejecimiento actínico depende del contenido en eumelanina, del espesor del estrato córneo, de la eficacia reparadora que desarrollen las células más expuestas y, sobre todo, del nivel de exposición a la radiación solar.

La actividad antioxidante del tejido cutáneo expuesto de forma crónica a la radiación UV reduce su eficacia y, simultáneamente, la radiación aumenta el número de radicales libres oxidantes, lo cual comporta un incremento de daños seniles prematuros (Gottlober P, 2000).

Uno de ellos, muy visible, es la aparición de manchas cutáneas causadas por la formación y acumulación creciente de sustancias pigmentarias fluorescentes: lipofuscinas.

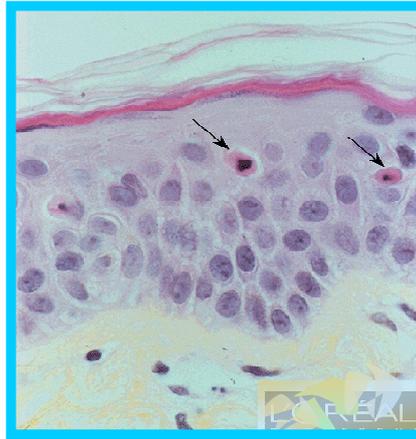
Los fotones UVC son los más energéticos y, por tanto, los que presentan menor poder de penetración. Además, la barrera córnea posee

una gran eficacia filtrante de esta radiación, lo cual limita mucho su actividad dentro de las células epidérmicas. Los fotones UVB son mucho menos energéticos y alcanzan a todas las células de la epidermis con relativa facilidad. Los fotones del UVA son muy poco energéticos y alcanzan todo el tejido cutáneo, incluida la dermis reticular.

La radiación UVC está ausente en una exposición al sol, pero el tejido cutáneo recibe simultáneamente las longitudes del UVB y UVA. Ambas radiaciones se suman o potencian entre sí para provocar eritemas.

El daño producido en el tejido conjuntivo dérmico, de complejas reacciones moleculares, como consecuencia de la exposición actínica está provocado por la radiación UVA.

Toda esta disfuncionalidad histológica (Figura 15) va acompañada en el aspecto externo de la piel por una serie de inesteticismos parecidos a los ya descritos en el envejecimiento cronológico que se escalonan a medida que aumenta la edad del individuo: sequedad pronunciada, aparición o acentuación de finas arrugas, eventual aparición de telangiectasias, disminución del espesor y flexibilidad de la piel, aparición de manchas y otros trastornos (Quiroga M, 1973).



**Figura 15.** Microfotografía de piel fotolesionada con disfuncionalidad citológica evidenciada con flechas en la figura.

## **VII.2. GENERALIDADES DE VITAMINAS**

Las vitaminas son factores nutricionales de naturaleza química compleja y variada que tienen carácter *esencial*, es decir, que tienen que ser aportadas por la dieta, generalmente en pequeña cantidad (Medina JM, 1996). Se puede ingerir con los alimentos un compuesto químico con carácter de *provitamina*, que se convierte en la correspondiente vitamina en el organismo mediante modificaciones metabólicas simples.

Se han clasificado tradicionalmente en liposolubles (A, D, E y K) e hidrosolubles (C y complejo B). A pesar de su simplicidad, esta clasificación sigue siendo útil, sobre todo porque las vitaminas

liposolubles tienden a acumularse en el organismo y pueden originar efectos secundarios nocivos -especialmente las vitaminas A y D-, mientras que las hidrosolubles se eliminan con facilidad y el riesgo de sobredosificación es mucho menor. Además, las vitaminas hidrosolubles son coenzimas o precursores de coenzimas, mientras que esto no es así para las vitaminas liposolubles -con excepción de la vitamina K-.

En este trabajo interesa, en particular, la vitamina E presente en los constituyentes cosmetológicos y que interviene con su acción antioxidante en la fisiología cutánea (Hernández M, 1988).

### **VII.3. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

La vitamina E o tocoferol (VE) está presente en la naturaleza en los aceites vegetales. Existen hasta ocho especies químicas distintas de tocoferol que difieren sólo en el número y posición de los restos metilo en el carbono 5, 7 y 8 del anillo fenólico del cromano:

$\alpha$ -tocoferol = 5,7,8-trimetiltocol

$\beta$ -tocoferol = 5,8-dimetiltocol

$\gamma$ -tocoferol = 7,8-dimetiltocol

$\zeta_2$ -tocoferol = 5,7-dimetiltocol

$\delta$ -tocoferol = 8-metiltocol

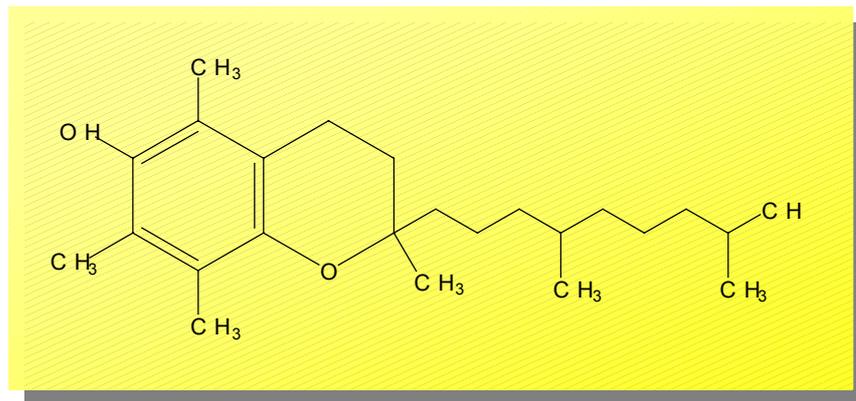
$\eta$ -tocoferol = 7-metiltocol

$\zeta_1$ -tocoferol = 5,7,8-trimetiltocotrienol

$\varepsilon$ -tocoferol = 5,8-dimetiltocotrienol

Todos ellos comparten un grupo hidroxilo en posición *para* con relación al oxígeno heteroatómico. El compuesto más abundante y el que posee mayor actividad es el  $\alpha$ -tocoferol (Figuras 16 y 17) (Manzur-Ul-Haque H, 1973).

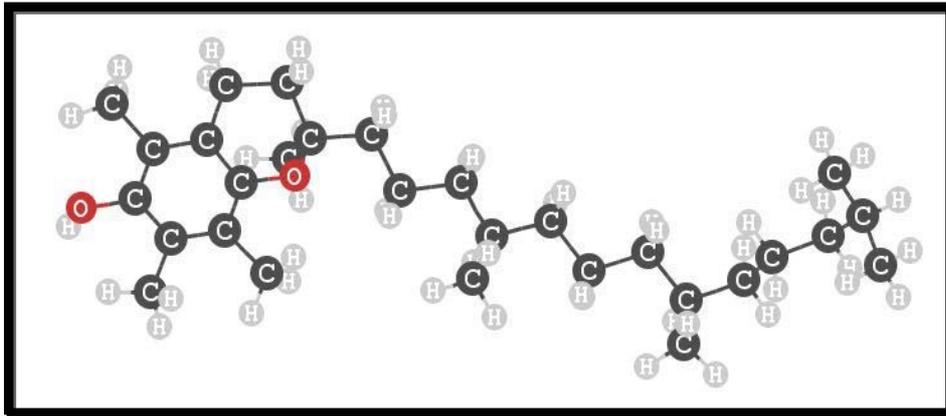
Las fórmulas empíricas del  $\alpha$ -tocoferol y acetato de  $\alpha$ -tocoferilo son  $C_{29}H_{50}O_2$  y  $C_{31}H_{52}O_3$ , y los pesos moleculares son 430,72 y 472,76, respectivamente.



**Figura 16.** Fórmula estructural del  $\alpha$ -tocoferol

Los métodos normalmente empleados para el análisis cuantitativo de la VE se basan directa o indirectamente en la facilidad de oxidación propia del  $\alpha$ -tocoferol libre. Los ésteres de tocoferilo, que se emplean casi exclusivamente en preparaciones farmacéuticas (por ejemplo, acetato o succinato de  $\alpha$ -tocoferilo), deben ser hidrolizados previamente. Dado que el  $\alpha$ -tocoferol libre es muy sensible a la luz y al oxígeno atmosférico, debe procederse con un especial cuidado tanto durante la hidrólisis de los ésteres de tocoferilo como en todas las operaciones analíticas necesarias

para su determinación (por ejemplo, extracción, evaporación del disolvente, etc.). Los ensayos deben llevarse a cabo con la mayor rapidez posible (Strohecker R, 1967). La VE tiene fuerte capacidad de absorber la radiación UV eritematogena comprendida entre 290 y 310 nm. Posee estabilidad estructural que resiste a las modificaciones fotoquímicas (Voyt WF, 1979).



**Figura 17.** Fórmula tridimensional de la estructura del  $\alpha$ -tocoferol.

La actividad antioxidante de la VE está determinada por el fragmento aromático de la molécula (Figura 17), mientras que la cadena hidrocarbonada es necesaria para su adecuada orientación en la membrana biológica (Bonina F, 1996).

#### **VII.4. MECANISMO DE ACCIÓN**

Algunos autores (Suzuki YJ, 1993) han demostrado que el  $\alpha$ -tocotrienol tiene más potencia protectora frente a los radicales libres inducidos por estrés oxidativo que el  $\alpha$ -tocoferol. Se han empleado sistemas de membrana fosfolipídica para investigar el mecanismo antioxidante del  $\alpha$ -tocotrienol en cuanto a sus efectos en el orden estructural de la membrana y los cambios dinámicos en la misma.

Las medidas de fluorescencia indican que el  $\alpha$ -tocotrienol muestra una capacidad neutralizante de los radicales de peroxilo significativamente mayor que el  $\alpha$ -tocoferol en liposomas de fosfatidilcolina mientras que ambos antioxidantes tienen idéntica actividad en hexano. Esto sugiere que la potencia antioxidante del  $\alpha$ -tocotrienol requiere de la cubierta de membrana. Cuando el  $\alpha$ -tocoferol y el  $\alpha$ -tocotrienol se examinaron para evaluar sus efectos en el orden molecular fosfolipídico usando la técnica convencional de marcaje ESR espín con ácido doxilesteárico marcado en posición 5- y 16-, aunque ambos derivados de la VE desordenaron la estructura de gel y estabilizaron la fase de cristal-líquido, no se observaron diferencias en los efectos de los dos compuestos. En experimentos no-invasivos  $^2\text{H}$  NMR, sin embargo, se observó un débil incremento (19% vs 15%) en la capacidad ordenadora del estado de cristal-líquido debido al  $\alpha$ -tocoferol. La diferencia es más notable cerca de las posiciones C10-C13 de la

cadena fosfolipídica que sugiere la localización del  $\alpha$ -tocotrienol más próxima a la superficie de membrana.

Parece ser que las citadas formas de VE presentan distinta extensión espacial debido a los diversos índices de rotación que presentan a lo largo del eje longitudinal molecular y el movimiento de balanceo del eje.

Se han llevado a cabo estudios (Hartmann A, 1995) en voluntarios sometidos a un ejercicio físico intenso con objeto de valorar el efecto que, sobre el daño producido en el ADN de células blancas de sangre periférica, ejercería la suplementación de VE de administración oral. Se comprobó que la ingesta de la vitamina durante varios días anteriores a la práctica del ejercicio logra reducir el daño inducido en el ADN. En cuatro de cinco sujetos, la suplementación vitamínica previno completamente la lesión del ADN tras el ejercicio exhaustivo. Se llevaron a cabo determinaciones de malondialdehído (MDA), marcador de peroxidación lipídica, en suero de voluntarios que habían ingerido vitamina y en controles. Las concentraciones de MDA disminuyeron sensiblemente tras la ingesta de VE y no se modificó a los 15 minutos y 24 horas después del ejercicio. Los resultados demuestran que la VE previene del daño producido en el ADN como consecuencia del ejercicio e indican que la ruptura de las células blancas de la sangre tras el ejercicio exhaustivo es consecuencia del estrés oxidativo.

Diversas afecciones cutáneas pueden implicar la formación de radicales libres: enfermedades autoinmunes, tumores, dermatitis irritativas y alérgicas, psoriasis, inflamaciones en general, acné y rosácea, dermatitis atópica, porfiria, envejecimiento cutáneo, fotoenvejecimiento (Hallywell B, 1993).

La VE tiene una acción inhibidora sobre los radicales libres por su efecto antioxidante (Wolf R, 1998), mejora la microcirculación cutánea y aumenta la resistencia de la piel a los efectos nocivos del sol (Hernández M, 1988). Además, se ha demostrado (Rangarajan M, 1999) su capacidad estabilizadora de membranas, especialmente aquellas que contienen ácidos grasos poliinsaturados.

Un antioxidante tópico ideal debe tener:

- Actividad antioxidante;
- capacidad de penetrar la piel;
- estar presente en forma activa en la piel;
- proteger la piel del daño oxidativo.

Las preparaciones cosmetológicas estudiadas en este trabajo contienen la provitamina acetato de vitamina E (AcVE), antioxidante que, en su aplicación tópica, protege a las células y tejidos del daño producido por los radicales libres generados por los procesos biológicos naturales y por el estrés oxidativo ambiental. La administración tópica de este compuesto es importante debido a los bajos niveles de VE presentes en la epidermis y dermis y a su labilidad frente a la luz UV y el ozono. La

ingesta oral de 300 mg de VE al día no consigue incrementar de forma significativa los niveles de tocoferol en los lípidos de membrana de la piel humana.

Su aplicación es también importante para la piel madura en la que disminuye la perspiración con el paso del tiempo así como la secreción oleosa –especialmente en la zona facial- reduciendo los niveles de secreción de VE. Como consecuencia, la piel queda desprotegida frente al estrés ambiental.

Las principales funciones que desempeña el AcVE en su aplicación tópica son:

- Hidratación de la piel.
- Suavizante de la piel en uso frecuente.
- Coadyuvante de la reparación del tejido cutáneo.
- Protector del estrés ambiental: ayuda a detener la peroxidación lipídica que causa daño a las membranas celulares; reduce el daño inducido por la radiación UV; coadyuvante en la protección frente al ozono. La aplicación tópica de acetato de tocoferol tras la exposición a la radiación UVB reduce de modo significativo el eritema, edema y quemadura asociadas a la irradiación solar (Trevithick JR, 1992; Trevithick JR, 1993).

Numerosos autores han estudiado, asimismo, el efecto beneficioso del aporte tópico de la propia VE en la prevención del daño inducido por la radiación solar demostrando que:

□ La VE es capaz de inhibir el daño que produce la radiación UVA en las membranas celulares de los fibroblastos humanos (Dubertret I, 1998).

□ La radiación UVA disminuye la capacidad de penetración del antígeno por parte de las células de Langerhans de la epidermis humana con un efecto dosis dependiente. La administración de VE previa a la irradiación UVA protege en parte a las células de la epidermis del efecto inmunosupresor de la radiación UVA (Ciment-Lacroix P, 1996).

□ Las radiaciones ultravioletas inducen, rápidamente, cáncer cutáneo y una inmunosupresión que evita la eliminación de tumores incipientes inducidos por la radiación UV. La aplicación repetida de VE puede reducir efectivamente la formación de cáncer y la inmunosupresión inducida por la UV (Berton TR, 1998; Gensler HL, 1991; Gensler HL, 1996; Krol ES, 2000; Mc Vean M, 1999; Rhodes LE, 1998). Además, sirve como suplemento a los filtros solares proporcionando una protección anticarcinogénica adicional (Pinnell SR, 2003).

□ Se consigue mayor protección frente a la peroxidación lipídica del ácido eicosapentaenoico con la aplicación tópica conjunta de vitamina E y C. Además, se consiguen reducir las dosis de ambos antioxidantes (Darr D, 1996; Dreher F, 1998; Moison RMW, 2002). De modo análogo, la administración tópica de vitamina E y A previene el estrés oxidativo y cutáneo así como la inmunosupresión sistémica inducida por la radiación UV (Dreher F, 1999; Sorg O, 2001).

Asimismo, algunos autores (Trivedi JS, 1995) han demostrado su efectividad como promotor de penetración en piel humana incrementando el coeficiente de permeabilidad de la hidrocortisona. Además, observaron una reducción del tiempo de latencia en la piel tratada con VE. Se postula que la vitamina actúa como promotor de penetración intercalándose en la bicapa lipídica del estrato córneo y consiguiendo alterar las características de la membrana. De esta forma, se afecta la permeabilidad debido supuestamente al desorden inducido en el estrato lipídico. A diferencia de otros conocidos promotores, la VE no es irritante y, además, posee propiedades antioxidante y emoliente por lo que es altamente compatible con la piel.

## **VIII. REOLOGÍA**

La reología es una ciencia relativamente reciente. El profesor Bingham acuñó este término en 1920 para referirse al estudio de los materiales que presentaban un comportamiento “extraño” cuando fluían.

Actualmente, se entiende por reología la rama de la ciencia que se ocupa de la deformación y flujo de la materia. Tiene aplicación en diversos campos: para el fisiólogo, la reología gobierna la circulación de la sangre y de la linfa a través de los capilares y los grandes vasos, el flujo mucoso, la curvatura de los huesos, el estiramiento de los cartílagos, la contracción de los músculos; para el médico, la fluidez de las soluciones que se inyectan con jeringas hipodérmicas o que se administran por infusión intravenosa, la flexibilidad de las tubuladuras usadas en los catéteres, la extensibilidad del intestino, etc; para el farmacéutico, la reología es importante en la preparación de la mayor parte de las formas farmacéuticas; así, en formas tópicas semisólidas se estudian su flujo y extensibilidad. En formas líquidas –soluciones, suspensiones, emulsiones- se determinan las propiedades de viscosimetría y oscilometría con objeto de facilitar su administración. Igualmente, es de interés en el estudio de los envases de plástico o vidrio y los cierres de goma; para el consumidor, la reología entra en juego cuando exprime pasta dentífrica de un tubo colapsable, distribuye una loción sobre la piel, unta con manteca una rodaja de pan, etc (Gennaro AR, 1998).

En este trabajo, resulta interesante el estudio reológico para cuantificar fenómenos relacionados con la estabilidad física – sedimentación, redispersión- ya que nos permite conocer la estructura interna de los sistemas.

A continuación se van a tratar algunos aspectos teóricos esenciales para poder, después, interpretar los resultados obtenidos en los ensayos.

### **VIII.1. CONSIDERACIONES GENERALES**

Desde el punto de vista reológico, los sistemas son sólidos si conservan su forma y volumen, líquidos, si conservan su volumen y, gaseosos, si ni su volumen ni su forma permanecen constantes cuando se aplican fuerzas sobre ellos.

Los sólidos ideales se deforman cuando se les aplican tensiones pero recuperan totalmente su forma original cuando esas tensiones cesan. A esta capacidad se denomina **elasticidad**.

Los líquidos, por su parte, pueden ser comprimidos hasta volúmenes bastante pequeños pero recuperan su volumen original cuando se elimina la presión. La línea divisoria entre sólidos y líquidos no está muy bien definida; algunos sistemas que se comportan como sólidos elásticos cuando se someten a pequeñas tensiones y/o a tensiones moderadas de corta duración sufren deformación permanente, como los

líquidos muy viscosos, si las tensiones son mayores y/o se aplican por períodos más prolongados (Houwink R, 1953; Nielsen IE, 1974; Reiner M, 1960).

## **VIII.2. CONCEPTOS BÁSICOS**

### ○ TENSIÓN O ESFUERZO

Se denomina tensión ( $\sigma$ ) a la fuerza que produce la deformación ( $F$ ) o la fuerza igual y opuesta que produce la recuperación del sólido deformado, dividida por el área ( $A$ ) sobre la que se aplica la fuerza ( $F$ ).

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

### ○ DEFORMACIÓN

#### ● **En sólidos:**

Es la modificación relativa de la forma de un cuerpo sólido como consecuencia de la aplicación de un esfuerzo:

- Deformación en tensión
- Curvatura o flexión, torsión, compresión y corte.

Para un sólido elástico ideal, la tensión es directamente proporcional a la deformación:

$$\frac{F}{A} = E \left( \frac{L_s - L_o}{L_o} \right)$$

La anterior ecuación, llamada **Ley de Hooke**, se estudiará más adelante (Billmeyer EW, 1984; Sherman P, 1970).

- **En líquidos:**

Los líquidos no pueden ser deformados, en sentido estricto. Sin embargo, sí pueden moverse unas capas sobre otras en la misma dirección, a distintas velocidades. Así, se mantiene un gradiente de velocidad ( $dV/dL$ ) por un tiempo indefinido. A esto se conoce como *velocidad de deformación*:

$$\gamma = \frac{dV_x}{dY} = \frac{d\gamma}{dt}$$

### **VIII.3. COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE LOS MATERIALES**

#### **VIII.3.a. SÓLIDOS ELÁSTICOS**

La elasticidad es una propiedad mecánica de los sólidos que obedece a la Ley de Hooke –antes indicada-, según la cual el esfuerzo es directamente proporcional a la deformación. Decimos que un cuerpo tiene un comportamiento elástico cuando se deforma bajo la acción de

fuerzas externas y recupera su forma cuando éstas cesan.

$$\frac{F}{A} = E \left( \frac{L_s - L_o}{L_o} \right)$$

La deformación o elongación ( $\gamma$ ) está representada en la ecuación como la diferencia de longitudes con respecto a la longitud original del mismo valor que cuando cesa la tensión. De forma simplificada se podría escribir:

$$\sigma = E \cdot \gamma$$

La constante de proporcionalidad ( $E$ ) se define como *módulo de Young* o módulo de elasticidad. Es una medida de la rigidez, dureza o resistencia a la elongación. Existe también un módulo de corte o rigidez y un módulo de compresión o volumen.

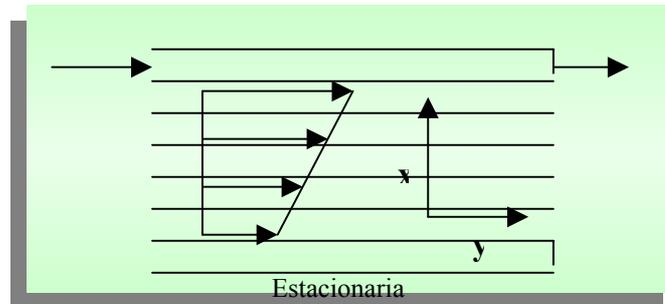
Dado que la deformación carece de dimensiones, el módulo de Young tiene las mismas dimensiones que la tensión.

### **VIII.3.b. LÍQUIDOS VISCOSOS**

#### **□ FLUIDOS NEWTONIANOS**

Los líquidos se caracterizan por presentar un comportamiento **viscoso** ya que, cuando aplicamos una fuerza externa, se deforman y dicha deformación continúa mientras la fuerza sigue presente sin que haya recuperación total.

Las tensiones de compresión son las únicas que pueden soportar los líquidos y de las cuales pueden recuperarse. Todas las otras tensiones producen una deformación infinita si se aplican durante el tiempo suficiente, de manera que los módulos elástico y de deslizamiento de los líquidos son cero (Deem DE, 1988).



**Figura 18.** Flujo laminar de un líquido contenido entre dos placas paralelas.

El esquema anterior (Figura 18) representa un líquido que estuviera contenido entre dos placas paralelas grandes como dividido en una pila de capas paralelas muy delgadas.

Se aplica deslizamiento al líquido con una fuerza  $F$  mientras se mantiene estacionaria la placa inferior. Las velocidades de las capas líquidas están representadas por las flechas que apuntan en la dirección del flujo ( $Y$ ). Cada capa es empujada hacia delante por la que se mueve por encima de ella, pero es frenada por la capa que se encuentra por debajo. Así, la velocidad de las capas líquidas aumenta en la dirección  $X$ , perpendicular a la dirección del flujo  $Y$ .

Lo que distingue a un líquido de otro es la velocidad a la cual aumenta la deformación con el tiempo. Esto se denomina *velocidad de deformación* ( $\gamma$ ). Es un gradiente de velocidad, es decir, la tasa a la cual varía la velocidad  $V$  con la distancia  $X$  perpendicular a la dirección del flujo.

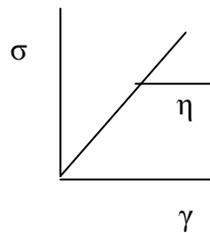
$$\gamma = \frac{d\gamma}{dt} = \frac{dV}{dx}$$

Los fluidos viscosos pueden obedecer, o no, a la **ley de Newton**. Esta ley de fluidez indica que el esfuerzo ( $\sigma$ ) es directamente proporcional a la velocidad de deformación o gradiente de velocidad. La constante de proporcionalidad se denomina viscosidad ( $\eta$ ) mientras que su recíproca se llama fluidez. La **viscosidad** es la resistencia al movimiento relativo de capas adyacentes de líquido.

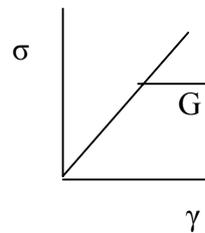
$$\sigma = \frac{F}{A} = \eta \cdot \gamma$$

### Reogramas

Líquido newtoniano



Sólido elástico



## □ COMPORTAMIENTO NO-NEWTONIANO

### INDEPENDIENTE DEL TIEMPO

Para clasificar este tipo de materiales, recurrimos a un parámetro adimensional denominado número de Deborah ( $D$ ), que es el cociente entre el tiempo de relajación del sistema ( $tr$ ) y el tiempo de experimentación ( $te$ ) (Wilkinson WL, 1960).

$$D = tr / te$$

Según este parámetro, los sistemas se ajustan a:

$D \gg 1$ : deformación elástica  $\rightarrow$  *Sólidos*

$D \ll 1$ : deformación viscosa  $\rightarrow$  *Líquidos*

$D = 0$ : respuesta *viscoelástica*

#### ▪ **Plástico ideal o de Bingham**

Cuando las suspensiones de partículas que tienden a aglomerarse o adherirse unas a otras están tan concentradas que se forman puentes continuos de partículas por todo el volumen de la suspensión, con la formación de retículos tridimensionales, adquieren límites elásticos aparentes. Esto quiere decir que estas *pastas* no fluyen a valores de esfuerzo bajo sino que sufren deformación reversible, como los sólidos elásticos; sin embargo, cuando se excede un valor característico de esfuerzo, llamado *límite elástico aparente* o *esfuerzo umbral* ( $\sigma_0$ ), fluyen como si fueran líquidos (Davis SS, 1969; Ree T, 1958).

El modelo más simple para describir este tipo de materiales es el

resultado de suponer un comportamiento elástico (*hookeniano*) a esfuerzos por debajo del esfuerzo umbral y un comportamiento newtoniano por encima de éste. Es el denominado “modelo de Bingham” o “plástico ideal”, que representa el modelo matemático más simple.



*Reograma de plástico ideal:* Se observa la disminución de viscosidad con el aumento de la velocidad de deformación.

$$\sigma = \sigma_0 + U \cdot \gamma$$

$U$ : viscosidad plástica

A los materiales plásticos también se les denomina cuerpos de Bingham o semisólidos. Pues bien, existen dos clases de materiales semisólidos con tensiones elásticas límite, los geles y las pastas; la distinción entre ellas no es neta.

Los geles o jaleas se caracterizan por un grado comparativamente alto de elasticidad. Sufren grandes deformaciones elásticas cuando se someten a esfuerzos por debajo de la tensión elástica límite, de las cuales recuperan su forma cuando se suprimen las tensiones.

El movimiento browniano construye los retículos en geles y pastas

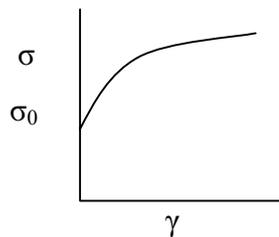
y los repara cuando se han roto por tensiones mayores que sus tensiones plásticas límite. Con frecuencia se observa tixotropía. El agregado de surfactantes u otros agentes defloculantes a las pastas o geles de arcillas a menudo disminuye o elimina el límite plástico aparente por reducción de la atracción entre partículas debilitando, así, la estructura tridimensional.

Los semisólidos con altos límites plásticos se definen como “duros”. Cuando su viscosidad plástica es alta se describen como “rígidos”.

Son ejemplos de materiales plásticos los geles, pastas, cremas, pomadas, margarina, pasta dentífrica, etc.

- **Plástico no ideal:** Casson, Herschel-Bulkley...

Existen distintos tipos de comportamientos plásticos no ideales y se han propuesto diversas ecuaciones empíricas que intentan cuantificar este estado. El modelo más sencillo que se puede utilizar es el de Herschel-Bulkley (Hunter RJ, 1989; Makosco CW, 1994).



*Reograma de un plástico no ideal.*

Este fenómeno se explica porque, normalmente, la ruptura de las fuerzas de cohesión es progresiva aunque el resultado es, en cualquier caso, una disminución de la viscosidad conforme se aumenta la velocidad de deformación.

- **Materiales pseudoplásticos**

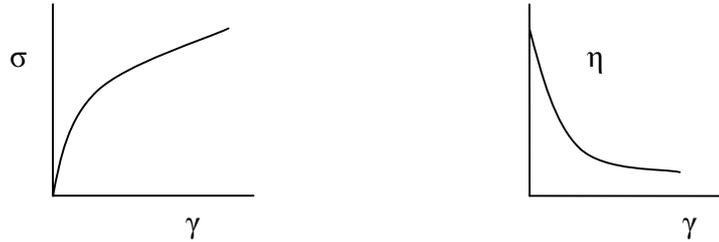
La pseudoplasticidad define al comportamiento de **fluidificación** en respuesta a la agitación; es decir, que los sistemas pseudoplásticos se hacen más fluidos cuanto más vigorosamente se los agita. Si se aplican pequeños valores de velocidad de deformación se comportan como newtonianos; sin embargo, el aumento de los mismos produce una disminución en la viscosidad sin poder señalar un valor de esfuerzo umbral.

Se trata de un comportamiento de flujo no newtoniano debido a que la viscosidad no es constante –a temperatura y presión constantes- como lo requiere la ley de Newton de flujo viscoso sino que decrece con el aumento de velocidad de deformación.

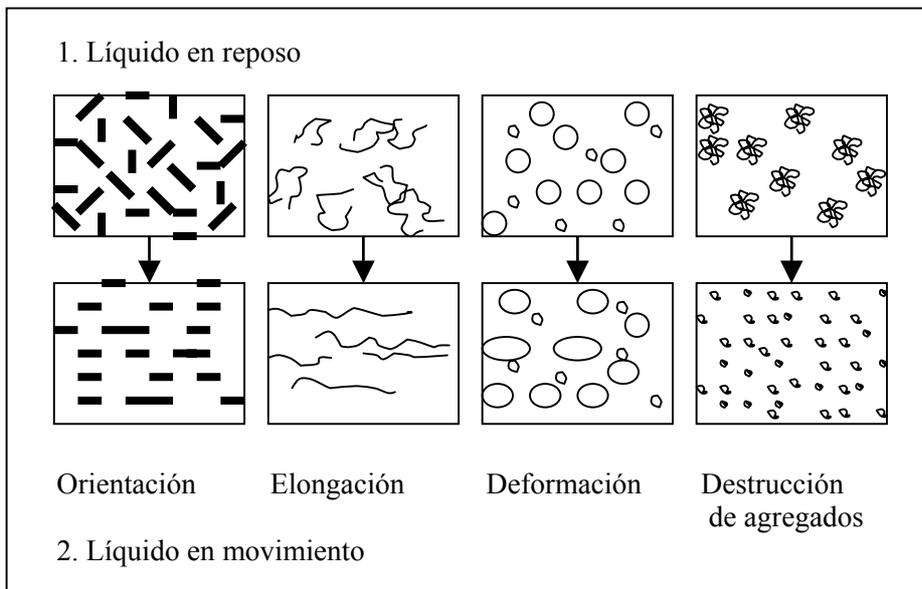
Las causas del flujo pseudoplástico son la ruptura progresiva de la estructura del medio líquido por el aumento del esfuerzo que se aplica y la reconstrucción de la estructura por movimiento browniano.

Los sistemas formados por polímeros en solución disponen estas estructuras al azar –enrolladas, enredadas,...-; al aplicar un esfuerzo éstas

tienden a desenredarse y alinearse en dirección del flujo. Por tanto, la viscosidad de la solución –su resistencia al flujo- disminuye. Presentan este comportamiento polímeros de cadena larga como la gelatina, derivados de la celulosa, etc.

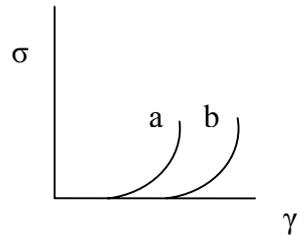


*Reogramas de flujo pseudoplástico*



**Figura 19:** Dispersiones en estado de reposo y al fluir por un tubo

El comportamiento **dilatante** es el caso extremo del viscosizante en el que, al aplicar esfuerzos elevados, tiene lugar la expulsión de la fase líquida y, por tanto, un aumento de viscosidad –tiende a infinito- (Couarraze G, 1983). Es un comportamiento poco común que suele presentarse a altas concentraciones de sólidos en suspensión y habitualmente es reversible. Se pueden citar como ejemplos las pinturas, tintas, pastas de almidón concentradas, etc.



#### □ COMPORTAMIENTO NO-NEWTONIANO DEPENDIENTE DEL TIEMPO

Los comportamientos pseudoplástico y plástico surgen por la competencia entre la disolución de las uniones de las macromoléculas o la ruptura de las uniones de Van der Waals entre partículas dispersas por el esfuerzo aplicado y el restablecimiento de distintas uniones por movimiento browniano. En estos casos, los sistemas se adaptan a los cambios de esfuerzo de forma “instantánea”.

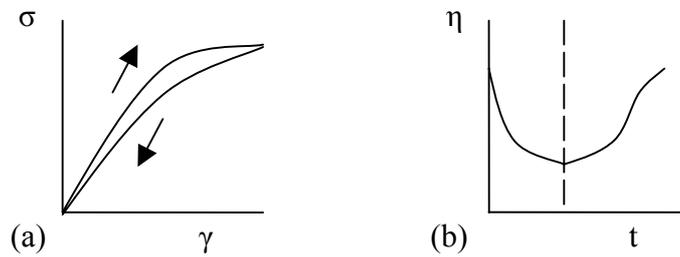
Sin embargo, hay sistemas en los que la velocidad de restablecimiento de las uniones por movimiento browniano es menor que la velocidad de ruptura por el esfuerzo; entonces, la *viscosidad aparente*

disminuye aún cuando el sistema se encuentre bajo agitación constante, ya que el tamaño de los agregados de partículas o la extensión de los enredos macromoleculares se reduce progresivamente. Además, la viscosidad aparente a un esfuerzo determinado es menor si el sistema se ha agitado recientemente a altas velocidades que si esa velocidad de deformación se ha alcanzado con bajos esfuerzos o a partir del reposo.

Por tanto, la viscosidad aparente depende no sólo de la temperatura, la presión y la velocidad de deformación o esfuerzo, sino también de su historia mecánica previa; es decir, de sus antecedentes de agitación y del tiempo que han estado sometidos al mismo. Esto se debe a que la estructura interna del sistema, que determina la viscosidad, se modifica a una velocidad que es observable en el período de tiempo de medida.

Los materiales que presentan las características anteriores se llaman tixotrópicos o que muestran **tixotropía**. Este fenómeno puede definirse como una disminución reversible, dependiente del tiempo, de la viscosidad aparente a una velocidad de deformación constante. Si este material se deja en reposo durante el tiempo suficiente –tiempo de regeneración-, después de haberlo sometido a un ciclo de agitación, el movimiento browniano reconstruye su estructura y restablece su alta consistencia original. Como regla, se puede afirmar que un material tixotrópico es una dispersión que muestra una transformación isotérmica gel/sol/gel –teniendo en cuenta que el gel es un sistema coloidal que

posee un esfuerzo umbral, mientras que un sol es un sistema coloidal que no lo posee-.



(a) Curva de fluidez: ciclo de histéresis, debido a que la carga y descarga siguen caminos distintos por el cambio gel $\leftrightarrow$ sol en la estructura.

(b) Curva viscosidad-tiempo a una velocidad de deformación constante.

La tixotropía se puede superponer al comportamiento de flujo plástico, no-newtoniano.

Las ramas “superior” e “inferior” de una curva de flujo ilustran el fenómeno de histéresis y, el área que delimitan, se llama ciclo de histéresis. Su tamaño define la magnitud del grado de ruptura tixotrópica de la estructura del sistema.

La tixotropía es particularmente útil en la formación de emulsiones y suspensiones farmacéuticas. De acuerdo con la ecuación de Stokes, las

altas viscosidades retardan la sedimentación, ya que son magnitudes inversamente proporcionales, mientras que los límites plásticos aparentes la impiden; al no haber flujo por debajo de las tensiones límite, la viscosidad aparente, con pequeños esfuerzos, se hace infinita. Cuando se desea verter parte de la suspensión o emulsión de su recipiente se agita a valores de esfuerzo muy superiores a los límites plásticos. La agitación destruye temporalmente la estructura tixotrópica y consigue reducir el límite plástico a cero disminuyendo la viscosidad aparente. Cuando se deja el frasco en reposo, la viscosidad vuelve a aumentar lentamente y el límite plástico se restablece a medida que la estructura va siendo reconstruida por el movimiento browniano.

El fenómeno contrario se conoce como **antitixotropía** o tixotropía negativa; es el aumento, dependiente del tiempo, de la viscosidad a una velocidad de deformación dada. Este comportamiento no es muy usual en suspensiones coloidales. Ocurre con más frecuencia en sistemas poliméricos cuando se someten a una velocidad de deformación elevada, de modo que se induce el entrecruzamiento entre las cadenas de polímero.

En algunos sistemas se puede producir un fenómeno relacionado con la tixotropía, llamado **reopexia**. Se trata del aumento de la viscosidad aparente o la aparición de un límite plástico aparente por agitación suave. Es decir, que la agitación moderada y rítmica puede acelerar la reconstrucción de la estructura o el restablecimiento de las

uniones entre partículas por el movimiento browniano. Así, las velocidades de deformación bajas aceleran la reaparición de viscosidades aparentes altas o el comienzo de la gelificación de los soles tixotrópicos.

En materiales cuya reestructuración depende del tiempo es importante mantener las condiciones experimentales para que los resultados sean reproducibles. El mejor método consiste en preparar la muestra sometiéndola a esfuerzos elevados durante un tiempo suficiente para que quede destruida toda la estructura. Posteriormente, se deja en reposo un tiempo fijo para que recupere de nuevo parte de su estructura antes de empezar a medir. De esta manera, se parte siempre del mismo grado de estructuración.

Como hemos visto, dentro de la categoría de fluidos viscosos se pueden distinguir varios tipos, que se nombran a continuación de forma esquemática (Figura 20).

La Figura 21 representa las curvas de fluidez de los líquidos clasificados anteriormente mientras que la Figura 22 muestra las curvas de viscosidad correspondientes a dichos materiales.

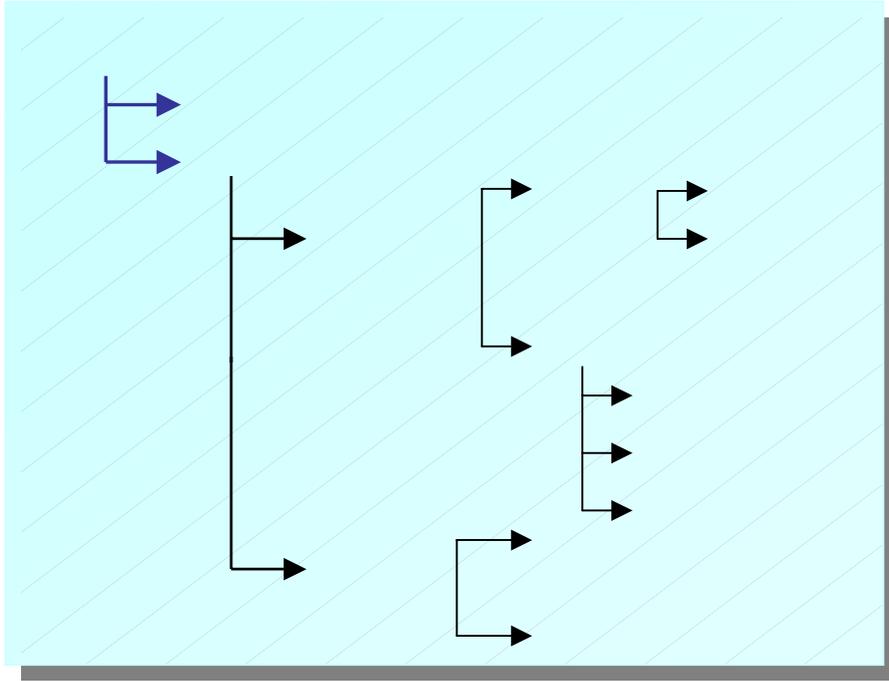


Figura 20. Clasificación de los fluidos viscosos.

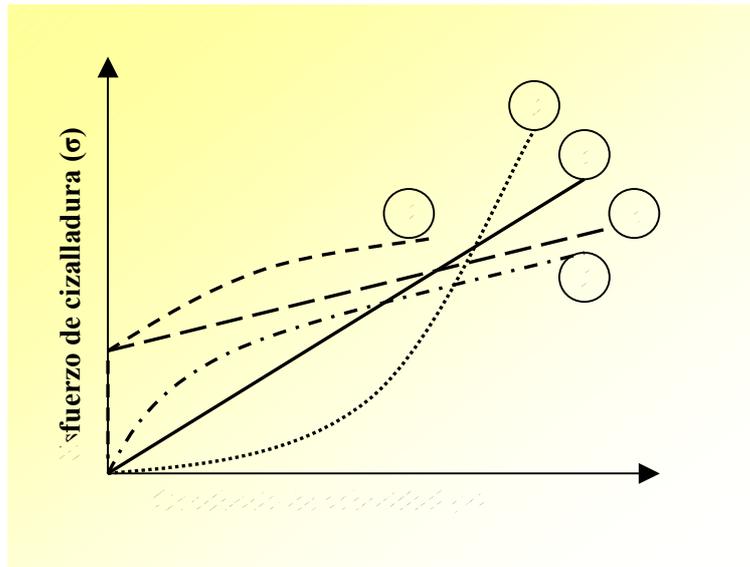
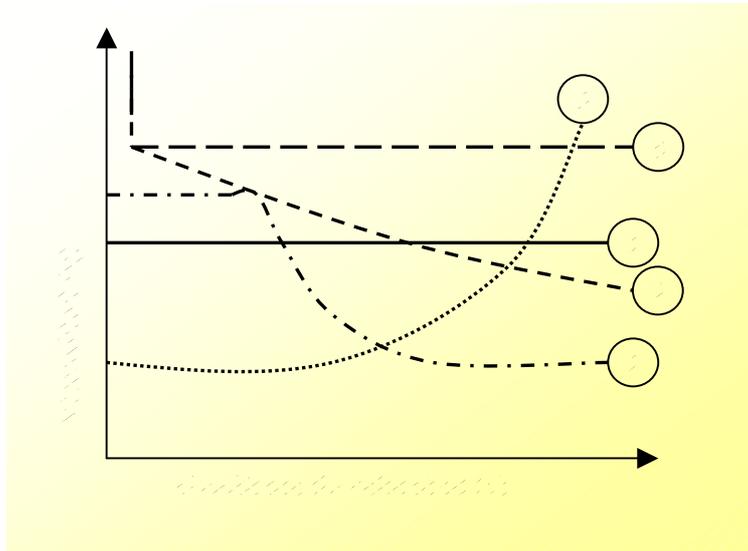


Figura 21. Curvas de fluidez de líquidos con comportamiento reológico

tipo: 1.- Líquido newtoniano, 2.- Pseudoplástico fluidificante, 3.- Pseudoplástico espesante o dilatante, 4.- Plástico no ideal, 5.- Plástico ideal.



**Figura 22.** Curvas de viscosidad de líquidos con comportamiento reológico diverso: 1.- Líquido newtoniano, 2.- Pseudoplástico fluidificante, 3.- Pseudoplástico espesante o dilatante, 4.- Plástico no ideal, 5.- Plástico ideal.

### **VIII.3.c. MATERIALES VISCOELÁSTICOS**

A finales del siglo XIX, los científicos observaron que algunos materiales dependían del tiempo en su respuesta elástica ya que, cuando se les sometía a un esfuerzo, se producía una deformación instantánea, como la esperada para un sólido elástico, seguida de una deformación continua.

Los materiales **viscoelásticos** (Ferry JD, 1980), por tanto, se caracterizan por mostrar un flujo viscoso combinado con deformación elástica cuando se los somete a un esfuerzo. Presentan esta propiedad todos los materiales poliméricos y muchos sistemas dispersos – suspensiones coloidales y emulsiones-.

Este fenómeno se puede medir por relajación del esfuerzo. Cuando un líquido polimérico se somete a una deformación, el esfuerzo se relaja de forma exponencial. Un líquido puramente viscoso sujeto a la misma deformación, se relajaría instantáneamente a cero en cuanto la deformación se hace constante. Un sólido elástico, en cambio, recupera en el acto su estado inicial al cesar el esfuerzo.

Los fluidos viscoelásticos muestran fenómenos de flujo peculiares, que los distingue de los materiales puramente viscosos. Cuando, por ejemplo, un material de este tipo se agita con una varilla el fluido asciende por la misma; sin embargo, en un líquido viscoso tendería a formarse un vórtice. Cuando un disco rota en un fluido viscoelástico, el flujo es contrario al de un fluido newtoniano. Además, puede mostrar un efecto sifón, en el cual el sifón continúa extrayendo líquido aún cuando el extremo del tubo se separa una cierta distancia por encima de la superficie libre del líquido.

Cuando un material viscoelástico se somete a un esfuerzo constante, a la deformación instantánea propia de los sólidos elásticos le sigue una deformación continua o fluencia (*creep*).

El cambio de deformación en función del tiempo a un esfuerzo constante se mide con una función conocida como *función fluencia* (*compliance*). Dicha función,  $J(t)$ , es la deformación que sufre un material al someterlo a un esfuerzo constante de amplitud unidad (Walters K, 1980).

$$J(t) = \gamma(t) / \sigma_0 \quad (\text{A } \sigma_0 \text{ constante})$$

Si sometemos el material viscoelástico a una pequeña deformación constante, el esfuerzo para mantenerla sufrirá una variación con el tiempo. Este cambio se mide con la *función de relajación*. Esta función,  $G(t)$ , se puede considerar como el esfuerzo necesario para mantener una deformación constante en el tiempo de amplitud unidad.

$$G(t) = \sigma(t) / \gamma_0$$

Las anteriores funciones permiten caracterizar completamente las propiedades viscoelásticas de un material.

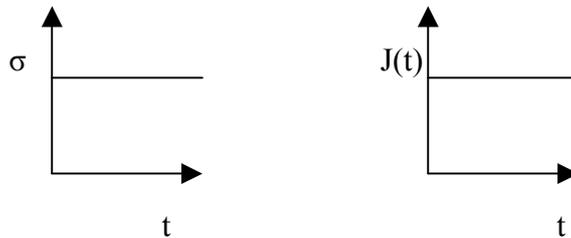
►  $J(t)$  se utiliza cuando tenemos un reómetro que permite controlar el esfuerzo aplicado, de manera que podemos mantener el esfuerzo constante y obtener experimentalmente esta función.

►  $G(t)$  se puede obtener cuando disponemos de un reómetro a deformación controlada, manteniendo la deformación constante.

### VIII.3.c.1. MODELOS VISCOELÁSTICOS LINEALES

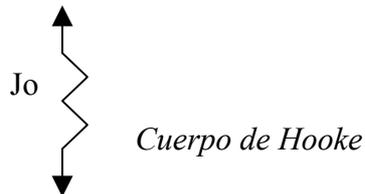
Un **sólido elástico** perfecto es un material cuyo comportamiento reológico está definido por la ley de Hooke. Por tanto, el módulo de rigidez y el de fluencia son constantes:

$$J(t) = J_0, \text{ para } t \geq 0$$



*Función fluencia (J) para un sólido elástico perfecto.*

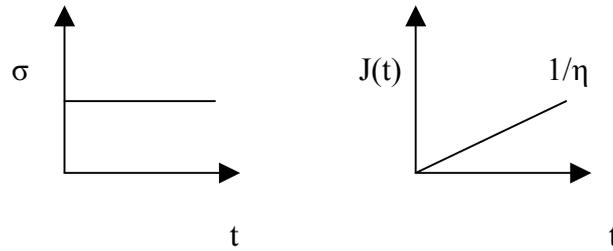
Estos materiales sufren una deformación instantánea cuando los sometemos a un esfuerzo y su recuperación también tiene lugar de forma inmediata cuando éste cesa. Su análogo modelo mecánico es un resorte helicoidal de constante  $J_0$ , conocido como cuerpo de Hooke o resorte *hookeniano*.



Un **líquido viscoso** es un material cuyo comportamiento reológico está definido por la ley de Newton:  $\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma}$ ; la función fluencia de este

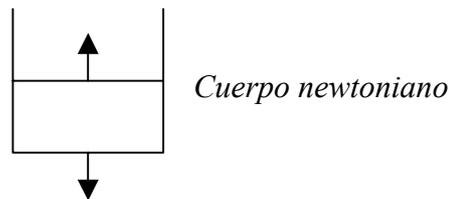
sistema se puede obtener integrando esta ecuación.

$$J(t) = [ 1 / \eta ] \cdot t$$



*Función fluencia de un líquido viscoso newtoniano*

La deformación que sufren estos sistemas crece linealmente con el tiempo y de modo irrecuperable. El cuerpo o elemento de Newton es un amortiguador. Consiste en un envase cilíndrico con un pistón y, en su interior, un líquido newtoniano que da lugar a un esfuerzo proporcional a la viscosidad del fluido.



El comportamiento de un sólido elástico perfecto y el de un líquido viscoso newtoniano constituyen dos elementos básicos para entender la viscoelasticidad lineal. Asimismo, los modelos mecánicos descritos para los dos primeros permiten establecer una analogía mecánica mediante la asociación en serie y en paralelo de muelles y amortiguadores para representar la complejidad del comportamiento viscoelástico.

Se han diseñado distintos modelos mecánicos que resultan muy útiles para entender distintos comportamientos reológicos viscoelásticos como son el modelo de Kelvin-Voigt, de Maxwell, de Kelvin-Voigt generalizado y de Maxwell generalizado.

El modelo de Kelvin-Voigt generalizado es útil para aquellos reómetros en los que es posible controlar el esfuerzo. Estos experimentos, que nos permiten calcular las curvas de fluencia obtenidas experimentalmente, se conocen con el nombre de “*creep*”. Normalmente, se acompañan de otro experimento en el que se suprime el esfuerzo midiendo, entonces, la recuperación –deformación de recuperación en función del tiempo-, llamado “*recovery*”.

### **VIII.3.c.2. MODELOS VISCOELÁSTICOS LINEALES EN RÉGIMEN OSCILATORIO**

Hasta ahora, hemos considerado el esfuerzo o la deformación constantes, es decir, en régimen estacionario. Sin embargo, también se pueden ensayar los materiales viscoelásticos en régimen ondulatorio. Esta otra forma de operar aporta más información sobre la viscoelasticidad y sobre la estructura interna de los sistemas.

Al someter un material de este tipo a un esfuerzo sinusoidal de pequeña amplitud ( $\sigma_0$ ) y a una determinada frecuencia, la deformación provocada oscila también sinusoidalmente a la misma frecuencia que el esfuerzo, pero con un desfase respecto al mismo y una amplitud  $\gamma_0$ .

Tanto el esfuerzo como la deformación dependen del tiempo y de la frecuencia angular  $\omega$ , por consiguiente, podemos considerarlas magnitudes complejas ( $\sigma^*$ ,  $\gamma^*$ ) que se expresan en forma de números complejos. La ecuación constitutiva tiene la siguiente expresión:

$$\sigma^*(t, \omega) = G^*(\omega) \cdot \gamma^*(t, \omega)$$

donde  $G^*(\omega)$  es el *módulo de rigidez complejo*, que caracteriza las propiedades viscoelásticas del material:

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$$

$G'$  es el *módulo elástico o de almacenamiento*, que representa la parte real de esta expresión, puesto que indica la potencia o energía almacenada por el sistema. Está en fase con el esfuerzo.

$G''$  es el *módulo de pérdidas o viscoso* y constituye la parte imaginaria. Representa la energía disipada debido al rozamiento viscoso. Está desfasada con respecto al esfuerzo.

*OBJETO Y PLAN  
DE TRABAJO*

El objetivo del presente estudio es el diseño, elaboración y caracterización organoléptica y reológica de nuevas formulaciones de geles para administración tópica; unos, de carácter hidrofílico y, otros, lipófilos compuestos mayoritariamente de aceite de oliva –lipogeles- formulados según un proceso original de síntesis.

Para el diseño de las preparaciones oleosas nos ha servido de pauta la investigación que sobre métodos de gelificación de aceites vegetales han llevado a cabo los autores Aiache JM, 1992 y Fukasawa J, 1989. Asimismo, éstos y otros trabajos han orientado los ensayos reológicos y de permeación transdérmica (Realdon N, 2001; Welin-Berger K, 2001) que hemos realizado a las diversas fórmulas.

Dichos geles han servido como vehículos de un principio activo – meloxicam- y un activo cosmético –acetato de vitamina E- constituyéndose en preparados con fines terapéutico y cosmetológico, respectivamente.

La elaboración de geles de meloxicam pretende su destino terapéutico por vía tópica para el tratamiento de crisis inflamatorias de osteoartritis así como el de larga duración de artritis reumatoide por tratarse de enfermedades que suelen cursar con lesiones gástricas de tipo iatrogénico. El meloxicam es un fármaco selectivo inhibidor de la COX-2 que carece de efectos colaterales a nivel gástrico y que, por tanto, incluso si lograra alcanzar la circulación sistémica al ser administrado por vía tópica, resultaría inocuo a nivel estomacal.

La introducción de nuevas formas de administración tópica de AINEs persigue la obtención de un beneficio terapéutico con menor incidencia de efectos adversos derivados de su administración oral tales como la gastrolesividad.

Diversos autores (Gupta SK, 2002) han llevado a cabo estudios de formulaciones tópicos de meloxicam, piroxicam y diclofenaco con objeto de evaluar comparativamente su capacidad analgésica y antiinflamatoria en su administración a animales en los que se indujo el fenómeno inflamatorio. Los geles de meloxicam resultaron tener la mayor potencia antiinflamatoria.

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio comparativo a diversas formulaciones de meloxicam –geles hidro y lipofílicos- para valorar, mediante ensayos en celdas de difusión de Franz su capacidad de cesión a la superficie cutánea que condiciona la posterior permeación transdérmica del fármaco, más compleja. Estos últimos ensayos –de permeación, *in vitro*- se han realizado empleando piel de oreja de conejo.

Por otra parte, para su destino cosmético, se han elaborado diversos geles –hidrogeles y fórmulas oleosas- que incluyen acetato de  $\alpha$ -tocoferol –éster de vitamina E- en una proporción de 2% (Lampen P, 2001) a los que se ha determinado la cinética de cesión del activo mediante ensayos de liberación en dispositivo de difusión sin membrana. Asimismo, se han llevado a cabo ensayos de cesión en celdas de difusión de Franz empleando una membrana artificial con objeto de identificar las formulaciones que presenten cinéticas más adecuadas y que, por tanto, no supongan un obstáculo para la permeación cutánea de la provitamina. Para completar el estudio de las fórmulas cosméticas se ha llevado a cabo el ensayo de permeación y acumulación en la piel de acetato de vitamina E.

Como paso previo al estudio de cesión de meloxicam y de acetato de vitamina E se pusieron a punto las técnicas de valoración por espectrofotometría UV así como en HPLC-UV validando los respectivos métodos analíticos. En Anexo IV, se recogen los resultados de la

validación analítica de meloxicam y, en Anexo VII, los de acetato de vitamina E y vitamina E.

Se completa la Memoria de Tesis exponiendo la bibliografía utilizada en su elaboración así como un elenco de las Comunicaciones a Congresos de ámbito nacional e internacional y de las publicaciones en diversas revistas científicas de algunos de los resultados de esta investigación.

Destacamos, por último, que su realización se ha llevado a cabo en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Granada así como en el Centro Galénico de la Universidad de Navarra y el Departamento Farmacéutico de la Universidad de Parma –*Università degli Studi di Parma*- (Italia).

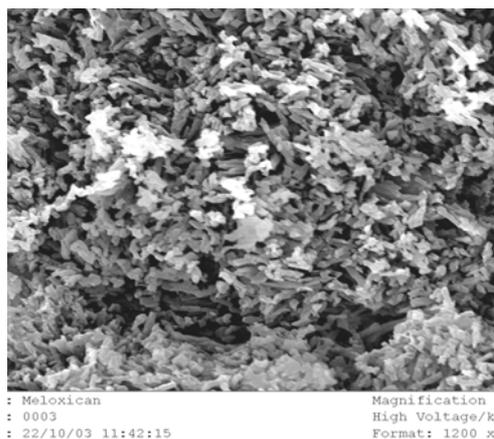
*II. PARTE*  
*EXPERIMENTAL*

## *Material y Métodos*

## **I.1. MATERIAL**

### **I.1.a. PRINCIPIOS ACTIVOS**

• **Meloxicam.** En este trabajo se ha empleado la forma de sal sódica ( $C_{14}H_{12}N_3O_4S_2Na$ , PM 373,4); suministrado por SIGMA (España). Es un polvo amarillento hidrosoluble y fotosensible (Figura 23).



**Figura 23.** Microfotografía de meloxicam (SEM)

Se llevó a cabo un análisis térmico DSC –*Differential Scanning Calorimetry*, calorimetría diferencial de barrido (Ford JL, 1989; Widmann G, 1987)- para completar la caracterización de meloxicam.

El análisis térmico se ha descrito como el empleo de un programa de temperatura controlada sobre una sustancia para evaluar la dependencia que de esta variable pueden presentar algunas de sus propiedades físicas.

El análisis térmico se utiliza en la Industria Farmacéutica tanto en el control de calidad como en el desarrollo de productos y procesos. A continuación se muestran algunas definiciones comúnmente utilizadas en este campo:

- **Polimorfismo:** Decimos que una sustancia es polimórfica cuando puede cristalizar de formas distintas, con la misma composición química. Las propiedades químicas de las distintas formas cristalinas serán idénticas, pero no sus propiedades físicas, tales como la solubilidad o la temperatura de fusión. La solubilidad de un principio activo, en el organismo, es un factor de gran interés para conseguir los efectos terapéuticos deseados.
- **Eutéctico:** De etimología griega; su significado es “funde fácilmente”. Una mezcla forma un eutéctico cuando su temperatura de fusión es inferior a la temperatura de fusión de cualquiera de los dos productos por separado. Muestran este comportamiento las mezclas de productos miscibles en estado líquido.
- **Pureza:** La pureza química de un producto se puede determinar a partir de una curva DSC, aplicando la ecuación de Van't Hoff. La fusión de una mezcla, con la composición justa del eutéctico, se comporta como una sustancia pura.
- **Compatibilidad de productos:** El principio activo puede presentarse mezclado con cantidades considerables de un excipiente. Para que la formulación sea estable, este excipiente debe ser un compuesto que no reaccione con el principio activo. Primero,

se debe obtener la curva de cada uno de los productos por separado, y luego se hace un barrido con una mezcla al 50%.

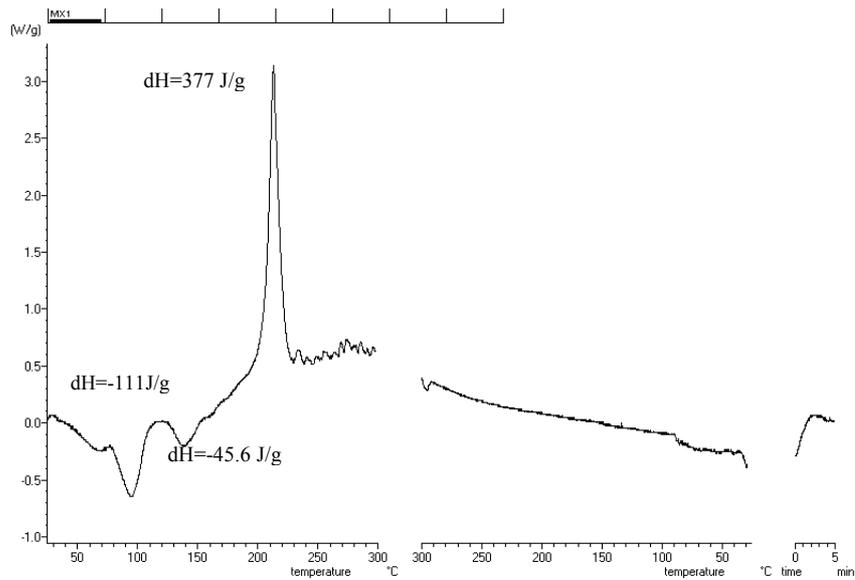
Son síntomas de incompatibilidad la aparición de:

- Picos exotérmicos por debajo de 150°C (posible reacción entre ambos).
- Picos endotérmicos distintos de los correspondientes a los productos (posible aparición de un nuevo producto).

Se puede obtener más información comparando una mezcla recién preparada con una mezcla artificialmente envejecida, por ejemplo, una semana a 80°C con una humedad elevada.

En el ensayo calorimétrico –Mettler Instruments AG, Suiza- se pesaron 5,00 mg de fármaco puro en una cápsula de aluminio. Se establecieron tres etapas: la primera, de calentamiento desde 25° hasta 300°C a una velocidad de 5°C/min; la segunda etapa, de enfriamiento desde 300° hasta 25°C a la velocidad citada; y, una tercera, isotérmica de mantenimiento de la temperatura ambiente –0°C/min-. Se hicieron dos réplicas. Uno de los diagramas se muestra en la Figura 24.

El calentamiento de meloxicam -primera rampa de temperatura de la curva DSC- produjo dos picos endotérmicos: a 92°C (dH=-111 J/g) y a 138°C (dH=-45.6 J/g); y uno, exotérmico, a 210°C (dH=377 J/g). La segunda escala de temperatura –enfriamiento desde 300°C hasta temperatura ambiente de 25°C- no ha registrado ningún pico, por lo que se interpreta que no dio lugar a variaciones bruscas de temperatura en el analito. Tampoco se observan picos en la tercera etapa isotérmica.



**Figura 24.** Curva DSC de meloxicam (5,00 mg). Tratamiento térmico: 25°-300°C, 5°C/min; 300°-25°C, 5°C/min; 25°C, 0°C/min.

- **Acetato de vitamina E (AcVE)**, (Acetato de  $\alpha$ -dl-tocoferol), Lote 042. Suministrado por Guinama. Valencia (España) y por Sigma-Aldrich Chemical, St Louis MO, USA.

- **Vitamina E (VE)** ( $\alpha$ -Tocoferol), aprox. 95% HPLC. Sigma Chemical, St Louis MO, USA. Empleado en el estudio realizado en la Universidad de Parma, Italia.

### **I.1.b. COMPOSICIÓN DE LOS LIPOGELES**

La elaboración de los lipogeles que servirán como vehículos de los activos estudiados en este trabajo ha requerido el empleo de los siguientes productos:

- **Aceite de oliva.** Se ha empleado aceite de oliva virgen extra (cfr. Capítulo II.1), *Ph Eur* (8001-25-0) 75343; índice de acidez 1,1; contenido en agua <0,1%, Lote 422297/1 30701 suministrado por Fluka Chemica, Steinheim (Suiza).

- **Agentes tensioactivos**

1. Olivem

Se han desarrollado recientemente nuevos derivados cosméticos a partir del aceite de oliva (Amari S, 1996 y 1998). Estos productos se han obtenido por un proceso tecnológico que permite la conservación de las propiedades originales del aceite. Entre ellos cabe destacar compuestos con carácter espumante, emoliente y antirradical libre además de otros productos como escualeno o insaponificable del aceite de oliva. Han sido suministrados por Quimibios, SL (España).

- a) PEG-4 olivate (*Olivem 700*)

Es un emulgente O/A no iónico que se caracteriza por dar lugar a cremas muy estables sin el empleo de otros emulgentes. Esta capacidad de estabilizar las emulsiones se debe a la formación de una estructura denominada cristal líquido a diferencia de los sistemas constituidos por micelas esféricas (Rigano L, 1999).

Este producto origina un sistema reticular que reemplaza el empleo de ceras o factores reológicos como alcohol cetílico, estearato de glicerilo, ácido esteárico, etc., por lo que está en sintonía con la concepción moderna de emulsión, la cual debe ser ligera y fácil de extender. Además, el empleo de PEG-4 olivate, a una concentración del 8-10%, previene la oxidación de lípidos, estabiliza las emulsiones y tiene un destacable poder hidratante al reducir la pérdida de agua transepidérmica.

Cualquier tipo de fase grasa puede ser formulado con independencia de la polaridad de dichos componentes por la capacidad estabilizante que aporta el PEG-4 olivate. Los mejores resultados se obtienen con un 10% de emulsionantes y lípidos medianamente polares (jojoba, etc.) o apolares (parafina). Este emulgente es biodegradable y no tóxico.

b) PEG-7 olive oil (*Olivem 300*)

El *PEG-7 olive oil* es un emoliente y coemulgente O/A. Es soluble en agua y aceites. Tiene un gran poder emoliente disminuyendo la irritación causada por tensioactivos. No altera la viscosidad de las emulsiones en las que se emplea y no altera la capacidad formadora de espuma por lo que puede ser incluido en champúes y espumas de baño. Es biodegradable y no irritante.

c) Sorbitan olivate (*Olivem 900*)

Es un emulgente A/O no iónico (Rigano L, 1999). Con su empleo se obtienen cremas de fase externa oleosa que no son ni grasas ni pegajosas. Con una concentración de *sorbitan olivate* del 5-10% y una fase grasa de baja o media polaridad (hidrocarburos, éteres o ésteres) se obtiene un producto estable. La naturaleza de los lípidos empleados deja de ser un elemento crítico pues la polaridad e hidrofilia de tales componentes no modifica la estructura reticular formada. La viscosidad puede ser aumentada con estearato de magnesio y aluminio o sulfato magnésico heptahidratado. Tecnológicamente se puede emulsionar a 40°C y sin necesidad de una agitación energética. Es un producto biodegradable y no tóxico.

2. Span 80

Suministrado por Guinama, Valencia (España). Es un éster monooleato del sorbitán (Society of Great Britain, 1983). Estos ésteres se preparan deshidratando sorbitol para formar hexitán que, después, se esterifica con el ácido graso deseado. El derivado monooleato es un líquido ámbar; viscosidad de 1000 cPs; HLB 4,3. Es soluble en la mayoría de los aceites minerales o vegetales; ligeramente soluble en éter, dispersable en agua; insoluble en acetona.

Los ésteres del sorbitán se toleran bien por vía oral con riesgo de toxicidad mínimo. Están prácticamente exentos de poder irritante en su administración tópica. Son tensioactivos no iónicos usados como:

- Agentes emulsionantes en la preparación de:
  - a) Emulsiones de agua en aceite
  - b) Combinados con otros emulgentes hidrofílicos para emulsiones O/A
    - Agentes solubilizantes: para principios activos poco solubles en medio oleoso.
    - Agentes humectantes: para principios activos insolubles en medio oleoso.

- **Etilcelulosa.** Suministrada por ICN (España); (9004-57-3); contenido en etoxilos del 48-49,5% y viscosidad en tolueno o alcohol (solución al 5%) de 0,045 N·s/m<sup>2</sup>. Los polímeros de éteres de celulosa tienen una amplia variedad de aplicaciones que abarcan desde productos termoplásticos solubles en medios orgánicos hasta aditivos alimenticios solubles en agua (Rekhi G, 1995). Aunque en la Industria Farmacéutica se emplean todo tipo de polímeros, los más usados son los de celulosa.

La etilcelulosa es soluble en una gran variedad de disolventes: ésteres, hidrocarburos aromáticos, alcoholes, cetonas y disolventes clorados (1-6). Es insoluble en agua, glicerina y propilenglicol (Burrell H, 1975, Greminger GK, 1978). Es la más estable de los derivados de la celulosa. Es resistente a álcalis, tanto diluidos como concentrados, pero sensible a los ácidos. No toma apenas agua del ambiente ni durante inmersión y, además, se evapora rápidamente liberando intacta a la

etilcelulosa. No se altera por acción de la luz ultravioleta ni la visible; tampoco por las altas temperaturas.

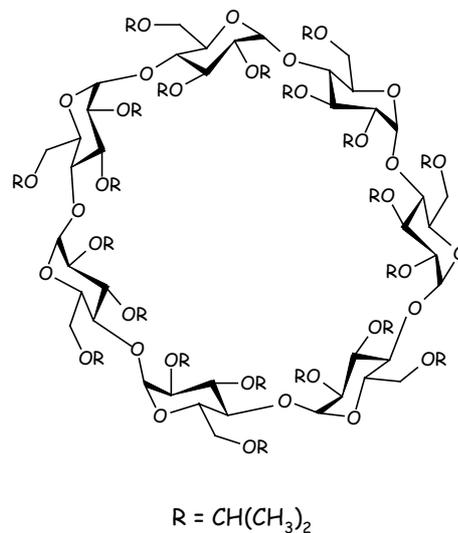
### **I.1.c. COMPOSICIÓN DE LOS HIDROGELES**

La elaboración de los hidrogeles requiere los siguientes productos:

- **Agua purificada**, Pharmacopaea Europea.
- **Carbopol® ETD 2001**. Lote EC8N1EC007. Suministrado por BF Goodrich, Bruselas (Bélgica).
- **Natrosol HHBR (Hidroxietilcelulosa)**, Eigenmann & Veronelli, Milán (Italia).
- **Polietilenglicol 400 (PEG 400)** (Qiu HC, 1998); Riqueza 100%. Lote 3821297. Suministrado por Roig Farma, S.A. Terrasa (España).
- **Polietilenglicol 1500 (PEG 1500)** (Iza M, 1998); pH (5%)=6,2. Lote 2000997. Roig Farma, S.A. Terrasa (España).
- **2-Propanol**, Carlo Erba, Italia.
- **Propilenglicol**, Carlo Erba, Italia.
- **Propilenglicol**, USP; Riqueza>99,5%, Densidad 1,038. Lote 1770696. Roig Farma, S.A. Terrasa (España).
- **Trietanolamina (TEA)**, 85%, 181110. Lote 8290. Suministrado por Probus S.A. Badalona (Barcelona, España).
- **Tween 80** –Polysorbate 80, monooleato de polioxietilen 20 sorbitan (Society of Great Britain, 1986)-. Guinama. Valencia (España).

### **I.1.d. OTROS PRODUCTOS EMPLEADOS**

• **Dimetil-β-ciclodextrina (DM-β-CD)**, ha sido donada por Wacker-Chemie (Milán, Italia). Se ha introducido la ciclodextrina a una concentración del 5% en la solución tampón usada como medio receptor en el estudio de permeación de las formulaciones cosméticas para incrementar la solubilidad en agua del antioxidante lipofílico  $\alpha$ -tocoferol y acetato de  $\alpha$ -tocoferol- (Huang D, 2002). Se utilizan generalmente en el ámbito farmacéutico derivados de las ciclodextrinas puesto que presentan mayor solubilidad en agua, menor toxicidad y menor degradación enzimática respecto a la ciclodextrina original. Estas moléculas forman complejos de inclusión con la particularidad de presentar una cavidad interna hidrofóbica y una superficie externa hidrofílica (Figura 25).



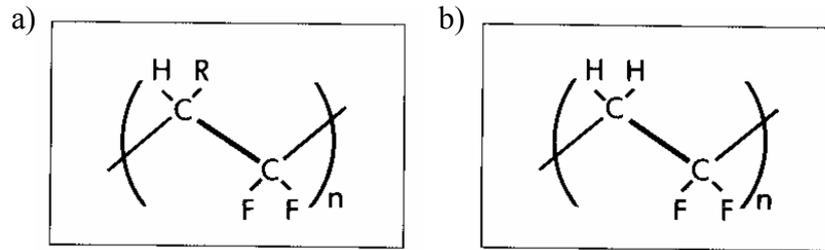
**Figura 25.** Estructura química de la dimetil-β-ciclodextrina.

- **Membranas artificiales.**

- Suministradas por Millipore<sup>®</sup>: Las membranas de microfiltración Millipore<sup>®</sup> se utilizan en procesos de clarificación y esterilización en la industria aunque también en el laboratorio con los mismos fines preparativos y en aplicaciones analíticas, como la recogida e identificación de partículas y microorganismos.

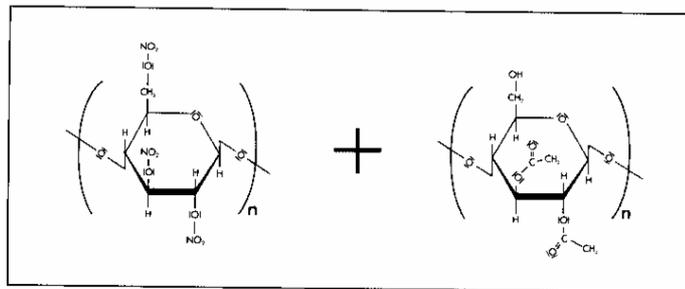
En este trabajo se han utilizado filtros de membrana constituidos por una lámina uniforme, rígida y continua de material polimérico poroso con un grado de porosidad y tamaño de poro definidos. Entre otras ventajas estas membranas presentan la de retener el medio para que no migre contaminando el fluido filtrado. Esta característica nos resulta de interés ya que dichas membranas se han empleado en estudios de cesión de moléculas activas a partir de un vehículo inerte que debe quedar retenido para no contaminar el medio receptor.

En la gama de filtros-pantalla Millipore<sup>®</sup> se encuentran los filtros de membrana *MF* y *Durapore*, empleados en el estudio de selección de membrana previo al de cesión: MF (éster de celulosa), HAWP 04700 y Durapore PVDF hidrófilo, HVLP 04700; ambas con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .



**Figura 26.** Composición química de la membrana Durapore hidrófila (a) e hidrófoba (b).

El ensayo de cesión de meloxicam desde las distintas fórmulas se llevó a cabo empleando una membrana de tipo MF-Millipore compuesta por ésteres mezclados de celulosa ya que en el estudio de selección de membrana dio lugar al mejor perfil de liberación.



**Figura 27.** Composición química de una membrana MF de ésteres mezclados de celulosa.

- Discos de membrana *Spectra/Por* Biotech CE, 133018, con un diámetro de 47 mm y 1000 Daltons (MWCO). La membrana asimétrica CE está elaborada con papel de silicona. La parte superior de la membrana debe ponerse en contacto con la solución de muestra; la superficie inferior, en contacto con una lámina que se debe extraer antes

de iniciar el ensayo, con poros de menor tamaño, debe ponerse en contacto con la solución receptora del fármaco.

Este tipo de membrana se ha ensayado en celdas de Franz con la intención de obtener una orientación sobre la capacidad de permeación del fármaco ya que, según la bibliografía consultada (Parsaee S, 2002) y debido al diverso tamaño de poro y naturaleza hidro-lipídica que presenta la membrana, se asemejaría al comportamiento de la piel.

- **Membranas animales:**

- En el estudio de permeación en celdas de Franz se ha empleado piel de la zona interna de *oreja de conejo* (Artusi M, 2004; Sebastiani P, 2005). El material fue cedido por un criadero al Departamento Farmacéutico de la Facultad de Farmacia de Parma (Italia).

La extracción de la piel –dermoepidérmica- se llevó a cabo manualmente con ayuda de un bisturí procurando separar la dermis del tejido subcutáneo con cuidado de no perforarla (Anexo I.1.). Una vez obtenidos los trozos de piel se dejan en remojo en solución salina con el fin de mantenerla hidratada y de limpiar las impurezas propias del tejido antes de su uso. En el estudio de permeación de las formulaciones cosméticas en celdas de difusión de Franz (Anexo I.2.) se empleó piel fresca recién extraída. En cambio, para el estudio de las formulaciones de meloxicam se utilizó piel previamente congelada. En todos los casos, se mantuvo la piel en solución salina media hora antes de su uso.

- Se ha trabajado también con piel de *cerdo* (García de Jalón E, 2001) –zona dorsal- suministrada por la Unidad de Cirugía Experimental del Edificio Licinio de la Fuente del S.A.S. en Granada. El proceso de dermatomización de la piel se detalla en Anexo I.1. No se recogen en esta memoria de tesis ensayos de permeación realizados con esta membrana ya que dicho estudio se llevó a cabo en la Universidad de Parma donde, según el protocolo habitual, se emplea piel de oreja de conejo.

- Los demás productos necesarios para la elaboración de las soluciones tampón y los disolventes empleados como fase móvil en el análisis de HPLC-UV han sido de calidad analítica .

## **I.2 MÉTODOS**

### **I.2.a. ELABORACIÓN DE LOS VEHÍCULOS OLEOSOS**

La síntesis se ha llevado a cabo introduciendo algunas modificaciones con respecto a la bibliografía revisada sobre métodos de gelificación de aceites vegetales (Realdon N, 1996), con objeto de adaptarlos a nuestras necesidades.

Las variables de las distintas formulaciones son:

- Concentración del agente gelificante, etilcelulosa –3 y 5%-.
- Empleo de diversos derivados del aceite de oliva con capacidad tensioactiva –Olivem- y del tradicional Span 80.

En la Tabla 3 se detalla la composición de las formulaciones.

	<b>Etil- celulosa</b>	<b>Span 80</b>	<b>Olivem 900</b>	<b>Olivem 700</b>	<b>Olivem 300</b>	<b>Aceite de oliva</b>
<b>A1</b>	3%	–	–	–	–	csp 100%
<b>A2</b>	5%	–	–	–	–	csp 100%
<b>B1</b>	3%	5%	–	–	–	csp 100%
<b>B2</b>	5%	5%	–	–	–	csp 100%
<b>C1</b>	3%	–	5%	–	–	csp 100%
<b>C2</b>	5%	–	5%	–	–	csp 100%
<b>D1</b>	3%	–	–	5%	–	csp 100%
<b>D2</b>	5%	–	–	5%	–	csp 100%
<b>E1</b>	3%	–	–	–	5%	csp 100%
<b>E2</b>	5%	–	–	–	5%	csp 100%

**Tabla 3.** Composición de los vehículos oleosos

El proceso de gelificación de los lipogeles se describe a continuación. El agente tensioactivo y la etilcelulosa se adicionan a la fase oleosa calentada a 150°C con agitación constante. Conseguida la homogeneidad de la mezcla se interrumpe el calentamiento pero se mantiene la agitación hasta alcanzar la temperatura ambiente. Transcurridas 48h de reposo se consolida la estructura reticular interna definitiva de los lipogeles. Conviene realizar una leve agitación manual para verificar la homogeneidad de la fórmula. Puede suceder, como inconveniente tecnológico, la aparición de un cierto exudado de aceite no interpuesto en el seno del gel o, también, gránulos que denotarían la

fusión incompleta de la etilcelulosa. La principal dificultad de la elaboración de estos geles es la fusión de la celulosa en la fase oleosa y posterior estabilidad en el seno del mismo. Este material funde a una temperatura elevada (120°C) y parece disolverse en el aceite contribuyendo al incremento de viscosidad de la preparación.

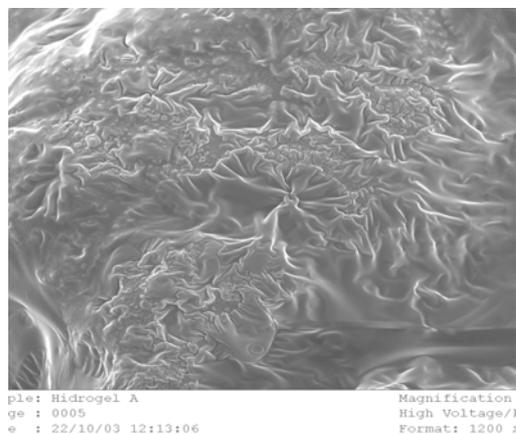
### **I.2.b. ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE MELOXICAM**

En este trabajo se ha estudiado la capacidad de cesión y permeación de meloxicam, fármaco de acción antiinflamatoria (Del Río RM, 2000; Gupta SK, 2002; Luger P, 1996) a partir de diversos geles –hidrofílicos, de Carbopol® (Boylan JC, 1988; Pena L, 1990) y lipogeles (Aiache JM, 1992; Fukasawa J, 1989) elaborados a base de aceite de oliva-. La Tabla 4 muestra la composición de las fórmulas seleccionadas para el presente estudio.

	<b>Lipogel 1</b>	<b>Lipogel 2</b>	<b>H drogel de Carbopol®</b>
<b>Etilcelulosa</b>	3%	3%	-
<b>Olivem 700</b>	5%	-	-
<b>Olivem 900</b>	-	5%	-
<b>Aceite de oliva</b>	csp 100%	csp 100%	-
<b>Carbopol® ETD 2001</b>	-	-	1%
<b>Propilenglicol</b>	-	-	10%
<b>Trietanolamina 85%</b>	-	-	csp pH 7
<b>Agua destilada</b>	-	-	csp 100%
<b>Meloxicam</b>	0,3%	0,3%	0,3%

**Tabla 4.** Composición de las formulaciones de meloxicam (0,3%).

Tanto en la elaboración de las fórmulas oleosas como en el hidrogel (Figura 28), el fármaco se agregó al vehículo ya elaborado, a temperatura ambiente.



**Figura 28.** Microfotografía del hidrogel de Meloxicam (200 x).

### **I.2.c. ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE ACETATO DE VITAMINA E (AcVE)**

Es bien conocida la importancia e interés que suscita la inclusión de vitaminas en formulaciones cosméticas. Suele resultar de interés que las formulaciones de administración tópica sean capaces de ceder con facilidad el activo requiriendo, por tanto, poco tiempo de contacto con la piel hasta alcanzar el estrato córneo.

Nuestro objetivo ha sido diseñar una serie de formulaciones que contengan vitamina E (2%) pero difieran cuali y/o cuantitativamente en algunos de sus componentes y/o en el proceso de elaboración con la intención de estudiar su capacidad de cesión y posterior permeación del activo cosmético.

Por razones de estabilidad físico-química la forma comúnmente usada del  $\alpha$ -tocoferol es el profármaco esterificado (Rangarajan M, 1999), en este caso concreto, acetato de  $\alpha$ -tocoferol (AcVE).

### FORMULACIONES OLEOSAS DE VITAMINA E

Las fórmulas oleosas (Tabla 5) se han elaborado según el método de gelificación descrito anteriormente.

	<b>Etilcelulosa</b>	<b>Olivem 700</b>	<b>Olivem 900</b>	<b>AcVE</b>	<b>Aceite de oliva</b>
<b>Lipogel 1</b>	3%	5%	-	2%	csp 100%
<b>Lipogel 2</b>	3%	-	5%	2%	csp 100%

**Tabla 5.** Composición de los lipogeles de AcVE (2%).

El AcVE, termolábil, se ha incorporado al lipogel previamente elaborado, a temperatura ambiente.

El derivado del aceite de oliva Olivem 700 –PEG 4 olivate- es un emulgente O/A no iónico capaz de estabilizar emulsiones por la formación de una estructura denominada cristal líquido, a diferencia de

los sistemas constituidos por micelas esféricas (Rigano L, 1999). El empleo de Olivem 700 previene la oxidación de lípidos, estabiliza las emulsiones y tiene un destacable poder hidratante al reducir la pérdida de agua transepidérmica. En este trabajo se emplea a una concentración del 5%.

Olivem 900 –Sorbitan olivate-, por otra parte, es un emulgente A/O no iónico (Rigano L, 1999). Empleado a una concentración del 5-10% y una fase grasa de baja o media polaridad da lugar a un producto estable. Es un producto biodegradable y no tóxico, al igual que Olivem 700 y, asimismo, se ha empleado al 5%.

Los lipogeles, a concentraciones más elevadas de vitamina E –20%- (Kuriyama K, 2002) serían también susceptibles de empleo en la supresión de alergias y dermatitis de contacto irritativas por estabilización de los queratinocitos de forma concomitante a otras nuevas e interesantes propiedades.

#### HIDROGELES DE VITAMINA E

Los hidrogeles (Tabla 6), en cambio, se han elaborado según un único método. Se ha procedido a la mezcla de vitamina E (2%) con el agente tensioactivo correspondiente – Olivem 700, Tween 80 ó PEG-. A continuación se ha adicionado dicha mezcla a una cantidad suficiente de gel de carbopol previamente elaborado.

	<b>Olivem 700</b>	<b>Tween 80</b>	<b>PEG (1500:400)</b>	<b>AcVE*</b>	<b>Gel (carbopol**)</b>
<b>Hidrogel 1</b>	1%	-	-	2%	csp100%
<b>Hidrogel 2</b>	3%	-	-	2%	csp100%
<b>Hidrogel 3</b>	-	2%	-	2%	csp100%
<b>Hidrogel 4</b>	-	4%	-	2%	csp100%
<b>Hidrogel 5</b>	-	-	3%	2%	csp100%
<b>Hidrogel 6</b>	-	-	5%	2%	csp100%

\* La vitamina E, mezclada con el tensioactivo, se incorpora al gel de carbopol previamente elaborado

\*\* Gel de carbopol elaborado con Carbopol ETD 2001<sup>®</sup>

**Tabla 6.** Composición de los hidrogeles de AcVE (2%)

El derivado oleoso Olivem 700, anteriormente descrito, se ha empleado a concentraciones de 1 y 3% para la elaboración de los hidrogeles 1 y 2.

El tensioactivo Tween 80 forma emulsiones a concentraciones 1-15%, es solubilizante de activos poco solubles en bases lipofílicas (1-10%) y humectante de activos insolubles en bases lipofílicas (0,1-3%). Es bien tolerado, prácticamente no irritante y de muy baja toxicidad. En este trabajo se ha empleado al 2 y 4% para la elaboración de las Fórmulas 3 y 4, respectivamente –Tabla 6-.

Los polímeros no-iónicos –PEG- son muy inertes, lo cual resulta beneficioso para la vitamina E ya que se adhiere al entramado sin alterarla y, además, son compatibles con la piel. El empleo de dichos

polímeros es, por tanto, idóneo para el presente estudio de formulaciones de aplicación tópica (Schick MJ, 1967).

La mezcla de polímeros es una estrategia que persigue un “efecto sinérgico” desde un punto de vista reológico. Así, la consistencia de un gel binario resulta mayor que la suma de la consistencia de los geles individuales. En este trabajo se han empleado proporciones bajas de dicha mezcla a partes iguales–PEG 1500: 400, al 3 y 5%; Fórmulas 5 y 6- por lo que apenas se aprecia una variación en la consistencia del gel de carbopol, componente mayoritario.

Para el estudio de permeación de AcVE, además de las fórmulas seleccionadas de entre las anteriores –lipo e hidrofílicas- por su mejor perfil cinético de liberación, se elaboró un gel hidrofílico –Hidrogel 7- de diversa composición (Marconi B, 1999). Para ello se disolvió la provitamina en una mezcla de 40 ml de 2-propanol y 20 ml de propilenglicol. A continuación se añadió 1 g de hidroxietilcelulosa (Natrosol HHBR) previamente hidratada en 40 ml de agua destilada. El pH final del gel fue 7.0 (Jain AK, 2004).

#### **I.2.d. CARACTERIZACIÓN ORGANOLÉPTICA DE LAS PREPARACIONES**

El objetivo de esta investigación ha sido estudiar la posibilidad de seleccionar un gel que presente características organolépticas y reológicas idóneas para su administración tópica (Welin-Berger K, 2001) –es decir, con extensibilidad y textura adecuadas- que, además, permita la máxima

velocidad de liberación del principio activo con objeto de no constituir un factor limitativo de la posterior absorción transdérmica. Por tanto, además de optimizar el vehículo de aplicación tópica de forma que se maximice la biodisponibilidad del fármaco, es también importante asegurarse de que la preparación sea estéticamente aceptable para el paciente, fácil de usar y que se adhiera al área deseada el tiempo oportuno.

Así pues, se han llevado a cabo estudios preliminares de las formulaciones (Ruiz MA, 2003) con objeto de valorar su calidad cosmética.

Las características organolépticas de las preparaciones varían dependiendo de su composición. Los parámetros analizados fueron color, olor, textura y consistencia. El gusto no se ha determinado ya que las fórmulas están diseñadas para un uso tópico.

Nos ha resultado interesante, también, evaluar su extensibilidad o capacidad filmógena sobre la piel ya que, al verificarse la ausencia de discontinuidades o formación de orificios al ser extendidas, queda asegurado el contacto del fármaco o bien el activo cosmético con toda la superficie cutánea expuesta. Con este objetivo se han llevado a cabo en los laboratorios Domca, S.A. (Granada) extensiones de las preparaciones con diverso espesor –200-300  $\mu\text{m}$ - sobre placas de vidrio para observar su capacidad de formar láminas continuas y adhesivas.

Las fotografías que se muestran en Anexo II indican el sencillo procedimiento de manejo del extensiómetro. Dicho dispositivo consta de lados que podríamos definir como asimétricos; es decir, que cada pared lateral permite ceder el producto bajo una determinada altura –200, 300, 400, 500  $\mu\text{m}$ - permitiendo la extensión de una capa de gel de espesor uniforme.

### **I.2.e. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LOS LIPOGELES**

El análisis reológico (De Vicente J, 2001) se llevó a cabo a diversas temperaturas –ambiente, 25°C y fisiológica, 32°C-, en un reómetro de esfuerzo controlado (Bohlin CS-10, UK) con una geometría de medida de tipo cono/plato CP 4/40 (con un diámetro de cono de 40 mm y un ángulo de 4°). Esta configuración se ha elegido debido a la elevada consistencia que presentan algunas muestras.

Las muestras han sido sometidas a ciertas pre-condiciones que les confieran una historia mecánica previa semejante antes de cada ensayo reológico. De esta forma se asegura la ruptura de la estructura interna del sistema que se logra mediante la aplicación de un esfuerzo igual o superior al valor de esfuerzo umbral de cada muestra, seguida de un tiempo de reposo de igual duración en todos los casos en el que comience la reestructuración de los geles. Por tratarse de preparaciones de consistencia variable, dicho esfuerzo ha oscilado entre 50 Pa para fórmulas de las series A, B y otras, y 150 Pa para los geles más rígidos,

“*solid-like*”, –lipogeles serie C e hidrogel de carbopol-. El tiempo de aplicación del esfuerzo se ha fijado en 60 segundos en todos los casos seguidos de 180 segundos de reposo. Se han practicado pre-condiciones en todos los tipos de ensayos realizados; a saber, viscosimetría, oscilometría –con aplicación de barrido de esfuerzos y barrido de frecuencias- y ensayos de fluencia-recuperación, también conocidos como “*creep-recovery*”.

### **I.2.e.a) VISCOSIMETRÍA**

El barrido de esfuerzos aplicado a cada muestra depende de la consistencia de las mismas. Así, aunque el esfuerzo inicial es común para todos los ensayos siendo el mínimo que permite el dispositivo -de 0,06 Pa-el esfuerzo final difiere para cada una desde un valor de 100 Pa para las muestras de consistencia fluida, hasta 300 Pa en el ensayo de lipogel de la serie C, de apariencia sólida. El hidrogel de Carbopol® tiene una textura más rígida que los lipogeles, por lo que las condiciones de los análisis han requerido la aplicación de valores de esfuerzo de cizalladura más elevados; en el estudio viscosimétrico se ha aplicado un barrido de esfuerzos hasta 400 Pa. La rampa de esfuerzos aplicados se ha desarrollado durante 120 segundos y se han muestreado 60 puntos. Dado el intenso carácter tixotrópico que han manifestado las preparaciones – cuya cuantificación se detalla más adelante- se ha procedido a renovar la muestra para cada réplica de los ensayos pues, de lo contrario, hubiera requerido un tiempo de regeneración muy prolongado.

### **I.2.e.b) OSCILOMETRÍA**

La determinación de la viscoelasticidad de las preparaciones (Kählig H, 2005) mediante la aplicación de un esfuerzo de cizalladura oscilatorio requiere en primer lugar la determinación del intervalo de esfuerzos ( $\sigma$ ) para el cual se observe un comportamiento viscoelástico lineal. Este intervalo es conocido como la zona viscoelástica lineal (ZVL) y se puede identificar midiendo el módulo elástico  $G'$  en función del  $\sigma$  a una frecuencia constante (1 Hz en nuestros experimentos). Se seleccionó, por tanto, un valor de  $\sigma$  comprendido en la ZVL y se aplicó un barrido de frecuencias entre  $10^{-2}$  y 100 Hz para obtener los valores de los módulos de almacenamiento o elástico  $G'(\omega)$  y de pérdidas o viscoso,  $G''(\omega)$ . Se realizaron los ensayos a dos temperaturas ( $25 \pm 0,1$  °C y  $32 \pm 0,1$  °C).

### **I.2.e.c) CREEP-RECOVERY**

Se han sometido las muestras a un esfuerzo cortante constante (1 Pa) durante un período de 120 s, midiendo el módulo de *creep* o fluencia (J) durante ese tiempo. Interrumpida la aplicación del esfuerzo, se midió la recuperación durante otros 120 s. Los experimentos se han llevado a cabo a las dos temperaturas ( $25 \pm 0,1$  °C y  $32 \pm 0,1$  °C).

### **I.2.f. ENSAYO DE LIBERACIÓN EN DISPOSITIVO DE DIFUSIÓN SIN MEMBRANA**

Se ha estudiado el perfil de liberación de cada fórmula en dispositivo de difusión sin membrana con objeto de orientar la selección

de las que presentan cinéticas más adecuadas.

Las características del baño termostataado, similar al dispositivo de paleta para el ensayo de parches transdérmicos descrito en la USP, pretenden simular las condiciones normales de la administración tópica con una temperatura ajustada a  $32\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  –temperatura fisiológica- y agitación de 60 rpm que mantenga la homogeneidad en la concentración del medio receptor y asegurar, así, las condiciones *sink*.

Para las fórmulas de meloxicam la solución receptora empleada ha sido 100 ml de un tampón de fosfatos a pH 5,5 (RFE, 2002). Se sembró 1g de medicamento (0,3%) sobre un portaobjetos.

El ensayo de las fórmulas cosméticas de AcVE ha requerido, en cambio, un medio receptor más complejo que permita la solubilidad de la molécula hidrofóbica en un medio acuoso. Se ha empleado una mezcla de solución tampón de ácido cítrico/citrato a pH 5,5 y etanol (3:1, v/v) con Tween 80 al 1% que incrementa la solubilidad del acetato.

El tiempo de duración del ensayo ha sido de 24 horas con toma de muestra y reposición con medio fresco a tiempos prefijados de 5-10-15-30 min, y cada hora hasta  $t=7$  h. También se tomaron muestras en el tiempo final del experimento. Se ha llevado a cabo previamente la validación del método analítico de valoración de cada uno de los analitos en espectrofotómetro de tipo Perkin Elmer, Lambda 40 (Anexos IV.1 y IV.2, de meloxicam; Anexos VII.1 y VII.2, de AcVE) y en HPLC –Perkin

Elmer UV/Vis Detector LC 290 y Gilson 117 UV Detector- con integración de las señales cromatográficas según el programa TotalChrom Navigator, para el análisis de meloxicam (Anexo IV.3), AcVE (Anexo VII.3) y VE (Anexo VII.4).

### **I.2.g. ESTUDIO DE SELECCIÓN DE MEMBRANA ARTIFICIAL**

Se ha llevado a cabo un estudio de selección de membrana en celdas de Franz previo a la realización de los ensayos de cesión de meloxicam a partir de las formulaciones de uso tópico para comparar los perfiles de difusión de una solución de meloxicam a través de las dos membranas escogidas para el ensayo.

La solución de meloxicam para el compartimento donador se preparó disolviendo el fármaco en una cantidad apropiada de solución tampón de fosfatos pH 5,6 (500 µg/ml). Se realizaron los ensayos con dos tipos de membranas artificiales de naturaleza hidrofílica comúnmente usadas en dispositivos de difusión de Franz: MF<sup>TM</sup> 0,45 µm HA y Durapore<sup>®</sup> 0,45 µm HV (ambas suministradas por Millipore<sup>®</sup>).

Las membranas sintéticas se mantuvieron inmersas en tampón pH 5,5 durante 24 h previas al montaje de las celdas de difusión. El compartimento receptor tiene una capacidad de 17 ml. El área de difusión

es de 2,83 cm<sup>2</sup>. Se colocaron 1,5 ml de muestra en el compartimento donador cubriendo la superficie de la membrana. Se tuvo especial cuidado de evitar la presencia de burbujas de aire bajo la membrana. El dispositivo se mantuvo a 32±1°C con agitación magnética continua.

Se valoró según el programa Statgraphics v. 5.1 la posible diferencia estadísticamente significativa de la media de los perfiles de cesión de meloxicam empleando cada una de las membranas sintéticas.

Se analizó el contenido en meloxicam de las muestras mediante espectrofotometría UV (Perkin Elmer, lambda 40) a la longitud de onda de máxima absorción  $\lambda= 362$  nm. En el estudio de selección de membrana para una solución de AcVE se procedió como se ha descrito para el meloxicam.

La solución de AcVE para el compartimento donador se preparó disolviendo el analito en una cantidad apropiada de solvente (solución tamponada de ácido cítrico/citrato y etanol, 3:1, v/v) con 1% de etanol, pH 5,6 (500 µg/ml). Se realizaron los ensayos con los dos tipos de membranas artificiales de naturaleza hidrofílica descritas anteriormente así como con una de tipo Durapore PVDF hidrófoba, HVHP 04700, de 0,45 µm de tamaño de poro.

### I.2.h. ENSAYO DE CESIÓN EN CELDAS DE FRANZ CON MEMBRANA ARTIFICIAL

Los ensayos de cesión de las diversas formulaciones se han llevado a cabo en celdas de difusión de Franz empleando membranas artificiales de naturaleza celulósica con objeto de estudiar la influencia que sobre la liberación *in vitro* del activo pueden tener la naturaleza y características reológicas propias de cada vehículo (Realdon N, 1996; Realdon N, 2001; Valenta C, 2004). Los diversos perfiles de cesión del analito se relacionaron con la macroviscosidad de las formulaciones.

Para el estudio de cesión se han depositado muestras de 0,3 g de fórmula homogéneamente extendidas sobre la membrana en el compartimento donador. El medio receptor del fármaco ha sido una solución tampón de fosfatos a pH 5,5 que se ha mantenido en agitación mediante placa magnética durante el tiempo de ensayo para asegurar las condiciones *sink*. Las membranas se sumergieron en solución tampón durante 24 horas previas al ensayo. La temperatura de los dos compartimentos se ha aproximado a 32°C gracias a la recirculación de agua procedente de un baño termostataado a través de la doble cámara de cristal de la celda de difusión.

El tiempo de duración del ensayo ha sido de 6 horas. En los tiempos prefijados (5-10-15-30 minutos y cada hora hasta el tiempo final del ensayo) se tomaron del medio receptor alícuotas de 0,5 ml con posterior reposición de medio fresco. Las muestras han sido valoradas

espectrofotométricamente (Perkin Elmer, Lambda 40) a la longitud de onda de máxima absorción de meloxicam,  $\lambda_{\text{máx}} = 362 \text{ nm}$ .

Se ha determinado el flujo,  $J$ , ( $\mu/\text{cm}^2\text{h}$ ) en el estado estacionario por ajuste lineal del perfil cinético de cesión –cantidades cedidas acumuladas en función del tiempo-.

Se han ensayado diferentes modelos matemáticos con la finalidad de elegir el que con mayor fiabilidad sea capaz de explicar la cinética de disolución del fármaco a partir de las formas de dosificación propuestas en este trabajo (Doménech J, 1998). Las funciones mayoritariamente utilizadas pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- a) *Con base físico-química:*
  - Procesos de orden cero.
  - Procesos de orden uno.
  - Ecuación de la raíz cúbica.
  - Ecuación de la raíz cuadrada.
- b) *Sin base físico-química:*
  - Ecuación de Weibull.

A) En líneas generales, con respecto a las funciones *con base físico-química* se cumple que las formas sólidas con superficie constante – sistemas de liberación matriciales, forma Oros o pulsátiles- en las que el área expuesta al medio de disolución es constante durante todo el proceso, suelen ajustarse a una ecuación cinética de disolución de *orden*

*cero*. En este caso, la cantidad remanente de fármaco en función del tiempo es constante; es decir, en cada unidad de tiempo se disuelve una cantidad fija de fármaco.

$$Q = K_d (t - t_0)$$

$K_d$  = Constante de velocidad del proceso

$t_0$  = Período de latencia

El caso más general, sin embargo, es el de los sólidos con superficie variable que se adaptan a procesos cinéticos de orden uno, de raíz cuadrada o de raíz cúbica. En el proceso de *orden uno* la superficie es directamente proporcional a la cantidad remanente de fármaco en la forma farmacéutica.

$$Q = Q_\infty \cdot (1 - e^{-K_d(t-t_0)})$$

La ecuación de *raíz cuadrada*, en cambio, se ajusta a fármacos formulados en sistemas de liberación modificada o en formas farmacéuticas semisólidas. En este caso, la cantidad de fármaco disuelto en función del tiempo se determina según la ecuación de Higuchi.

a) Sistemas de liberación modificada

$$Q = K_d \cdot \sqrt{t - t_0}$$

b) Formas farmacéuticas semisólidas:

- Dosis en suspensión

$$Q = K \sqrt{(t - t_0)}$$

- Dosis disuelta en el excipiente

$$Q = \frac{-K_1 + K_1^2 + K_2 \sqrt{t-t_0}}{2}$$

La cinética de la *raíz cúbica* puede aplicarse, en los estudios de velocidad de disolución, por razones geométricas; concretamente cuando las partículas del fármaco presentan forma esférica o cuando se trabaja en presencia de tensioactivos que forman micelas en el seno de la solución.

En este caso, la variación que presenta la superficie del sólido es una función relacionada directamente con la raíz cúbica del cuadrado del volumen de las partículas.

$$Q = Q_\infty - [Q_\infty^{1/3} - K_{d(t-t_0)}]^3$$

B) Con respecto a los modelos matemáticos *sin base físico-química* una de las funciones más utilizadas es la *función de Weibull*, propuesta por Langenbücher y Behr para ser aplicada a los estudios de velocidad de disolución, y cuya expresión matemática es la siguiente:

$$Q_t = Q_\infty \left[ 1 - e^{-\left(\frac{t-t_0}{t_d}\right)^\beta} \right]$$

$t_d$  = tiempo que tarda en disolverse el 63,2% de la cantidad máxima de fármaco susceptible de disolverse.

$\beta$  = parámetro de forma (adimensional).

También se utilizan parámetros independientes del modelo de disolución que siga el fármaco.

a) *Parámetros puntuales*; son valores deducidos experimentalmente como la cantidad de fármaco disuelto a un determinado tiempo o el tiempo que tarda en disolverse un determinado porcentaje de la dosis ( $t_{10\%}$ ,  $t_{50\%}$ ).

b) *Eficiencia de disolución (EF)*; se calcula a partir de las curvas acumulativas de fármaco disuelto.

$$EF(\%) = \frac{AUC_0^T}{Q_{100} \cdot T} \cdot 100$$

$AUC_0^T$  = valor del área bajo la curva acumulativa de disolución, desde tiempo cero hasta el último valor experimental ( $T$ ), calculada por trapezoides.

$Q_{100} \cdot T$  = área del rectángulo delimitado por el porcentaje máximo de fármaco disuelto ( $Q_{\infty}$ ) y el tiempo  $T$  correspondiente al último punto experimental.

La eficiencia de disolución tiene dos limitaciones: debe disolverse como mínimo el 90% de la dosis, y el último punto experimental tiene carácter arbitrario. No obstante, en estudios comparativos es un parámetro muy operativo. La EF es un parámetro adimensional.

c) *Momentos estadísticos*; el proceso global de disolución de las moléculas de un fármaco es un proceso estadístico. Así, el tiempo de residencia del fármaco en estado sólido puede considerarse como una variable aleatoria, cuyo valor más representativo es su media, es decir, el tiempo medio de residencia o de disolución (MDT):

$$MDT = \frac{\sum[(t_i) \cdot \Delta Q_i]}{Q_\infty}$$

en la que:

$\sum[(t_i) \cdot \Delta Q_i]$  = suma del producto de los incrementos de las cantidades de fármaco disuelto a cada intervalo de tiempo considerado por los tiempos medios correspondientes a todos los intervalos de tiempo utilizados.

$Q_\infty$  = cantidad máxima disuelta de fármaco

La unidad del MDT se expresa en tiempo directo, horas o minutos.

El ajuste cinético de los perfiles de cesión de meloxicam (cantidades acumuladas en el tiempo) se ha procesado en el programa informático Excel. El modelo que mejor explique el proceso de velocidad de disolución será aquél en que la suma de los cuadrados de los residuales sea razonablemente pequeña, o si se quiere mínima. Debido a que cuanto mayor es el número de parámetros de la función de ajuste, mayor es la posibilidad de que sea menor el valor de SSQ, para seleccionar la mejor función se utiliza un parámetro discriminatorio de modelos. Uno de los más utilizados es el criterio de información de Akaike, cuya ecuación es:

$$AIC = n \cdot \ln SSQ + 2p$$

siendo:

$n$  = número de pares de valores experimentales (Q/t).

$SSQ$  = suma de los cuadrados de los residuales.

$p$  = número de parámetros de la función de ajuste.

La función que presente el menor valor de AIC es la que, estadísticamente, explica mejor el proceso de disolución estudiado.

El estudio de velocidad de disolución se ha llevado a cabo con cuatro réplicas de las formas farmacéuticas ensayadas, las cuales deberán someterse al mismo tipo de ajustado (uniformidad de lote). En la práctica, a menudo, el proceso de disolución de una o varias unidades se ajusta a

distintas funciones y, en este caso, no podría determinarse el valor medio de los parámetros en estudios comparativos. Se puede proceder aplicando el parámetro AIC para dilucidar el mejor ajustado global. Para la comparación de dos formulaciones se propone el método ANOVA.

### **I.2.i. ENSAYO DE PERMEACIÓN EN CELDAS DE FRANZ CON PIEL ANIMAL**

Los ensayos de permeación transdérmica (Bronaugh RL, 2005) de los activos que han sido objeto de estudio de esta memoria de tesis – meloxicam y AcVE- se llevaron a cabo en el Departamento Farmacéutico de la Universidad de Parma, Italia.

### **I.2.i.a) ENSAYO DE PERMEACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE MELOXICAM**

Los ensayos de permeación (Geinoz S, 2004; Gupta RR, 2005; Narishetty STK, 2005; Rosado C, 2003; Schicksnus G, 2004) y acumulación en la piel de meloxicam se llevaron a cabo en un dispositivo automatizado con seis celdas de difusión de Franz (área de  $0,6 \text{ cm}^2$ ) con toma de muestra y reposición con medio fresco programables. Se empleó como membrana piel previamente congelada de oreja de conejo. La piel fue extraída de la zona interna de las orejas de conejo, obtenidas de un criadero, y fue montada orientando el estrato córneo hacia el compartimento donador (Ostacolo C, 2004).

El compartimento receptor contuvo 3,8 ml de solución tampón de fosfatos de pH 7,4 y, en el compartimento donador, se depositó una dosis de 250 mg de medicamento al 0,3%. La elaboración de las formulaciones se detalla en el Apto. I.2.c. Para mantener las condiciones *sink* se mantuvo en agitación magnética el medio receptor durante el tiempo del ensayo. El tiempo de duración del ensayo fue de 24 horas, con toma de muestra cada hora hasta el  $t=8 \text{ h}$ , así como a  $t=12, 16, 20$  y  $24 \text{ h}$ , al término de las cuales se eliminó la muestra donadora, se desmontaron las celdas y la piel fue cuidadosamente lavada para eliminar cualquier residuo de la formulación donadora. Se recortó un disco de tejido coincidente con el área expuesta durante el experimento a la formulación ( $0,6 \text{ cm}^2$ ), se calentó con aire caliente de un secador de pelo durante 20 s y la epidermis se separó de la dermis con ayuda de una espátula. Este

procedimiento se ha mostrado eficaz para separarlas a nivel de la membrana basal (Touitou E, 1999). Los dos estratos de piel se colocaron en sendos tubos de plástico a los que se añadieron 2 ml de metanol para llevar a cabo la extracción durante 1 h a temperatura ambiente, agitando en varios momentos en un vórtex. Tras la centrifugación durante 10 min y 11000 rpm la solución extraída fue analizada mediante HPLC-UV así como cada una de las alícuotas tomadas del medio receptor durante el ensayo.

Se analizaron los perfiles de permeación obtenidos en el tiempo de ensayo según una ecuación correspondiente a la segunda ley de difusión de Fick en una membrana homogénea (Nicoli S, 2004) que permite la determinación de parámetros como el coeficiente de partición,  $K$ , y el de difusión,  $D$  (Nicoli S, 2005).

Se recogen en esta Memoria de Tesis cuatro réplicas del experimento de permeación.

### **I.2.i.b) ENSAYO DE PERMEACIÓN DE LAS FORMULACIONES COSMÉTICAS**

Los experimentos de permeación y metabolismo cutáneo de las formulaciones cosméticas de AcVE se realizaron en celdas de difusión de Franz (área de 0,6 cm<sup>2</sup>) no automatizadas con piel fresca de oreja de conejo como membrana.

El compartimento receptor contuvo 4,0 ml de solución tampón de fosfatos de pH 7,4 con un 5% de DM- $\beta$ -CD y, en el compartimento donador, se depositó una dosis de 1 ml de formulación al 2%. Las preparaciones de acetato de vitamina E ensayadas fueron los lipogeles seleccionados tras la caracterización, que se han denominado *Lipogeles 1 y 2*, e *Hidrogeles 3 y 7* cuya formulación se ha descrito anteriormente (Apto. I.2.c.). El contenido del compartimento receptor se mantuvo en agitación magnética para evitar el efecto de saturación bajo la membrana. El tiempo de duración del ensayo fue de 4 horas, al término de las cuales se tomó una alícuota del compartimento receptor, se eliminó la formulación donadora, se desmontaron las celdas y la piel fue tratada como se ha descrito en el ensayo de las formulaciones de meloxicam para obtener sendas soluciones extractivas de epidermis y dermis que fueron analizadas mediante HPLC-UV, así como las alícuotas del medio receptor tomadas al tiempo final del ensayo.

Se muestran los resultados de cuatro réplicas del experimento de permeación.

### **I.2.j. IONTOFORESIS**

La aplicación de productos ionizables mediante iontoforesis constituye una técnica de probada eficacia para tratamientos de intradermoterapia, logrando mediante la aplicación de corrientes galvánicas de escasísima molestia para el paciente, la introducción de

sustancias medicamentosas, nutritivas, hidratantes, o cosméticas en la dermis, logrando óptimas concentraciones del mismo a nivel local, sin la desventaja de sus posibles efectos sistémicos. Las moléculas susceptibles de ser aplicadas mediante esta técnica deben ser ionizables, es decir deben poder disociarse en subproductos eléctricamente cargados, para así poder penetrar con la corriente que actúa como un “transportador”.

Las ventajas de éste método incluyen la ausencia de reiteradas aplicaciones con agujas como en la mesoterapia, y una concentración del producto en el sitio de acción más controlada que con la vía tópica mediante geles o cremas.

En el proceso de absorción pasiva la vía anexial se ve desfavorecida por la limitada superficie que representan los anejos cutáneos. La aplicación de corriente eléctrica a la piel aumenta el flujo de fármaco a través de esta vía que constituye, en estas condiciones, la principal vía de penetración.

La piel ofrece una cierta resistencia al paso de la corriente eléctrica. La conductibilidad relativa de los diversos tejidos está relacionada con su contenido en agua. El estrato córneo, que contiene aproximadamente un 20% de agua, valor muy inferior al grado de hidratación de los tejidos vivos (alrededor de un 70%), es el que contribuye en mayor manera a la resistencia total de la piel. Cuando se aplica una diferencia de potencial a la piel, el movimiento de los iones que transportan la corriente atravesará

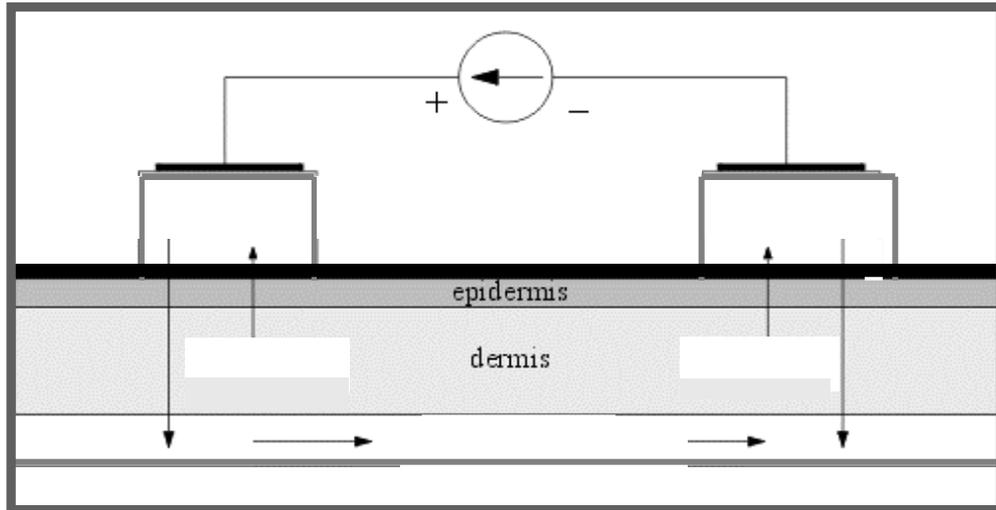
las vías de menor resistencia. Estas vías están representadas por los anejos de la piel y otras imperfecciones del tejido.

Se han identificado una vía intracelular no anexial y una vía de penetración intercelular para el transporte iontoforético aunque de entidad notablemente inferior.

### **I.2.j.a) ESQUEMA DE UN SISTEMA TRANSDÉRMICO IONTOFORÉTICO**

La aplicación de corriente requiere el empleo de un generador de corriente continua. Por razones de seguridad se prefieren generadores que produzcan una corriente constante, a intensidad de corriente (voltaje) variable en función de la resistencia del sistema.

Existen dos tipos de iontoforesis: anódica y catódica (Guy RH, 2000). La iontoforesis anódica facilita el paso a través de la piel de un fármaco cargado positivamente; la catódica, en cambio, facilita el paso de un fármaco cargado negativamente. Durante una iontoforesis anódica el fármaco en solución se pone en contacto con la piel y con el electrodo positivo (ánodo). El electrodo negativo (cátodo) está en contacto con una solución que contenga electrolitos, a su vez en contacto con la piel (Figura 29). Los dos electrodos se conectan a un generador de corriente continua de intensidad constante.



**Figura 29.** Esquema de un sistema transdérmico iontoforético

Cuando se aplica la corriente, la molécula cargada positivamente es repelida por el ánodo en dirección al tejido inmediatamente inferior, a partir del cual puede eventualmente acceder a los capilares sanguíneos e introducirse en el torrente circulatorio.

En la iontoforesis catódica, en la que el fármaco está cargado negativamente, la solución que contiene al fármaco se pone en contacto con el cátodo. La corriente aplicada produce entonces un flujo de fármaco a través de la piel y un flujo de contraiones desde los tejidos (Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> presentes en los fluidos extracelulares) que mantienen la electroneutralidad del sistema.

Para lograr una adecuada polaridad, la corriente aplicada debe ser de una oportuna intensidad y duración.

### **I.2.j.b) MECANISMOS DE TRANSPORTE**

La corriente eléctrica aplicada durante la iontoforesis produce un flujo de fármaco a través de la piel y un flujo de contraiones ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) desde los tejidos que mantienen la electroneutralidad del sistema. Esto constituye el transporte eléctrico propiamente dicho y se denomina electrorrepulsión, ya que es debido a la repulsión entre iones y electrodo del mismo signo.

Además de esto, se ha identificado otra contribución al flujo total del fármaco llamado flujo electroosmótico. Se trata de un flujo de solvente que tiene lugar cuando se aplica una diferencia de potencial a los dos lados de una membrana lipídica, porosa, cargada eléctricamente (Sieg A, 2004). La piel puede ser asimilada a una membrana lipídica, porosa, por la presencia de los anejos (glándulas y folículo piloso) y cargada puesto que presenta un punto isoeléctrico comprendido entre 3 y 4. Por encima de este valor de pH la piel se encuentra cargada negativamente. Esta carga negativa es el resultado de numerosos residuos aminoacídicos, los cuales aportan una carga negativa (por ejemplo, los grupos carboxílicos). A valores fisiológicos de pH, en la proximidad de la pared del poro (cargada negativamente) se encontrará un exceso de iones positivos (contraiones).

Cuando se aplica un campo eléctrico a la piel, se producirá la migración de los iones positivos en la dirección del ánodo al cátodo. Esta migración genera un movimiento de líquido en la misma dirección de migración del ión, desde el polo positivo hacia el negativo. El resultado de este flujo convectivo de líquido es el transporte anódico de todas las sustancias presentes en la solución hacia el ánodo, independientemente de la presencia de cargas eléctricas.

En definitiva, aunque en cantidad muy reducida, el transporte difusivo de fármaco contribuye al transporte total.

### **I.2.j.c) EFECTO DE LA CORRIENTE SOBRE EL TEJIDO CUTÁNEO**

Durante un experimento iontoforético la diferencia de potencial disminuye de modo sensible después de unos 30 minutos del comienzo de la aplicación de la corriente, manifestándose una alteración de la resistencia del tejido cutáneo (Volpato NM, 1995). Paralelamente a la disminución de resistencia se verifica también un aumento de la permeabilidad a los fármacos. Las alteraciones de resistencia eléctrica y de permeabilidad encontradas no tienen una explicación exacta. Según algunos autores el fenómeno podría ser debido a la acumulación de iones, provenientes del compartimento donador, en los estratos más externos de la piel, que provoca un aumento de la conductibilidad de la epidermis. Según otros autores la aplicación de corriente provoca una alteración más o menos reversible del tejido cutáneo.

La densidad de corriente aplicada tiene una importancia fundamental sobre la reversibilidad de las alteraciones. De hecho, la resistencia de la piel disminuye al aumentar el voltaje aplicado y con el tiempo de aplicación.

Aplicando una densidad de corriente inferior a  $15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  por un tiempo de 15-20 minutos, la disminución de resistencia es completamente reversible; con densidad de corriente más elevada se encuentran tanto efectos reversibles como irreversibles (Singh S, 1993).

Se ha determinado también el tiempo de recuperación de la piel, es decir, el tiempo necesario para que el tejido cutáneo vuelva a los valores basales de resistencia, tras la interrupción de la corriente. El tiempo de recuperación es proporcional al tiempo de aplicación y a la densidad de corriente (Oh SY, 1995).

#### **I.2.j.d) FACTORES QUE INFLUYEN EN EL TRANSPORTE IONTOFORÉTICO**

El transporte iontoforético puede verse influenciado por diversos factores como las propiedades físico-químicas del fármaco (dimensiones moleculares, carga), factores dependientes de la formulación (vehículo, tampón, pH, viscosidad, presencia de otros iones), factores eléctricos (intensidad de corriente, corriente utilizada), factores biológicos (espesor

e integridad del estrato córneo) y otros factores como la duración del tratamiento.

### **1) pH**

En la administración iontoforética, la cantidad de sustancia presente en el sistema en forma ionizada es un factor importante para su transporte. Dado que la mayor parte de los fármacos son ácidos o bases débiles, los cambios de pH en la solución donadora determinan una variación en el porcentaje de fármaco ionizado. Por otra parte, el pH desarrolla un papel relevante con respecto al flujo electroosmótico, alterando la carga de grupos iónicos en el interior de la piel e influyendo, por tanto, en la dirección y la entidad del flujo electroosmótico.

El pH se mantiene en el valor deseado mediante la utilización de tampones. El tampón ideal es aquel que contiene iones en concentraciones tales que contribuyen de forma mínima al transporte de corriente, sin perder la capacidad de tamponar para mantener el pH.

Por otra parte, es importante tener presente que el pH de las soluciones aplicadas a la piel debe estar comprendido entre 3 y 8 de modo que no produzca irritaciones y daño a la piel.

## **2) Competición iónica**

La presencia de iones con carga del mismo signo del fármaco (co-iones) en la solución donadora dará lugar a una competición iónica por el transporte de la corriente. En particular los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$ , pequeños y móviles, son altamente competitivos.

## **3) Corriente**

La mayor parte de los experimentos iontoforéticos utiliza corriente continua de intensidad constante. El flujo de fármaco es directamente proporcional a la densidad de corriente eléctrica aplicada: el valor de máxima densidad bien tolerado no puede superar  $0.5 \text{ mA/cm}^2$ . Como alternativa a la corriente continua de intensidad constante, se ha propuesto el uso de corriente continua pulsante. Parece que atenúa el fenómeno de polarización de la piel y el desarrollo de posibles irritaciones.

## **4) Electrodo**

Es muy importante también el material que constituye los electrodos. Los electrodos inertes de tipo níquel, platino, acero, provocan electrolisis del agua con formación de iones  $\text{H}^+$  en el ánodo y de iones  $\text{OH}^-$  en el cátodo. Estos tienen una elevada movilidad y en consecuencia compiten con el fármaco por el transporte de la corriente; por otra parte, pueden provocar alteraciones significativas del pH que pueden dañar la piel y/o comprometer la estabilidad de la formulación. El empleo de electrodos reversibles, tipo  $\text{Ag/AgCl}$ , evita la aparición de estos

fenómenos. Estos electrodos están constituidos por una mezcla de plata y cloruro de plata: las reacciones de oxidación y de reducción provocan la transformación de la plata en cloruro y viceversa.

Ánodo:  $\text{Ag}^{\circ}(\text{s}) + \text{Cl}^{-}(\text{ac}) = \text{AgCl}(\text{s}) + \text{e}^{-}$  Oxidación

Cátodo:  $\text{AgCl}(\text{s}) + \text{e}^{-} = \text{Ag}^{\circ}(\text{s}) + \text{Cl}^{-}(\text{ac})$  Reducción

Estas reacciones tienen un potencial redox inferior al del agua y, por tanto, evitan la electrolisis.

### **5) Concentración y dimensiones moleculares**

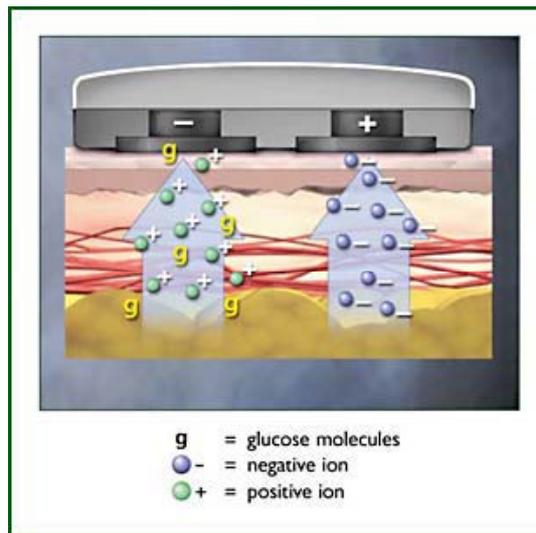
El aumento de concentración del fármaco en el compartimento donador produce un aumento lineal en la permeación, mientras parece existir una proporcionalidad inversa entre pesos moleculares y coeficiente de permeabilidad.

### **6) Características de la piel**

El espesor de la epidermis condiciona la permeabilidad y, por tanto, es importante la región del cuerpo sobre la que se aplica la iontoforesis (Álvarez-Román R, 2003).

### I.2.j.e) UTILIZACIÓN DE LA IONTOFORESIS

La iontoforesis puede ser empleada para acumular el fármaco en la piel y en los tejidos inferiores con el fin de una acción local, o bien para promover la absorción sistémica de fármacos con determinadas características físico-químicas y farmacológicas (López RFV, 2003). Asimismo, se están empleando sistemas iontoforéticos para la determinación del nivel de glucemia en pacientes diabéticos (Figura 30).



**Figura 30.** Representación esquemática de un sistema de control glucémico iontoforético.

Los fármacos de acción sistémica actualmente utilizados en terapia por vía transdérmica se caracterizan por ser de pequeñas dimensiones y elevada lipofilia (nitroglicerina, nitrato de isosorbide, escopolamina, clonidina, estradiol).

La utilización de la iontoforesis permitiría, asimismo, la administración de fármacos previamente ionizados y de naturaleza hidrofílica. A esta clase de compuestos pertenece también la sal sódica de meloxicam empleada en este trabajo.

Se ha llevado a cabo la técnica de iontoforesis para estudiar la modificación que, sobre el perfil de permeación, ejerce la aplicación de una cierta intensidad de corriente. La fórmula ensayada de este modo ha sido el Hidrogel de meloxicam, habiendo comprobado previamente que es capaz de conducir la corriente eléctrica. El pH de la formulación es de 4,18 que coincide con el valor de  $pK_a$  de meloxicam. De esta forma está asegurada, por definición, según la ecuación de Henderson-Hasselbach, la presencia de un 50% de especies ionizadas de meloxicam en forma aniónica.

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad ; \text{ Ecuación de Henderson-Hasselbach.}$$

Así pues, se ha practicado una iontoforesis catódica aplicando una intensidad de corriente de  $0.5 \text{ mA/cm}^2$ . Como el área de difusión de la piel en cada celda es de  $0,6 \text{ cm}^2$ , se ajustó convenientemente el voltaje a  $0.3 \text{ mA}$ . Las celdas de Franz se conectaron en serie para dejar pasar la corriente.

La formulación donadora fue Hidrogel de meloxicam al 0,3% en dosis infinita. La toma de muestra –de 300  $\mu$ l- se llevó a cabo manualmente cada hora durante las 8 primeras horas del ensayo a partir de las cuales se interrumpió la corriente suministrada al sistema para verificar el posible efecto promotor de la permeación que se haya podido producir en la piel por efecto de la corriente. Se tomaron muestras del compartimento receptor de las celdas a las 23 y 24 horas de comienzo del ensayo. Las muestras fueron analizadas en HPLC-UV/Vis (Perkin Elmer, LC 290) a la longitud de onda de máxima absorción de meloxicam, 362 nm. Las condiciones del análisis se detallan en el Anexo IV de validación de meloxicam en HPLC-UV. El flujo de fase móvil se estableció en 1.0 ml/min y el tiempo programado para el análisis de cada muestra fue de 5 min.



**Figura 31.** Equipo de iontoforesis de aplicación en terapéutica.

## *Resultados y Discusión*

## **II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **II.1. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS GELES**

#### **II.1.a. FORMULACIONES OLEOSAS**

Las preparaciones presentan características organolépticas variables en función de la composición de las mismas (Tabla 7). Los factores analizados han sido:

- **Color:** El calentamiento aplicado durante la elaboración provoca un oscurecimiento de los preparados aunque no se altera la transparencia. Este fenómeno se observa especialmente en las fórmulas de la *serie A* que contienen exclusivamente aceite de oliva y agente gelificante. Las otras preparaciones, que contienen algún agente tensioactivo, presentan un color que oscila entre amarillento –*serie D*- y verdoso –*serie C*-. Las fórmulas más oscuras –marrón claro- corresponden a la *serie B*.

Es de destacar, también, que la transparencia de las formulaciones estudiadas se relaciona con la consistencia en el sentido de que las fórmulas que contienen tensioactivos céreos –Olivem 900, Olivem 700- presentan mayor opacidad así como una mayor consistencia que las que contienen Olivem 300 –*serie E*- o Span 80 –*serie B*-.

El aspecto descrito no ha sufrido modificaciones durante el almacenamiento de las preparaciones.

- **Textura y consistencia (Anexo II):** La homogeneidad de la fórmula está determinada por la adecuada fusión e interposición de la etilcelulosa en el medio oleoso. Este proceso está influido en un sentido u otro por la adición del agente tensioactivo. Pues bien, se observa que las fórmulas de la *serie A* son homogéneas y de textura agradable. Sin embargo, aparece un exudado de aceite que parece expulsado de la matriz del gel. El sedimento es fácilmente redispersable en el medio.

Las fórmulas que contienen Span 80 no incorporan adecuadamente el agente gelificante. Esto se manifiesta en la presencia de ciertos gránulos de etilcelulosa en la fórmula y, por otro lado, en la tendencia a la formación de un sedimento durante el almacenamiento que, sin duda, constituye un inconveniente de estas formulaciones.

Las fórmulas de la *serie C* son las que presentan una mayor consistencia y estabilidad. Sólo la *CI* puede dar lugar, durante el tiempo de almacenamiento –seis meses–, a unas gotas de exudado fácilmente incorporables a la fórmula por simple agitación.

La elevada consistencia impide que la fórmula resbale por las paredes del recipiente.

Las de la **serie D** son, también, homogéneas y agradables al tacto. Presentan menor consistencia que las anteriores y, por tanto, mejor extensibilidad. Tienen características organolépticas que las hace idóneas para la administración por vía tópica.

Las fórmulas de la **serie E** no resultan uniformes ni agradables al tacto por la presencia de algunos gránulos de etilcelulosa que no se han incorporado adecuadamente a las preparaciones. Esto puede deberse al agente tensioactivo, Olivem 300, que no facilita la interposición ni la estabilidad del preparado. Se sabe que este tensioactivo necesita la ayuda de otros agentes para llevar a cabo el efecto tecnológico deseado.

- **Sabor:** Esta característica resulta útil sólo si se considerara la adición de un principio activo con fin medicamentoso de administración oral (García H, 2001). Conserva el sabor propio del aceite de oliva aunque matizado por el resto de los componentes. En algunas fórmulas se podría corregir puesto que resulta muy intenso y de escasa aceptabilidad. Los vehículos formulados en este trabajo, sin embargo, se han diseñado para una aplicación cosmética –con la incorporación de AcVE- y terapéutica de uso tópico –cuando se incluye meloxicam- por lo que el estudio de la palatabilidad de los mismos carece de interés.

Las fórmulas que se podrían seleccionar por su idoneidad para la administración tópica –que es la finalidad a la que queremos destinar estas preparaciones- son, por su homogeneidad, estabilidad, aspecto y textura, las de la **serie C y D**.

	<b>COLOR</b>	<b>TEXTURA Y CONSISTENCIA</b>	<b>COLOR</b>
<b>SERIE A</b>	Amarillento oscurecido	Homogénea, agradable; fluida	Intenso a aceite. No aceptable
<b>SERIE B</b>	Marrón	No homogénea; líquida. No aceptable	Intenso a aceite. No aceptable
<b>SERIE C</b>	Verdoso	Homogénea, agradable; consistencia de gel, rígido	Suave a aceite. Aceptable
<b>SERIE D</b>	Amarillento	Homogénea; más fluida que la serie C	Moderado a aceite. Aceptable
<b>SERIE E</b>	Verdoso	Homogénea; líquida. Aceptable	Intenso y rancio. No aceptable

**Tabla 7.** Descripción de las características organolépticas de las fórmulas.

### **II.1.b. FORMULACIONES HIDROFÍLICAS**

La observación de los hidrogeles indica que aquellos elaborados con Olivem 700 –polímero derivado del aceite de oliva con capacidad tensioactiva: *PEG-4 Olive oil-*, **Fórmulas 1 y 2**, presentan la textura más viscosa confiriendo un aspecto sólido y blanco a los geles. Esta rigidez puede dificultar su extensibilidad.

Las **Fórmulas 3 y 4**, que incluyen en su composición Tween 80, presentan mayor fluidez y menor opacidad con un color blanquecino.

Las que contienen una mezcla de PEG a partes iguales (PEG 1500: PEG 400), *Fórmulas 5* y *6*, tienen un aspecto parecido a las anteriores aunque con mayor transparencia y textura agradables.

Los hidrogeles de AcVE presentan la ventaja sobre los lipogeles de sus mejores cualidades cosméticas –aspecto, color, olor- así como su aceptabilidad en el mercado por el atributo añadido de ser lavables.

El *Hidrogel 7* presenta características idóneas para su aplicación tópica cosmética por su textura y aspecto semitransparente blanquecino. Se presenta como una preparación fácilmente extensible.

Por último, la preparación hidrofílica que incorpora meloxicam con fines terapéuticos mantiene las características del gel de carbopol en cuanto a su textura pero difiere en la transparencia ya que dicho fármaco aporta una tonalidad amarillenta a la preparación.

## **II.2. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA**

Para una completa evaluación reológica podemos llevar a cabo dos tipos de experimentos: medidas transitorias y dinámicas como muestran los trabajos realizados por diversos autores con polímeros –goma xántica, hidroxipropilmetilcelulosa, etc.-. Estas técnicas se aplican a preparaciones líquidas con o sin fármaco. En este trabajo nos limitamos al estudio de los lipo e hidrogeles que, posteriormente, se emplearán como excipiente para la incorporación de un fármaco de acción antiinflamatoria –meloxicam- o acetato de vitamina E, AcVE –activo cosmético-.

Las muestras que vayan a ser sometidas a ensayos reológicos deben tener una historia mecánica previa semejante, por lo que se suelen aplicar ciertas pre-condiciones que aseguren la ruptura de la estructura interna del sistema. Esto se logra mediante la aplicación de un esfuerzo igual o superior al valor de esfuerzo umbral de cada muestra, seguida de un tiempo de reposo de igual duración en todos los casos en el que comience la reestructuración de los geles. De esta forma, las muestras parten de una situación análoga previa al estudio de sus parámetros reológicos.

En este trabajo, las pre-condiciones aplicadas se detallan a continuación:

- El valor de esfuerzo aplicado ha sido aquel capaz de hacer fluir a cada muestra. Por tratarse de preparaciones de consistencia variable, dicho esfuerzo ha oscilado entre 50 Pa para la *serie A* y 150 Pa para

los lipogeles más sólidos que, en la literatura, también se denominan “solid-like” –*serie C*-. La rigidez del hidrogel, *H*, por su parte, ha requerido la aplicación de 175 Pa.

- El tiempo de aplicación del esfuerzo se ha fijado en 60 segundos en todos los casos.
- La duración del estado de reposo posterior al esfuerzo aplicado ha sido de 180 segundos.
- Se han practicado pre-condiciones en todos los tipos de ensayos realizados; a saber, viscosimetría, oscilometría –con aplicación de barrido de esfuerzos y barrido de frecuencias- y ensayos de fluencia-recuperación, también conocidos como *creep-recovery*.

### **II.2.a. VISCOSIMETRÍA**

El barrido de esfuerzos que se aplica a cada muestra depende de la consistencia de las mismas. Así, aunque el esfuerzo inicial es común para todos los ensayos siendo el mínimo que permite el dispositivo, de 0,06 Pa, el esfuerzo final difiere para cada una desde un valor de 100 Pa para las muestras de la *serie A*, de consistencia fluida, hasta 300 Pa en el ensayo de los lipogeles de la *serie C*, de apariencia sólida.

El hidrogel de Carbopol<sup>®</sup> con meloxicam (*H*) tiene una textura más rígida que los lipogeles, por lo que las condiciones de los análisis han requerido la aplicación de valores de esfuerzo de cizalladura más

elevados; en el estudio viscosimétrico se ha aplicado un barrido de esfuerzos hasta 400 Pa.

La rampa de esfuerzos aplicados se ha desarrollado durante 120 segundos. Por otra parte, la condición instrumental de número de puntos a muestrear se estableció en 60.

Para evaluar la posible tixotropía de los geles se aplicó el barrido en sentido creciente y decreciente. Asimismo, dado el intenso carácter tixotrópico que han manifestado algunas preparaciones –cuya cuantificación se detalla más adelante- se ha procedido a renovar la muestra en cada réplica de los ensayos pues, de lo contrario, hubiera requerido un tiempo de reposo muy prolongado hasta la recuperación de su estado inicial de gel –*tiempo de regeneración*, típico para cada sustancia-, que resulta impracticable en el laboratorio.

Para obtener los reogramas, por tanto, hemos sometido las muestras a un barrido de esfuerzos, a intervalos regulares. Las medidas se han llevado a cabo atendiendo a tres variables:

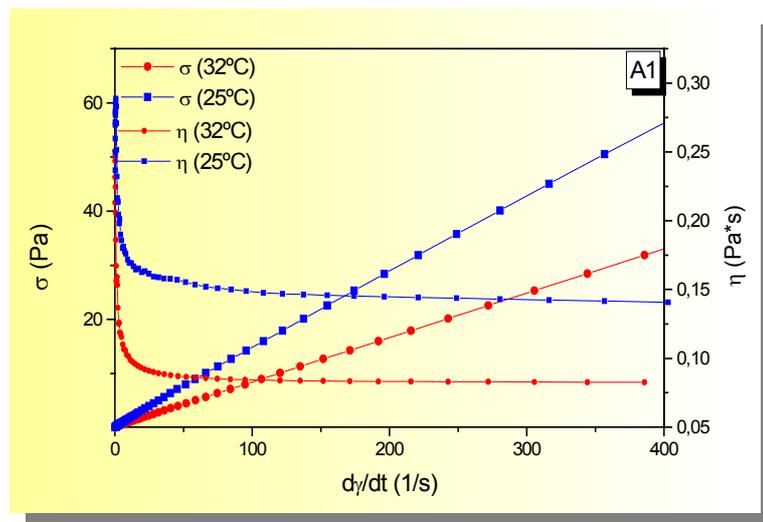
- **Temperatura:** 25°C, ambiente del laboratorio y 32°C, análoga a la correspondiente a la superficie de la piel.
- **Concentración de agente gelificante:** 3 y 5%.
- **Tipo de agente tensioactivo empleado en cada serie:** Span 80, Olivem 900, Olivem 700, Olivem 300.

- **Estudio en función de la temperatura**

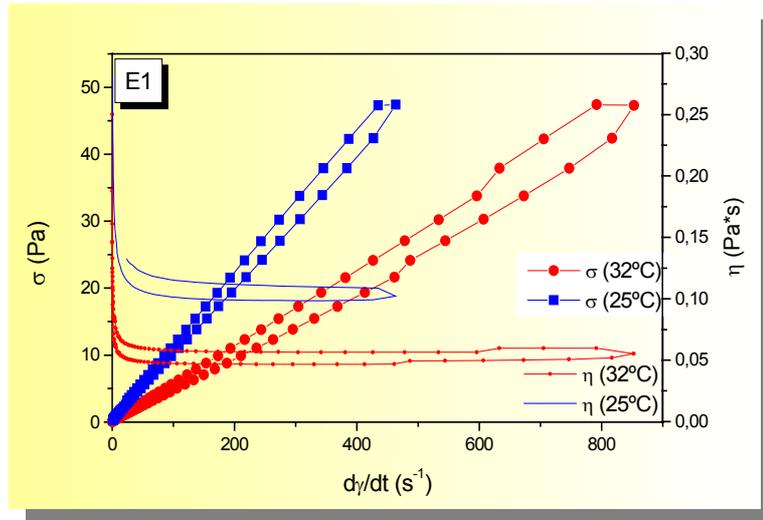
Todos los reogramas de viscosimetría correspondientes a las series de lipo e hidrogeles muestran un comportamiento uniforme frente a la temperatura –ambiente y fisiológica- (Figuras 32 a 43). Todos ellos presentan valores más elevados de viscosidad a 25°C que a 32°C. Es decir, que la viscosidad disminuye con el aumento de temperatura.

En cuanto a la caracterización reológica se observa en los reogramas diversos comportamientos:

- a) Por un lado, las fórmulas ***A1*** y ***E1*** (Figuras 32 y 33) muestran un comportamiento ***líquido newtoniano*** en el que la velocidad de deformación ( $dy/dt$ ) que experimentan las muestras aumenta de forma proporcional con el esfuerzo aplicado.



**Figura 32.** Reograma de la muestra ***A1***: esfuerzo aplicado ( $\sigma$ ) en ordenadas vs velocidad de deformación ( $dy/dt$ ), a 25° y 32°±1°C).



**Figura 33.** Reograma de la muestra *E1* con representación de las ramas creciente y decreciente del esfuerzo de cizalladura ( $\sigma$ ) frente a la velocidad de deformación ( $d\gamma/dt$ ), 25° y 32±1°C.

La viscosidad de los líquidos newtonianos disminuye con el incremento de temperatura, aproximadamente según la relación de Arrhenius:

$$\eta = A \cdot \ell^{-B/T}$$

donde  $T$  es la temperatura absoluta y  $A$  y  $B$  son constantes propias del líquido. En general, para los líquidos newtonianos, cuanto mayor sea su viscosidad, mayor es la dependencia con la temperatura. La dependencia de la viscosidad con la temperatura es tal que, para obtener resultados precisos, es necesario extremar el cuidado en el control de la temperatura en el estudio viscosimétrico.

b) Por otra parte, las muestras ensayadas de las fórmulas **A2**, **B1** y **D1** manifiestan cierta tendencia a un comportamiento **pseudoplástico fluidificante** según el cual el aumento de esfuerzo aplicado consigue desestructurar progresivamente la muestra pudiéndose observar una disminución en el valor de la pendiente – viscosidad aparente- (Figuras 34-36). Recordamos el concepto de *viscosidad aparente* -ya mencionado en el capítulo teórico dedicado a la reología-, que define el comportamiento de fluidez en el gradiente de velocidad dado, pero no da idea de cómo varía el comportamiento de fluidez para gradientes de velocidad mayores o menores a ese intervalo. Sólo en el caso de los líquidos newtonianos, la curva de fluidez es una línea recta con una pendiente constante. Por ello,  $\tau/\alpha$  es constante y con ella también el valor único de viscosidad que caracteriza al líquido.

En la industria y en la investigación es usual emplear sólo valores de viscosidad aparente para describir el comportamiento de fluidez de líquidos no newtonianos.

La aplicación de cremas y lociones en la piel alcanza unos valores de velocidad de deformación ( $d\gamma/dt$ ) comprendidos en el intervalo  $10^4$ - $10^5$   $s^{-1}$  (Barnes HA, 1989) por lo que discutiremos los resultados atendiendo a las velocidades de deformación adquiridas con órdenes de magnitud elevados. La Tabla 8

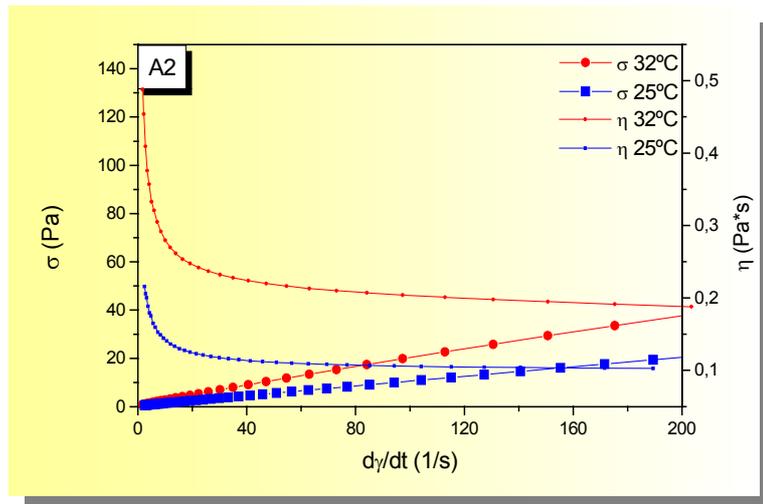
relaciona los valores de viscosidad de las muestras *A2*, *B1* y *D1* a una velocidad de deformación de  $200 \text{ s}^{-1}$ .

		<b>A2</b>	<b>B1</b>	<b>D1</b>
<b><math>\eta</math> (<math>d\gamma/dt=200 \text{ s}^{-1}</math>)</b>	<b>25°C</b>	0,0976±0,007	0,1556±0,003	0,1305±0,011
	<b>32°C</b>	0,1602±0,038	0,1168±0,011	0,0718±0,006

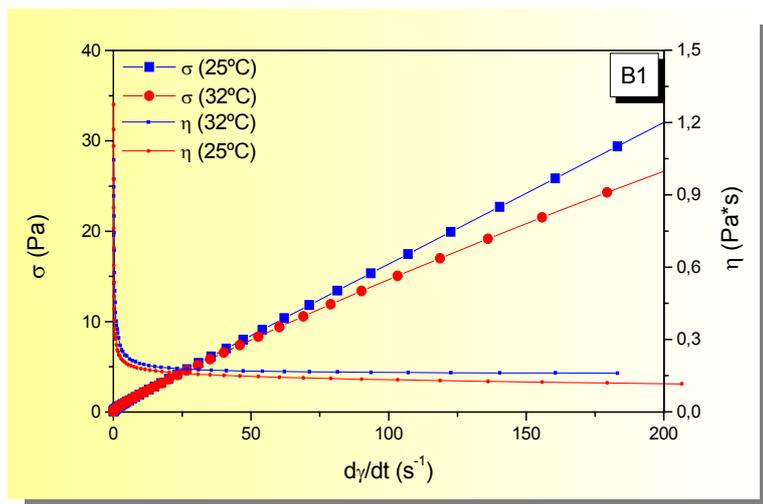
**Tabla 8.** Datos de viscosidad aparente de las muestras *A2*, *B1* y *D1* a una velocidad de deformación de  $200 \text{ s}^{-1}$ .

El concepto de viscosidad aparente ( $\eta$ ) se evidencia en los resultados de viscosimetría obtenidos. Así la fórmula **B1** (Figura 35), a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$  y velocidad de deformación de  $200 \text{ s}^{-1}$ , presenta una  $\eta$  de  $0,1556\pm 0,003 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  mientras que, a  $800 \text{ s}^{-1}$ , el valor de  $\eta$  correspondiente es menor, con un valor de  $0,1474\pm 0,003 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ .

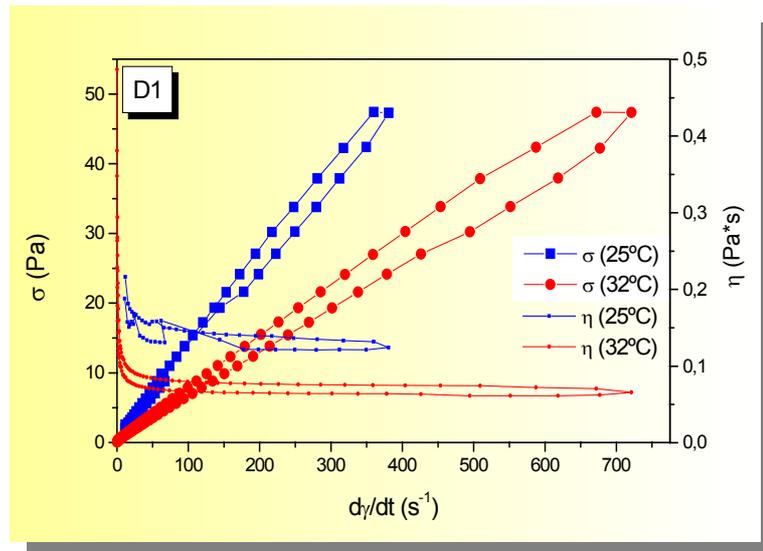
El efecto fluidificante de la temperatura se puede también observar en la figura 34 en la que a  $25^\circ\text{C}$  y  $200 \text{ s}^{-1}$ , la  $\eta$  presenta un valor ya citado de  $0,1556\pm 0,003 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  mientras que a  $32^\circ\text{C}$  es de  $0,1168\pm 0,011 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  como se expone en la tabla anterior.



**Figura 34.** Reograma de la muestra *A2*: esfuerzo ( $\sigma$ ) en ordenadas frente a la velocidad de deformación en el eje izquierdo de abscisas ( $25^\circ$  y  $32\pm 1^\circ\text{C}$ ) y la viscosidad ( $\eta$ ), en el derecho.



**Figura 35.** Reogramas de la muestra *B1*: esfuerzo ( $\sigma$ ) en ordenadas frente a la velocidad de deformación ( $d\gamma/dt$ ) a  $25^\circ$  y  $32\pm 1^\circ\text{C}$  y la viscosidad ( $\eta$ ).



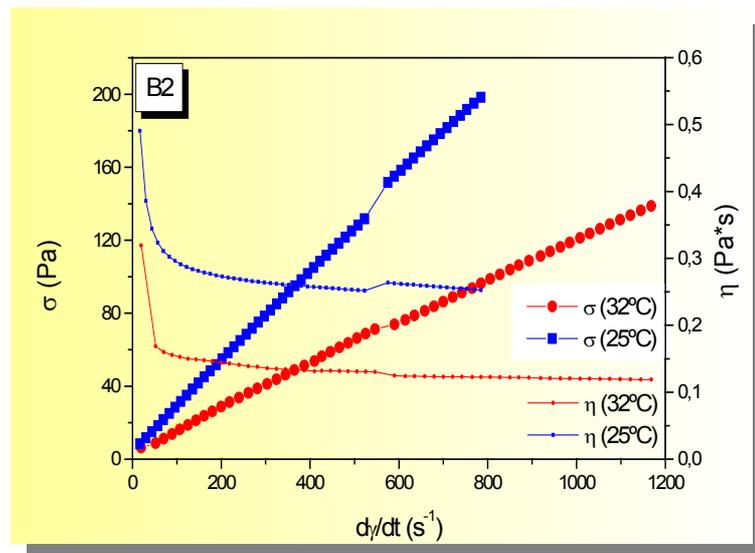
**Figura 36.** Reogramas de la muestra *D1*: esfuerzo ( $\sigma$ ) vs velocidad de deformación ( $d\gamma/dt$ ) y viscosidad ( $\eta$ ) a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) y fisiológica cutánea ( $32^\circ\text{C}$ ).

c) Los reogramas correspondientes a *B2*, *C1*, *C2*, *D2* y *E2* indican un comportamiento *plástico* o *pseudoplástico*. En estado de reposo, las fuerzas de cohesión proporcionan características de sólido pero, cuando se sobrepasa el límite de fluidez, los enlaces se rompen y pasan a comportarse como un líquido, fluyendo fácilmente.

Este comportamiento físico puede ser interpretado como si las partículas coloidales o moléculas de polímero formasen flóculos, de manera que se hace necesario un esfuerzo inicial para separarlas

en contra de las fuerzas electrostáticas de cohesión o de Van der

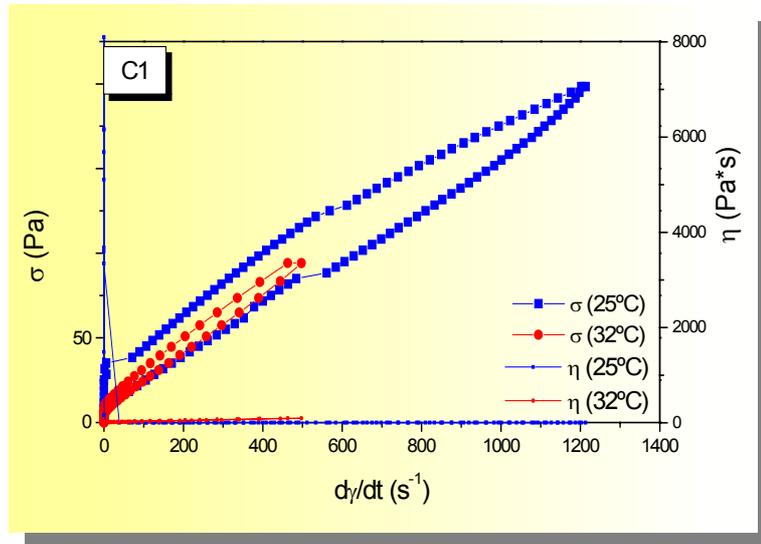
Waals. De esta manera, el *esfuerzo umbral* ( $\sigma_0$ ) sirve para caracterizar la reología de las formulaciones como una medida del grado de floculación. En particular, la Figura 37 muestra el comportamiento de **B2** a 25°C que puede clasificarse como plástico ideal mientras que, a 32°C, se podría definir como pseudoplástico fluidificante.



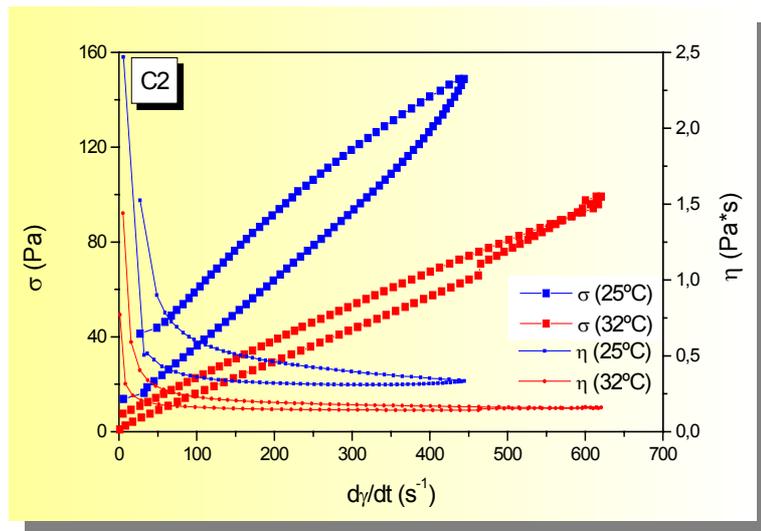
**Figura 37.** Reogramas de la muestra B2 (25° y 32±1°C): esfuerzo frente a la velocidad de deformación y viscosidad.

Las fórmulas **C1**, **C2**, **D2** y **E2**, en cambio, tanto a 25° como a 32°C se comportan como un plástico no ideal que, presentando esfuerzo umbral, no fluye con pendiente constante – comportamien-

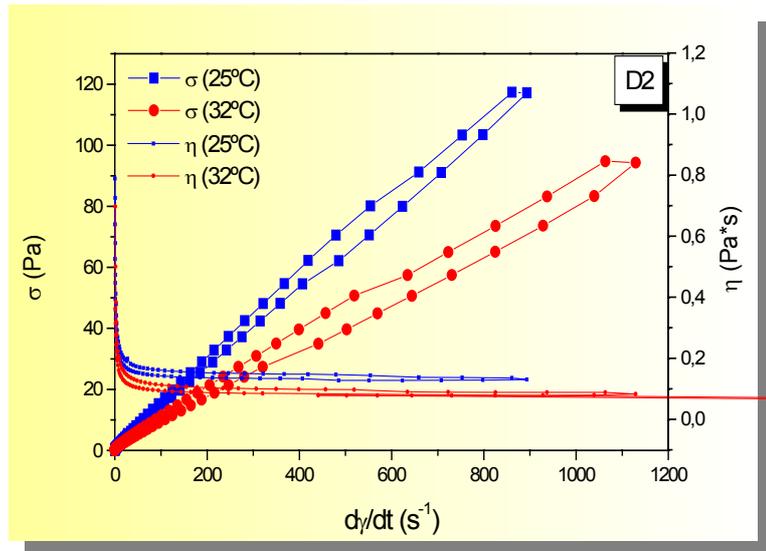
to ideal- sino que va fluidificándose progresivamente con el incremento del esfuerzo que se aplica (Figuras 38-41).



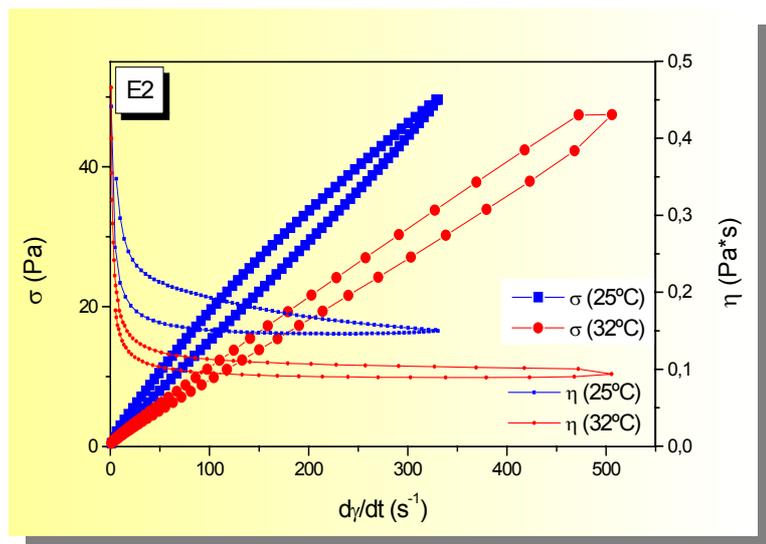
**Figura 38.** Reogramas de la muestra *C1* (25° y 32±1°C): rampa creciente de esfuerzos ( $\sigma=0-200$  Pa) frente a  $d\gamma/dt$  ( $s^{-1}$ ) y  $\eta$  (Pa·s).



**Figura 39.** Reograma de la muestra *C2* (25° y 32±1°C) que representa las rampas de esfuerzos ( $\sigma=0-150$  Pa) frente a  $(d\gamma/dt)$  ( $s^{-1}$ ) y  $\eta$  (Pa·s).

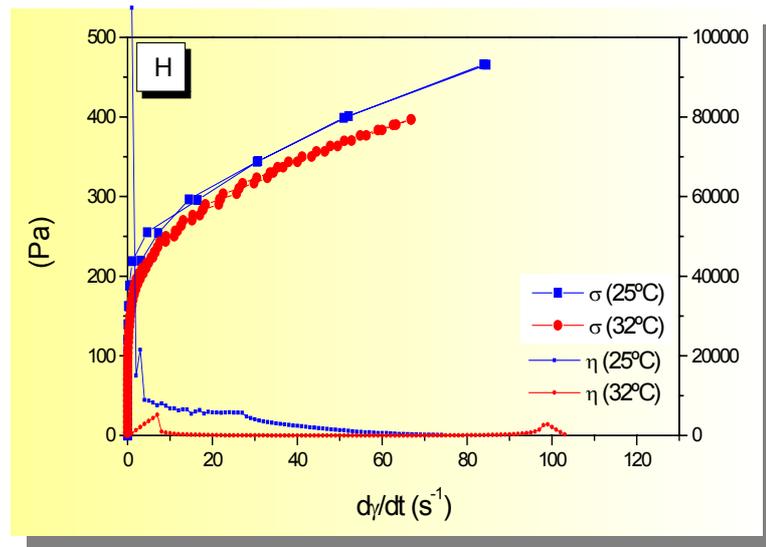


**Figura 40.** Reograma de *D2* ( $\sigma$  vs  $d\gamma/dt$  y  $\eta$ ): comportamiento tixotrópico a 25° y 32±1°C.

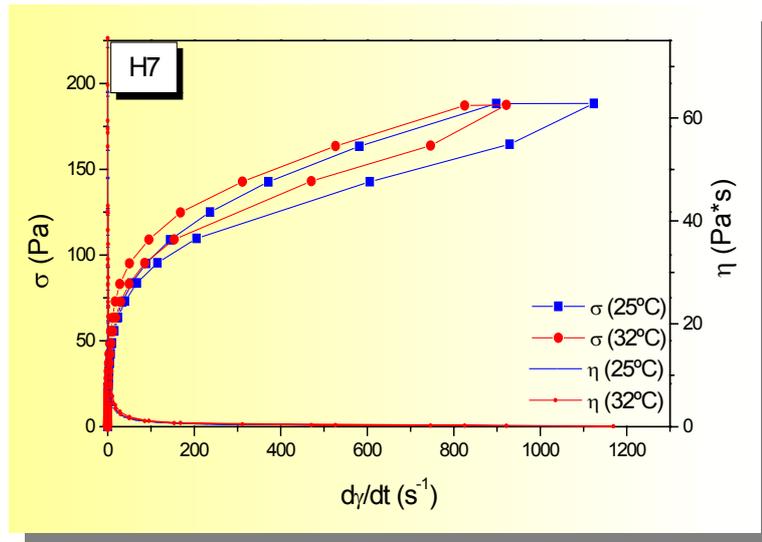


**Figura 41.** Reograma de la muestra *E2*: Aplicación de rampa de esfuerzos creciente y decreciente ( $\sigma= 0-50$  Pa) en ordenadas frente a la velocidad de deformación ( $s^{-1}$ ) y  $\eta$  ( $Pa \cdot s$ ) (25 y 32±1°C).

Las formulaciones hidrofílicas –hidrogel de carbopol® (*H*) e Hidrogel 7 (*H7*)-, por su parte, presentan también un comportamiento reológico plástico no ideal, como se aprecia en las Figuras 42 y 43, de modo que requieren la aplicación de un esfuerzo umbral ( $\sigma_0$ ) para comenzar a fluir.



**Figura 42.** Reograma de la muestra *H*: Rampa de esfuerzos creciente y decreciente en ordenadas ( $\sigma= 0-500$  Pa) frente a la velocidad de deformación ( $\text{s}^{-1}$ ) y la  $\eta$  ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ) (25° y 32±1°C).



**Figura 43.** Reograma de la muestra *H7*: Rampa de esfuerzos creciente y decreciente en ordenadas ( $\sigma = 0-225$  Pa) frente a la velocidad de deformación ( $s^{-1}$ ) y la  $\eta$  ( $Pa \cdot s$ ) ( $25^\circ$  y  $32 \pm 1^\circ C$ ).

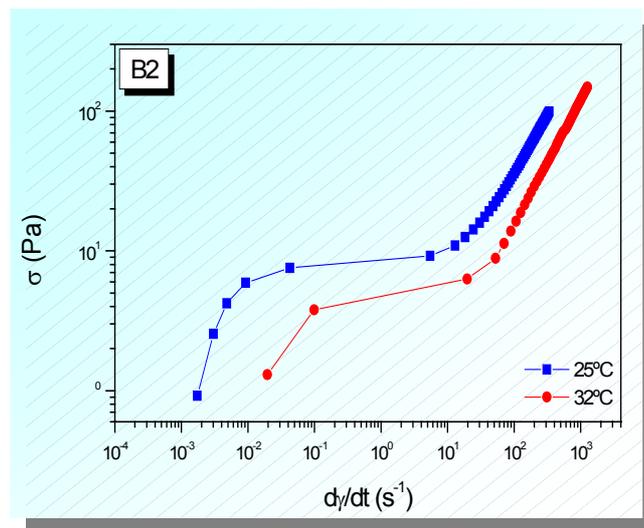
Se puede calcular en las gráficas anteriores el valor de  $\sigma_0$  aplicando en cada eje escalas logarítmicas de forma que la función presente una meseta o *plateau* en cuyo punto medio se reconocería este valor. Estos valores oscilan entre 0,807 Pa para la fórmula *D2* hasta 32,609 Pa, para *C2*, a una misma temperatura de  $25^\circ C$ . El hidrogel, *H*, manifiesta la mayor rigidez, requiriendo un valor de 162,540 Pa para fluir (Tabla 9).

Se puede establecer una relación entre el valor de  $\sigma_0$  y la textura y extensibilidad de las preparaciones. Así, valores de  $\sigma_0 < 10$  Pa corresponden a preparados demasiado suaves que

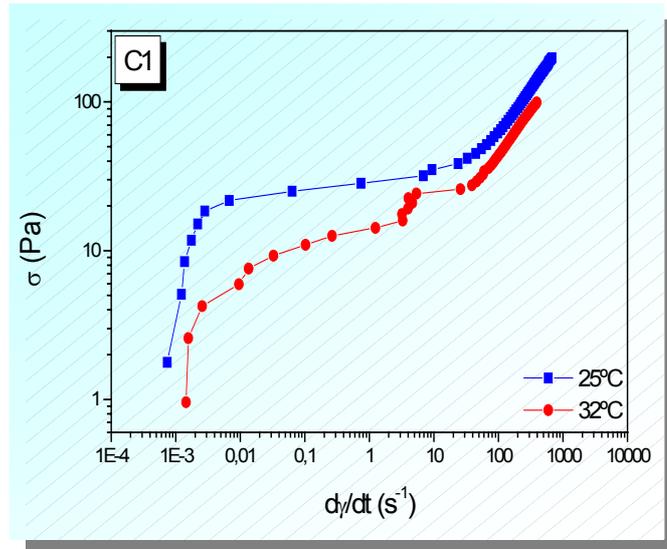
gotean al aplicarlos; presentan, en cambio, una textura adecuada, extensible, aquellos con un  $\sigma_0 = 10-100$  Pa; las preparaciones con  $\sigma_0 > 100$  Pa son demasiado duras y difícilmente aplicables (Haighton AJ, 1959).

		B2	C1	C2	D2	E2	H	H7
$\sigma_0$ (Pa)	25°C	8,57	26,98	32,61	0,81	0,68	162,54	28,16
	32°C	4,99	12,84	11,28	0,60	0,27	110,04	36,94

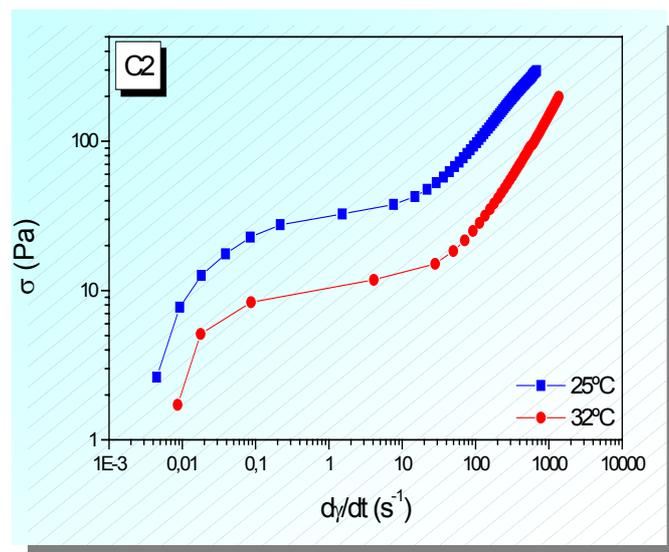
**Tabla 9.** Valores de esfuerzo umbral ( $\sigma_0$ ) correspondientes a las formulaciones que presentan un comportamiento reológico plástico ensayadas a 25° y 32±1°C calculados mediante la representación a doble escala logarítmica de los reogramas ( $\sigma$  vs  $d\gamma/dt$ ) correspondientes.



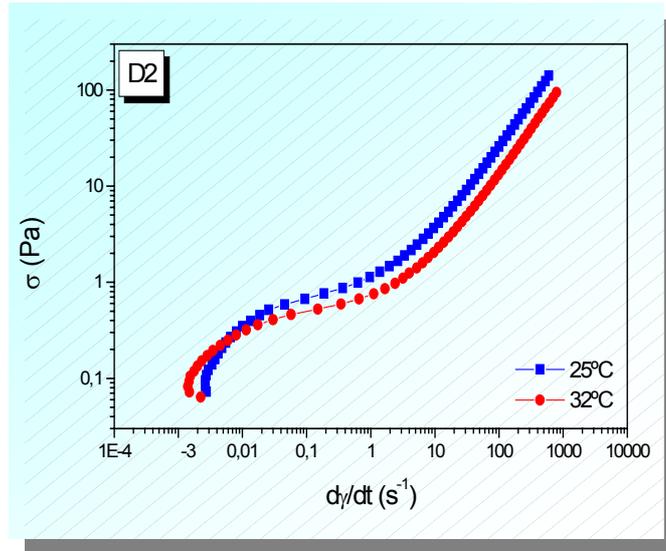
**Figura 44.** Reograma de B2 (esfuerzo frente a la velocidad de deformación) a doble escala logarítmica (25° y 32±1°C).



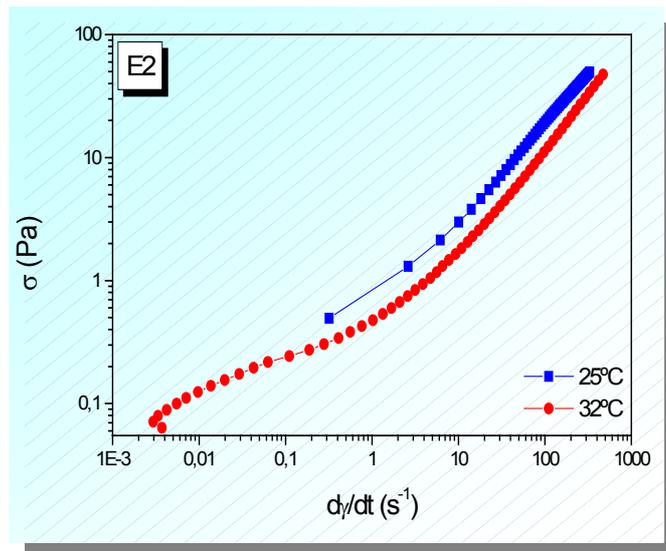
**Figura 45.** Reograma de *C1* (esfuerzo cortante frente a la velocidad de deformación) a doble escala logarítmica (25° y 32°C).



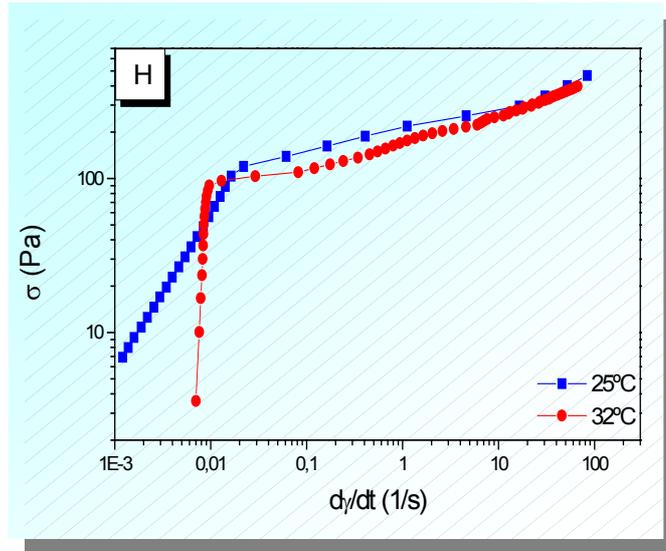
**Figura 46.** Reograma de *C2* (esfuerzo de cizalla frente a la velocidad de deformación) a doble escala logarítmica (25° y 32°C).



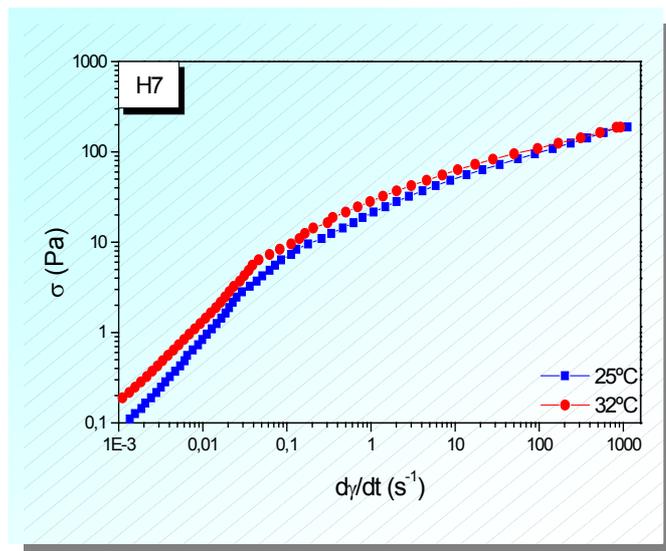
**Figura 47.** Reograma de D2 ( $\sigma$  vs  $d\gamma/dt$ ) a doble escala logarítmica (25° y 32±1°C).



**Figura 48.** Reograma de E2 ( $\sigma$  vs  $d\gamma/dt$ ) a doble escala logarítmica (25° y 32±1°C).



**Figura 49.** Reograma de  $H$  ( $\sigma$  vs  $d\gamma/dt$ ) a doble escala logarítmica (25° y  $32\pm 1^\circ\text{C}$ ).



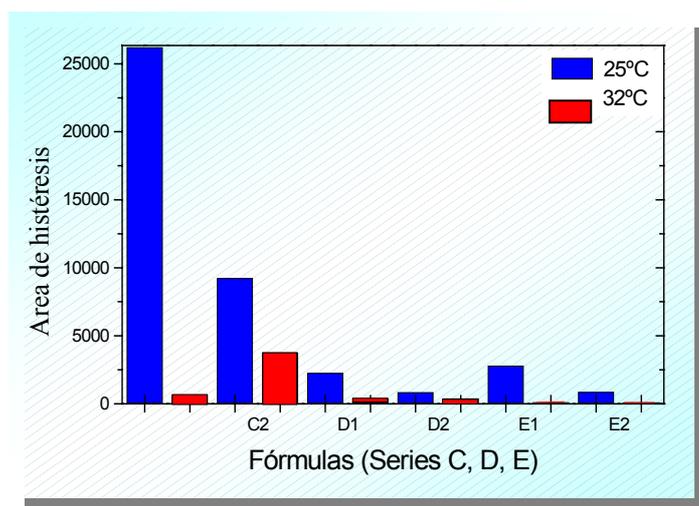
**Figura 50.** Reograma de  $H7$  ( $\sigma$  vs  $d\gamma/dt$ ) a doble escala logarítmica (25° y  $32\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Atendiendo al criterio de la variación de temperatura podemos detallar, a modo de ejemplo, que la fórmula **CI**, a temperatura ambiente ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) presenta un  $\sigma_0$  de 26,964 Pa mientras que, a la temperatura fisiológica ( $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), es de 12,840 Pa. Estos datos vienen a confirmar la hipótesis que ya hemos indicado: que el aumento de temperatura contribuye a la disminución de la viscosidad de las formulaciones debido al debilitamiento de las fuerzas de enlace interparticulares.

Como ya se citó anteriormente, algunas de las formulaciones que han sido objeto del presente estudio, presentan carácter tixotrópico más o menos intenso. Para analizarlo, hemos procedido a la cuantificación del área de histéresis considerándola como la diferencia entre el área bajo la curva de la rama ascendente y la situada bajo la rama descendente de los reogramas ( $\sigma$  frente a  $d\gamma/dt$ ) respectivos (Anexo III).

La Figura 51 representa de forma comparativa la correlación existente entre el área de histéresis calculada para cada muestra de lipogel y la temperatura a la que se ha llevado a cabo el ensayo ( $25^{\circ}$  y  $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). En todos los casos el valor del área disminuye con el aumento de temperatura. Asimismo, se puede observar en cada serie que la mayor concentración en agente gelificante no se corresponde con un ciclo tixotrópico de mayor amplitud como cabría esperar (Realdon N, 1996) sino que sucede lo contrario. Por

otra parte, como se indicará más adelante, el tipo de agente tensioactivo contenido en cada serie condiciona la magnitud del área de tal forma que la presencia de Olivem 900 confiere a las fórmulas una mayor consistencia y carácter tixotrópico que las que contienen Olivem 700 y, en último lugar, Olivem 300.



**Figura 51.** Representación de la magnitud del área de tixotropía calculada a partir de reogramas de las *series C-E* (25° y 32±1°C).

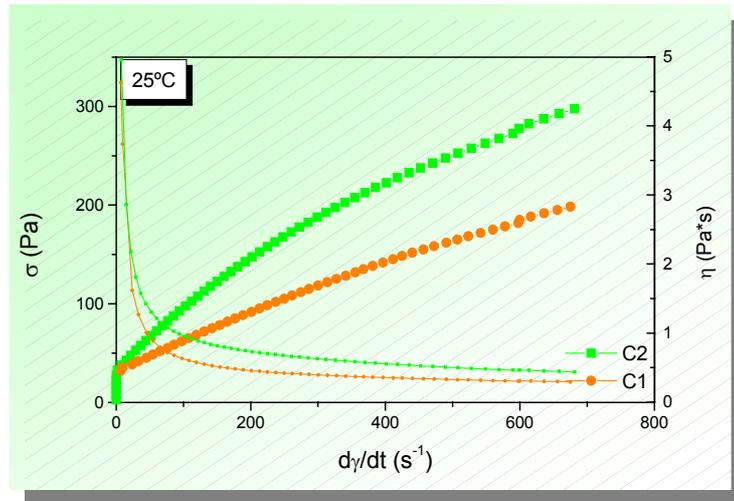
La Tabla 10 presenta los valores de dichas áreas proporcionales en cada caso a la energía que se requeriría para romper la estructura tixotrópica, según el cálculo procesado por el programa informático Origin 5,0.

Fórmulas	Temperatura (°C)	Área bajo rama ascendente	Área bajo rama descendente	Área de histéresis (W/m <sup>3</sup> )
<i>C1</i>	25°	147371,03	119453,45	27917,58
	32°	25376,06	24735,61	640,45
<i>C2</i>	25°	41341,84	32103,32	9238,51
	32°	32662,42	28891,67	3770,75
<i>D1</i>	25°	9925,50	7652,33	2273,17
	32°	16752,35	16368,26	384,09
<i>D2</i>	25°	53067,47	52213,12	854,32
	32°	38786,43	38392,55	393,88
<i>E1</i>	25°	11859,91	9061,99	2797,92
	32°	18186,32	18037,23	149,09
<i>E2</i>	25°	9819,43	8944,12	875,31
	32°	11638,79	1115,05	123,74
<i>H</i>	25°	30621,76	8550,19	22071,57
	32°	21306,62	5432,56	15874,06
<i>H7</i>	25°	171376,89	118142,52	53234,37
	32°	139469,09	95624,20	43844,89

**Tabla 10.** Cálculo de las áreas de histéresis (W/m<sup>3</sup>) de las series *C-E* así como de los hidrogeles *H* y *H7*, por diferencia entre al área bajo la curva de la rama ascendente y descendente en el estudio viscosimétrico ( $\sigma$  vs  $d\gamma/dt$ ) a 25° y 32±1°C.

- **Estudio en función del agente gelificante**

Se observan variaciones en la consistencia de los preparados que se manifiesta en el estudio reológico con valores más elevados de viscosidad y, en su caso, de esfuerzo umbral para las preparaciones que contienen mayor concentración de agente gelificante (5%) que las que incluyen menos cantidad (3%) a una misma temperatura.



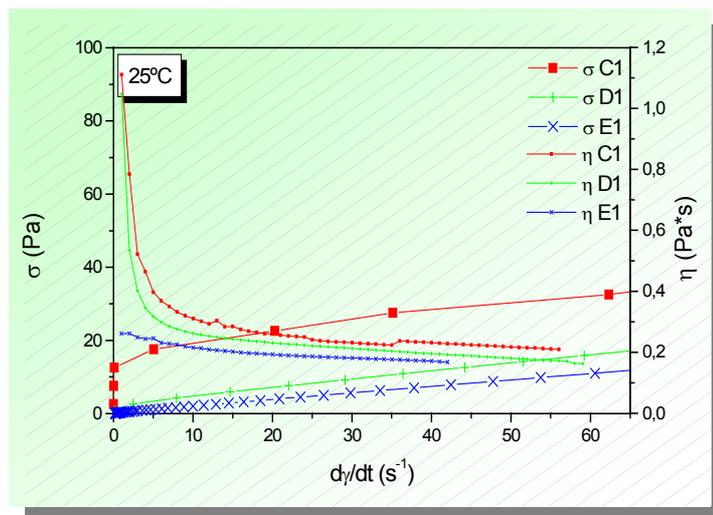
**Figura 52.** Reogramas de las muestras de *C1* y *C2* a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  ( $\sigma= 0\text{-}300$  Pa vs  $d\gamma/dt$ , s<sup>-1</sup> y  $\eta$ , Pa·s).

Se puede citar un valor de viscosidad para una misma serie – *C*- y temperatura  $-25\pm 1^\circ\text{C}$ - cuando se somete a un esfuerzo de 100 Pa de 0,429 Pa·s para *C1* y de 0,916 Pa·s para la fórmula *C2*.

El lipogel que mayor viscosidad presenta y, por tanto, valores menores de velocidad de deformación es **C2**, con una concentración de agente gelificante del 5%.

- **Estudio en función del agente tensioactivo empleado**

Se pretende estudiar la influencia que sobre la viscosidad ejerce el tipo de agente tensioactivo empleado en la elaboración de cada serie. Los valores de viscosidad más elevados corresponden a la *serie C* que incluye el derivado Olivem 900. Y, teniendo en cuenta también la influencia ya estudiada del agente gelificante, se deduce que el más viscoso es el preparado **C2**, con una viscosidad a temperatura ambiente y 100 Pa de 0,916 Pa·s – como ya se ha citado-, mientras que **D2** presenta un valor de 0,235 Pa·s y **E2**, 0,205 Pa·s.

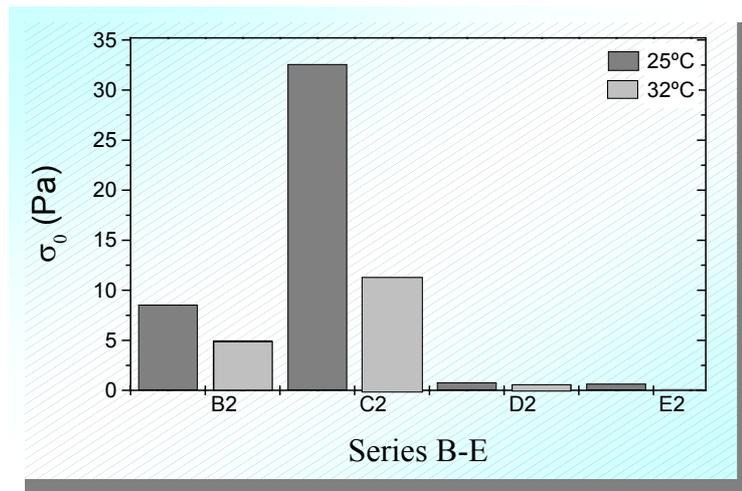


**Figura 53.** Representación comparativa de los reogramas ( $\sigma$  vs  $d\gamma/dt$ ) de las fórmulas *C1*, *D1* y *E1* a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ .

La *serie B* –que contiene Span 80- y la *serie E* –que incluye Olivem 300- muestran una consistencia menor que la *serie A*, en la que no interviene ningún agente tensioactivo.

Por último, la *serie D* es menos viscosa que la *C*; la fórmula *DI*, por ejemplo, a temperatura ambiente y sometida a un esfuerzo de 100 Pa, presenta una viscosidad de 0,163 Pa·s, mientras que *CI*, de 0,429 Pa·s (Figura 53).

Podemos señalar que el agente tensioactivo que produce viscosidades más elevadas debidas a una mayor estructuración interna del sistema y, por tanto, también valores mayores de esfuerzo umbral ( $\sigma_0$ ) es Olivem 900. En cambio, el que da lugar a preparaciones más fluidas es Olivem 300. La Figura 54 muestra la relación proporcional entre el  $\sigma_0$  de las fórmulas que lo presentan frente al tipo de agente tensioactivo empleado para su elaboración –Span 80, para la *serie B* y Olivem 900, 700 y 300, respectivamente, para las *series C-E*.



**Figura 54.** Representación del esfuerzo umbral en relación con el tipo de tensioactivo incluido en las *series B-E*

## II.2.b. OSCILOMETRÍA

Las medidas de viscosimetría alteran la estructura de la muestra por lo que no son indicativas en el estudio de polímeros. Esto hace necesario realizar estudios de tipo oscilométrico.

En oscilometría podemos realizar tres tipos de experimentos:

- Un barrido de esfuerzos, a una frecuencia constante de 1 Hz, para localizar la zona viscoelástica lineal *-ZVL-* y calcular la energía de cohesión de los flóculos.
- Un barrido de frecuencias, a una amplitud de cizalladura constante dentro de la zona viscoelástica lineal, para

obtener la dependencia de  $G'$  y  $G''$  con respecto a la frecuencia.

- Tiempo de gelación, a una frecuencia baja y esfuerzo pequeño constante.

Nos centraremos en los dos primeros puesto que nos resultan de mayor interés. El estudio se ha llevado a cabo teniendo en cuenta las mismas variables que en viscosimetría.

- a) Aplicando un barrido de esfuerzos a frecuencia constante se encuentran zonas viscoelásticas lineales *-ZVL-* en todas las fórmulas excepto en la *serie A*, donde no se aprecian (Figuras 55 y 56)

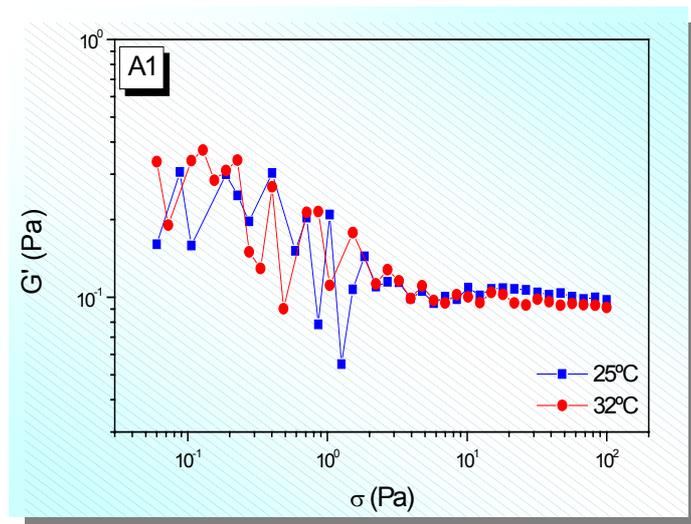
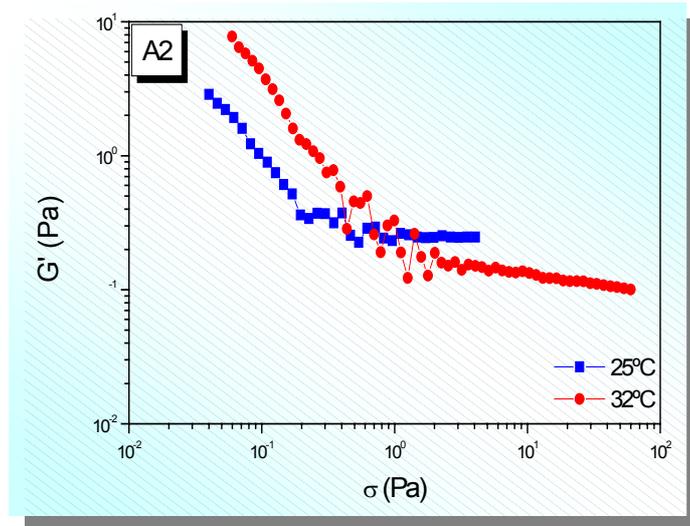
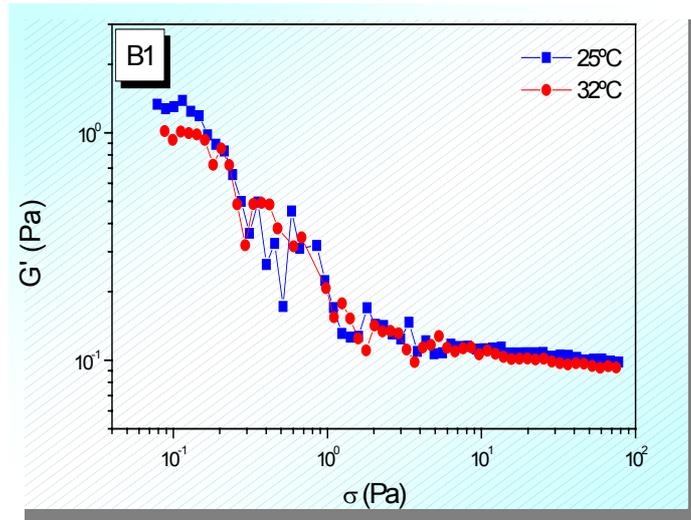


Figura 55. Determinación de la ZVL de la fórmula A1 ( $\nu=1\text{Hz}$ ).

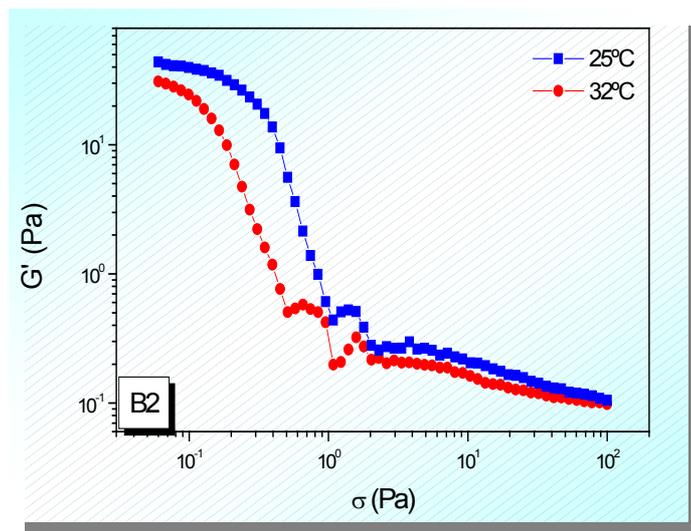


**Figura 56.** Ensayo de oscilometría para la observación de una *ZVL* en la fórmula *A2* (módulo elástico,  $G'$ , vs esfuerzo de cizalladura,  $\sigma$ ) 25° y 32±1°C.

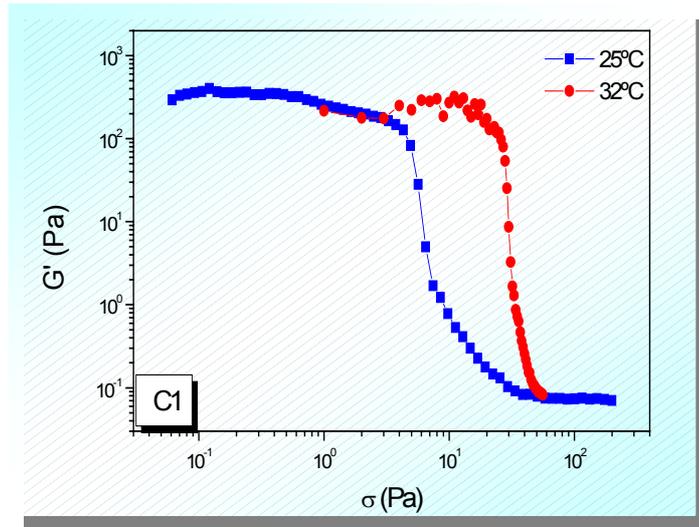
Para pequeños esfuerzos, se observa un comportamiento viscoelástico lineal (Figuras 57 a 64; excepto la figura 63 correspondiente a la fórmula *E1* en que no se aprecia *ZVL*) (Buckin V, 2001); en este intervalo, el módulo elástico ( $G'$ ) es prácticamente independiente del tiempo.  $G'$  permanece más o menos constante hasta un valor de *esfuerzo crítico* y decrece cuando lo sobrepasa. El comportamiento por encima del valor de esfuerzo crítico indica la destrucción de la estructura debida a la gran amplitud del esfuerzo cortante oscilatorio; la estructura tridimensional del gel deja de existir y se forman flóculos aislados.



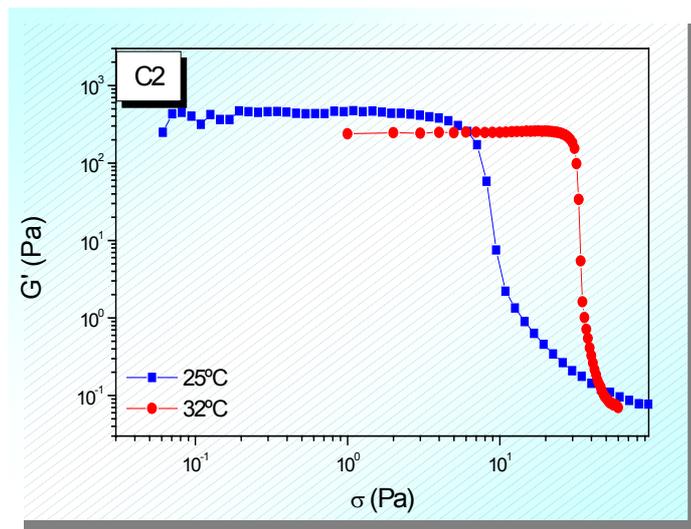
**Figura 57.** Representación de la *ZVL* de la fórmula *B1* (oscilometría a  $\nu = 1$  Hz;  $G'$  frente a  $\sigma$ ) a 25° y 32±1°C.



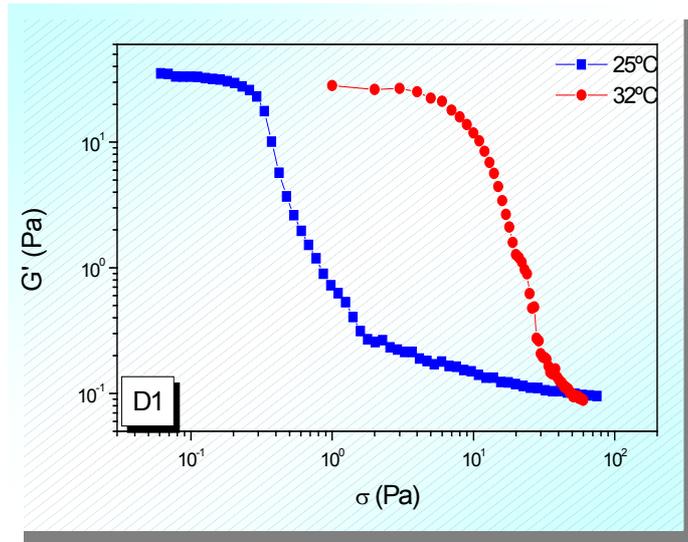
**Figura 58.** Representación de la *ZVL* de la fórmula *B2* (estudio oscilométrico a frecuencia constante de 1 Hz) a 25° y 32±1°C.



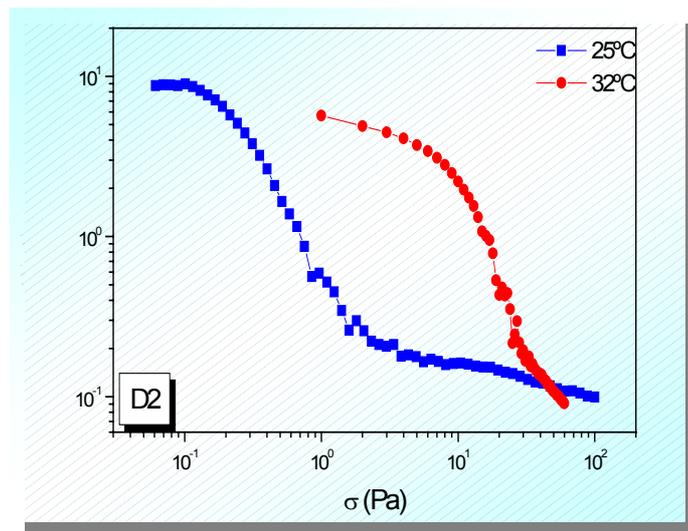
**Figura 59.** Representación de la *ZVL* de la fórmula C1 (oscilometría a frecuencia constante de 1 Hz) a 25° y 32±1°C.



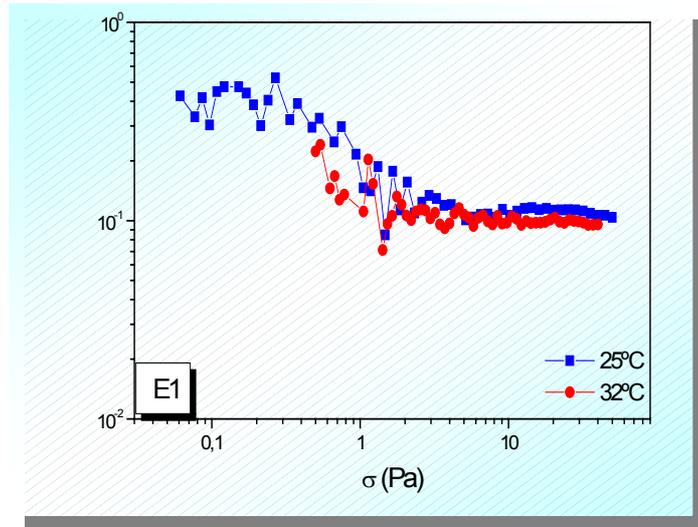
**Figura 60.** Representación de la *ZVL* de la muestra C2; ensayo de oscilometría a 1 Hz ( $G'$  vs  $\sigma$ ) a 25° y 32±1°C.



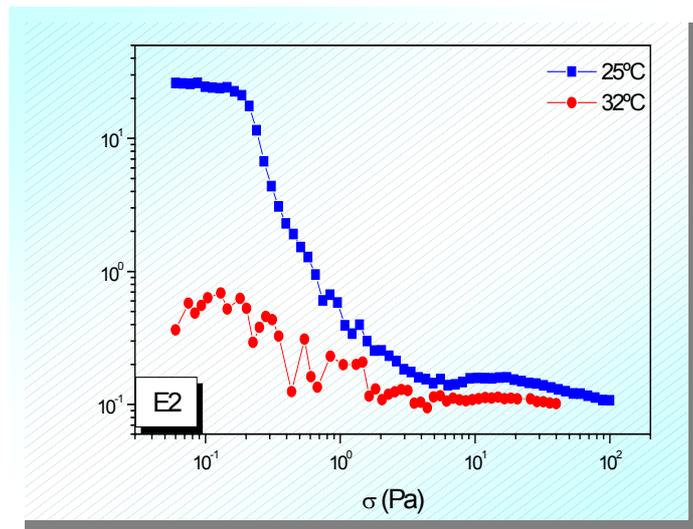
**Figura 61.** Representación de la *ZVL* de la muestra *D1*; ensayo de oscilometría a 1 Hz ( $G'$  vs  $\sigma$ ) a 25° y 32±1°C.



**Figura 62.** Representación de la *ZVL* de la fórmula *D2*. Ensayo de oscilometría; frecuencia= 1 Hz (25 y 32±1°C).



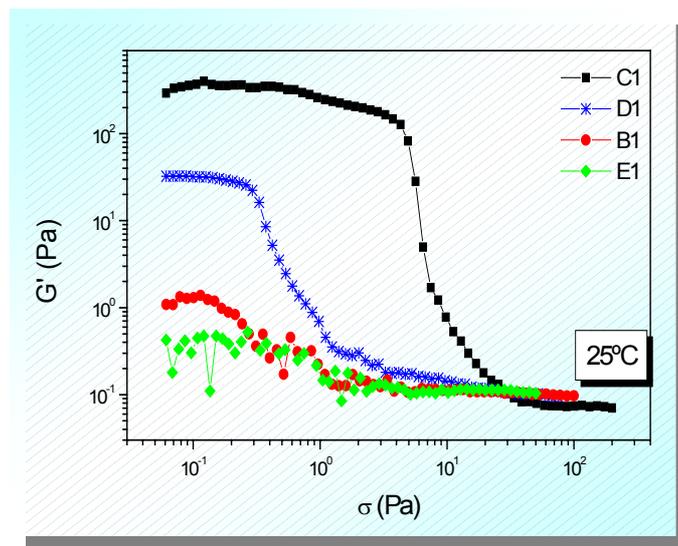
**Figura 63.** Ensayo de oscilometría (frecuencia= 1 Hz; 25 y 32±1°C) de la fórmula E1. No se aprecia ZVL.



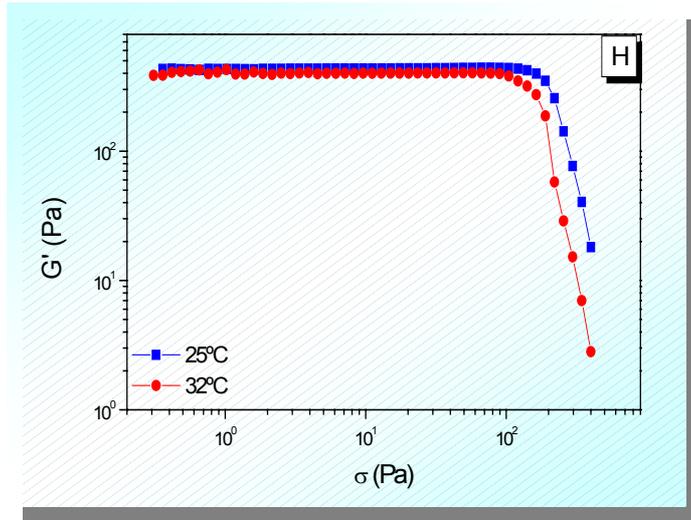
**Figura 64.** Representación de la ZVL de la fórmula E2. Ensayo de oscilometría; frecuencia= 1 Hz (25 y 32±1°C).

Para todas las fórmulas, el valor de  $G'$  es mayor a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  que a  $32\pm 1^\circ\text{C}$ . Estos datos contribuyen a la afirmación de que la estructuración o viscosidad es menor conforme aumenta la temperatura.

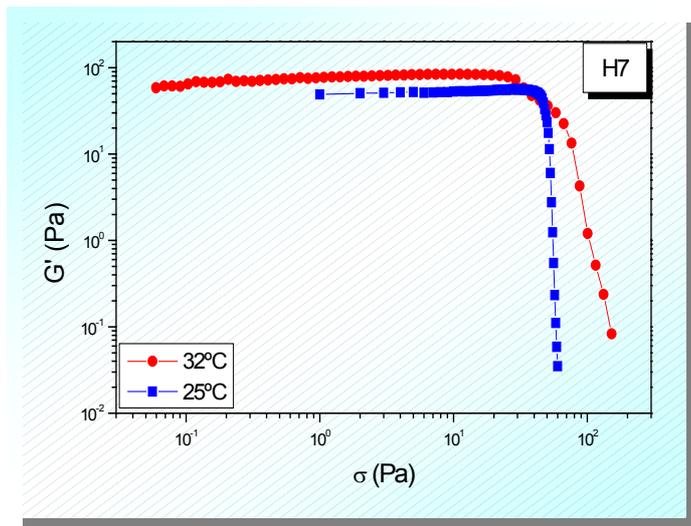
La fórmula que presenta el valor más elevado de módulo elástico es **C2**. Esto se traduce en un nivel de estructuración interna mayor, que confirma los resultados obtenidos en los estudios de viscosimetría (Figura 60). Asimismo, en la Figura 65 se observa la relación que también era de esperar entre las *series B, C, D* y *E* con respecto al parámetro  $G'$ .



**Figura 65.** Oscilograma comparativo de las series de fórmulas tipo 1 – con 3% de agente gelificante- a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ .



**Figura 66.** Oscilograma ( $G'$  frente a  $\sigma$ , a  $\nu=1$  Hz) de la muestra  $H$  ( $25^\circ$  y  $32\pm 1^\circ\text{C}$ ).



**Figura 67.** Oscilograma ( $G'$  frente a  $\sigma$ , a  $\nu=1$  Hz) de la muestra  $H7$  ( $25^\circ$  y  $32\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Las figuras anteriores (Figuras 66 y 67) muestran los oscilogramas de  $H$  y  $H7$  en los que se aprecian las  $ZVL$  a las temperaturas estudiadas

La Tabla 11 presenta los valores de esfuerzo crítico de cada una de las fórmulas a partir del cual la estructura interna del gel queda destruida por la amplitud del esfuerzo aplicado.

<b><i>Fórmulas</i></b>	<b><math>\sigma_c</math> (Pa)</b>	
	<b>25°C</b>	<b>32°C</b>
<b><i>A1</i></b>	No <i>ZVL</i>	No <i>ZVL</i>
<b><i>A2</i></b>	No <i>ZVL</i>	No <i>ZVL</i>
<b><i>B1</i></b>	0,275	0,259
<b><i>B2</i></b>	0,509	0,239
<b><i>C1</i></b>	5,652	29,000
<b><i>C2</i></b>	8,189	32,000
<b><i>D1</i></b>	0,373	14,000
<b><i>D2</i></b>	0,401	13,000
<b><i>E1</i></b>	No <i>ZVL</i>	No <i>ZVL</i>
<b><i>E2</i></b>	0,308	0,225
<b><i>H</i></b>	220,240	189,670
<b><i>H7</i></b>	28,053	13,391

**Tabla 11.** Valores de  $\sigma_c$  (Pa) extraídos del estudio de oscilometría a frecuencia constante de 1 Hz de las preparaciones estudiadas a 25° y 32±1°C.

b) La aplicación de un barrido de frecuencias a una amplitud de cizalladura constante dentro de la zona viscoelástica lineal nos permite comparar los módulos  $G'$  –elástico o de *almacenamiento*- y  $G''$  –viscoso o de *pérdidas*- (Gallardo V, 1998; Loren N, 2000).

Todas las preparaciones, como se observa en la Tabla 12, presentan unos valores de  $G'$  mayores que  $G''$  a una frecuencia de 15 Hz, por lo que muestran un comportamiento más parecido al elástico que al viscoso.

	B1	B2	C1	C2	D1	D2	E1	E2
$G'$ (25°)	287	209,73	107,68	166,85	184	66,48	45,84	371,6
$G'$ (32°)	330,82	19,59	22,07	66,10	67,16	271,2	12,04	232,1
$G''$ (25°)	36,901	91,08	60,08	148,98	360	23,10	12,16	341,7
$G''$ (32°)	98,01	7,40	27,1	34,20	33,04	21,31	9,34	29,2

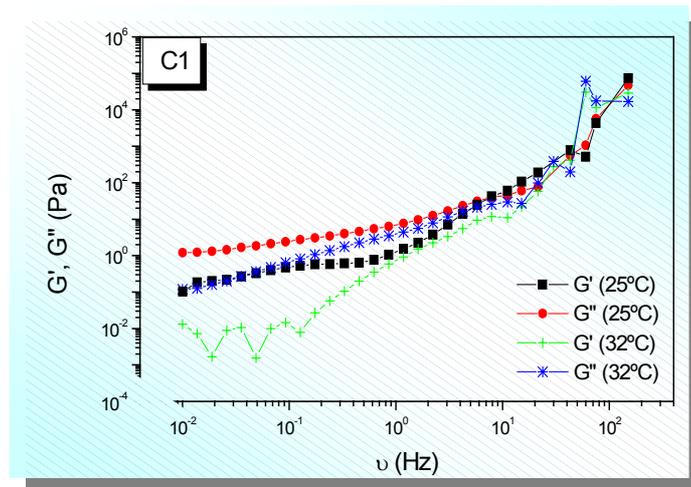
**Tabla 12.** Valores de módulo elástico  $-G'$ - y viscoso  $-G''$ - de las formulaciones en ensayos de oscilometría a 25° y 32±1°C y frecuencia de 15 Hz.

También, en general, se cumple que ambos parámetros  $-G'$  y  $G''$ - tienen valores más elevados a 25±1°C que a 32±1°C. Esto viene a confirmar, de nuevo, la interpretación de los reogramas obtenidos en viscosimetría en cuanto a la consolidación interna de las muestras. Sin embargo, a medidas de frecuencia inferiores a 10 Hz, los valores de  $G'$  se muestran siempre inferiores a  $G''$ , lo que

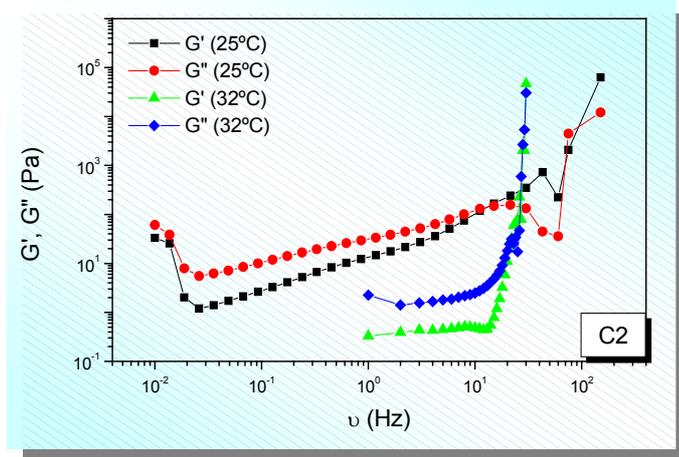
indicaría un comportamiento inverso al descrito; es decir, parecido al viscoso. A continuación se detallan los valores correspondientes a 2 Hz.

	B1	B2	C1	C2	D1	D2	E1	E2
$G'$ (25°)	5.58	8.19	3.75	21.64	1.76	0.59	0.04	6.75
$G'$ (32°)	7.50	3.36	2.26	3.22	46.89	37.04	0.60	2.74
$G''$ (25°)	10.48	18.13	12.49	44.3	5.28	4.33	2.53	7.26
	8.54	8.52	7.88	9.18	15.94	18.29	1.48	4.87

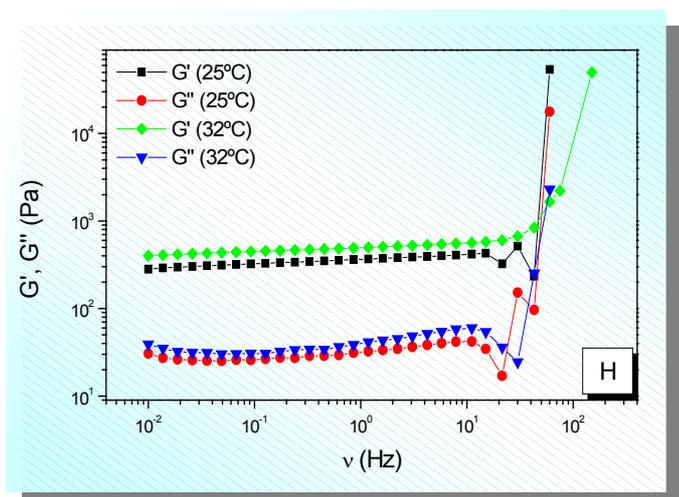
**Tabla 13.** Valores del módulo de almacenamiento  $G'$  y del de pérdidas  $G''$  de las formulaciones obtenidos en ensayos de oscilometría a 25° y 32±1°C y frecuencia de 2 Hz.



**Figura 68.** Oscilograma de C1:  $G'$  y  $G''$  frente al barrido de frecuencias (0,01-100 Hz) a un esfuerzo de cizalladura de 1 Pa a 25° y 32±1°C.

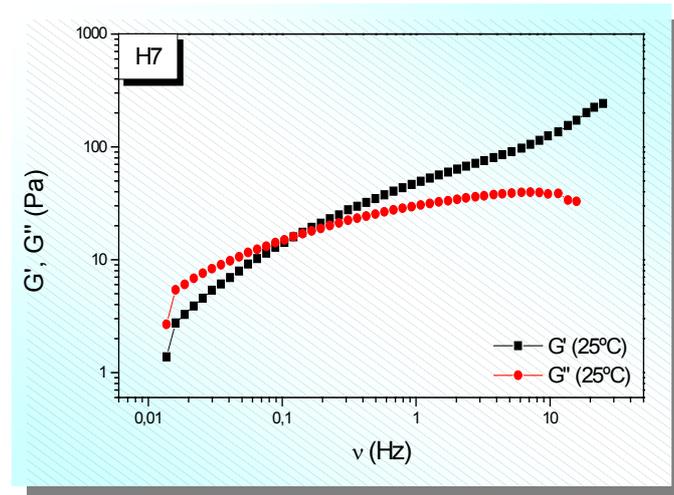


**Figura 69.** Oscilograma de C2:  $G'$  y  $G''$  frente al barrido de frecuencias (0,01-100 Hz) a 1 Pa (25° y 32±1°C).



**Figura 70.** Oscilograma de H:  $G'$  y  $G''$  frente al barrido de frecuencias (0,01-100 Hz) a 1 Pa (25° y 32±1°C).

El oscilograma anterior (Figura 70), correspondiente al análisis de la muestra **H**, manifiesta un comportamiento típicamente elástico propio de los geles de carbopol en el que se puede observar a las temperaturas estudiadas valores más elevados de  $G'$  –módulo elástico- que de  $G''$  -módulo viscoso-. La Figura 71 presenta el reograma oscilométrico de **H7**.



**Figura 71.** Oscilograma de **H7**:  $G'$  y  $G''$  frente al barrido de frecuencias (0,01-100 Hz) a 1 Pa (25° y 32±1°C).

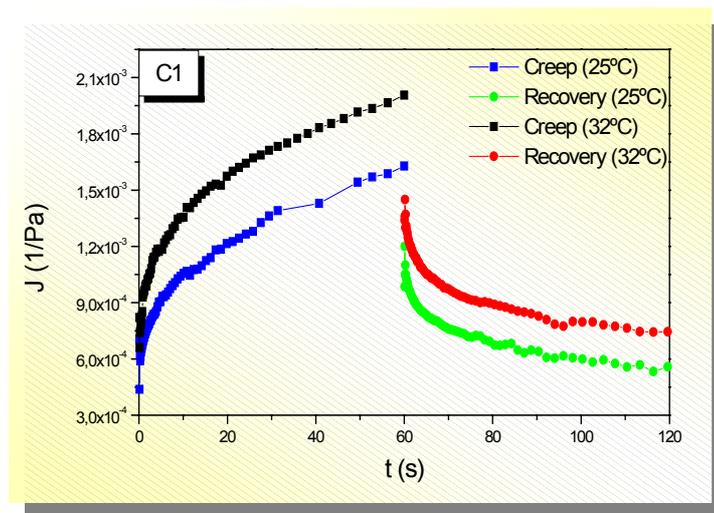
### II.2.c. FLUENCIA-RECUPERACION

Finalmente, se han realizado experimentos de fluencia-recuperación, más conocidos como *creep-recovery* en los que hemos sometido la muestra a un esfuerzo de cizalladura constante durante un tiempo de 60 segundos midiendo el *módulo de creep* ( $J$ ) en ese periodo de tiempo, así como la *recuperación* del sistema cuando el esfuerzo desaparece, durante otros 60 segundos.

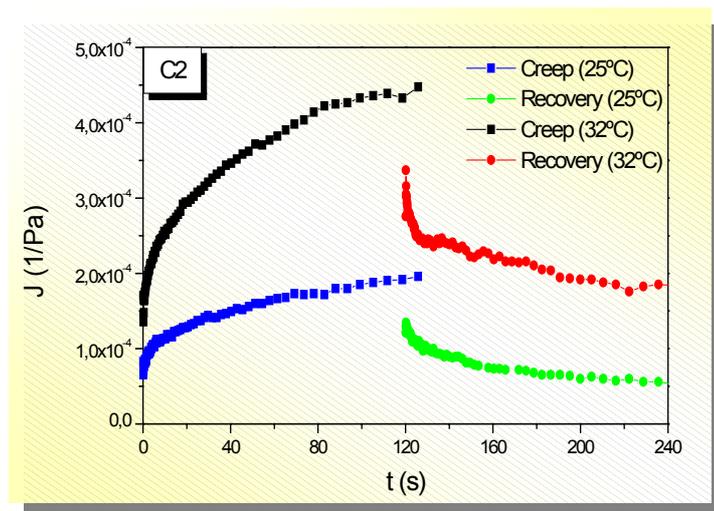
Los resultados de este estudio demuestran, como cabe esperar de la caracterización reológica hasta ahora discutida, que se pueden describir diversos comportamientos:

- Por un lado, aquellas formulaciones que manifiestan cierta recuperación de la estructura interna una vez se interrumpe el esfuerzo cortante aplicado. Citamos en este caso las fórmulas lipogel *C1*, *C2*, *D2* y *E2* e hidrogel *H* y *H7*.

En el análisis del diagrama de *creep-recovery* resulta de interés el parámetro  $J_0$ , que representa la *elasticidad instantánea* del sistema a tiempo 0. El valor de  $J_0$  coincide con la recuperación inicial que tiene lugar en el sistema cuando se elimina el esfuerzo cortante aplicado. Cuanto menor sea el valor de  $J_0$ , más elástico es el sistema. Los valores más elevados indicarán una mayor viscosidad.

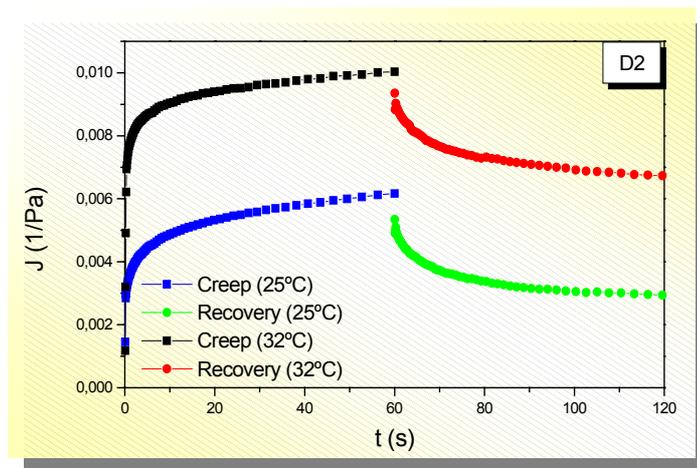


**Figura 72.** Diagrama de *creep-recovery*: Fluencia ( $J$ ) frente al tiempo (s) de la formula C1 a  $25^\circ$  y  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ . Tiempo de *creep*=60 s; tiempo de *recovery*=60 s. Se aplicó un esfuerzo cortante  $\sigma=1$  Pa.

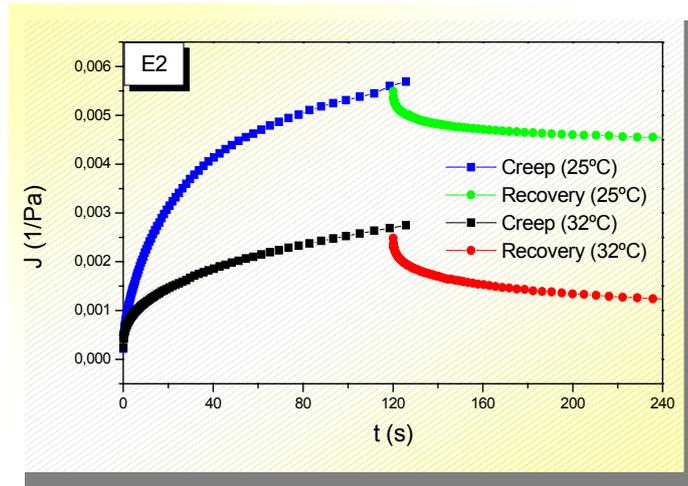


**Figura 73.** Diagrama de *creep-recovery*: Fluencia ( $J$ ) frente al tiempo (s) de la formula C2 a  $25^\circ$  y  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ .

La fórmula **D2**, que en el estudio de viscosimetría presentó un reograma propio de un sistema plástico no ideal, manifiesta en el diagrama de *creep-recovery* cierta capacidad elástica en la recuperación de su estructura (Figura 74). De modo análogo, la muestra **E2** que ha mostrado un reograma de plástico no ideal con un valor de esfuerzo umbral inferior a la muestra **D2**, demuestra cierta elasticidad en la curva de *recovery* (Figura 75). El comportamiento de *fluencia* de **E2** en función de la temperatura es, sin embargo, anómalo con respecto a los restantes lipogeles; en este caso, los valores de dicho parámetro han resultado mayores en el análisis a 25°C que a 32°C mostrando, por tanto, mayor capacidad de fluencia por efecto del esfuerzo aplicado a la temperatura más baja.

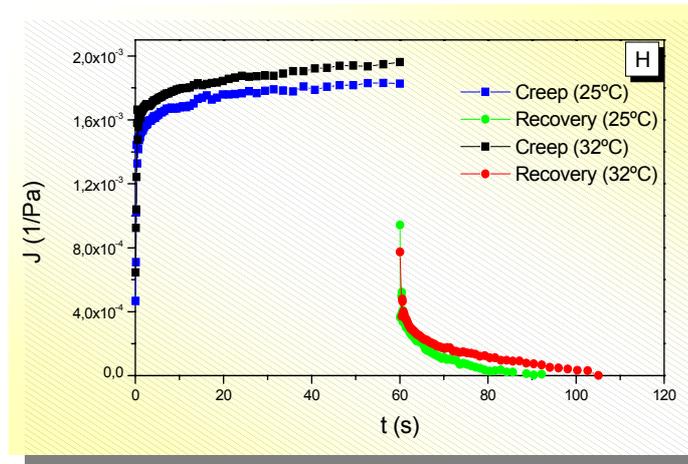


**Figura 74.** Diagrama de *creep-recovery*: Fluencia ( $J$ ) frente al tiempo ( $s$ ) de la fórmula **D2** a 25° y 32±1°C. Tiempo de *creep*=60 s; tiempo de *recovery*=60 s.

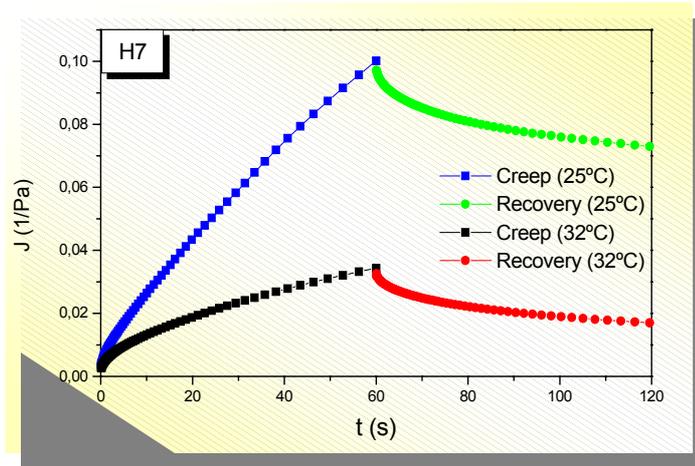


**Figura 75.** Diagrama de *creep-recovery*: Fluencia ( $J$ ) frente al tiempo (s) de la formula  $E2$  a  $25^\circ$  y  $32\pm 1^\circ\text{C}$ . Tiempo de *creep* = 120 s; tiempo de *recovery* = 120 s.

Las curvas de *creep-recovery* de los hidrogeles  $H$  y  $H7$  se representan en las Figuras 76 y 77.



**Figura 76.** Diagrama de *creep-recovery*: Fluencia ( $J$ ) frente al tiempo (s) de la formula  $H$  a  $25^\circ$  y  $32\pm 1^\circ\text{C}$ . Se aplicó un esfuerzo de 5 Pa.



**Figura 77.** Diagrama de *creep-recovery*: Fluencia ( $J$ ) frente al tiempo (s) de la formula *H7* a  $25^\circ$  y  $32\pm 1^\circ\text{C}$ . Se aplicó un esfuerzo de 5 Pa.

El cálculo de  $J_0$  se ha llevado a cabo por observación del valor de la función  $y$  para  $x=0$ , atendiendo a la ecuación matemática que describe el modelo de Kelvin-Voigt generalizado:

$$J(t) = \frac{\gamma(t)}{\sigma} = J_0 + \frac{t}{\eta_0} + \sum_{i=1}^n J_i (1 - e^{-t/\eta_i J_i})$$

según la cual el  $\lim_{t \rightarrow 0} J(t) = J_0$ .

La muestra **C2** (Figura 73) presenta un valor de  $J_0$  igual a  $0,0001 \text{ Pa}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$  mientras que, a  $32^\circ\text{C}$ , aumenta a  $0,0002 \text{ Pa}^{-1}$ . Según el criterio planteado, se podría afirmar que el comportamiento de la muestra es más elástico a temperatura ambiente que a  $32^\circ\text{C}$ . Comparten esta tendencia las muestras **C1**, **C2**, **D2** y **H**. El cálculo de este parámetro para las muestras **E2** y

**H7**, sin embargo, presenta valores inversos; es decir, que a 32°C presentan mayor elasticidad que a 25°C (Tabla 14). En el caso de **H7** este fenómeno se debe a la evaporación del disolvente que tiene lugar por efecto del aumento de la temperatura durante el ensayo. Este incremento del carácter viscoelástico *-solid-like-* se reproducirá, por tanto, al extender la preparación sobre la piel cuya temperatura se aproxima precisamente a 32°C.

Fórmulas	$J_0 (x 10^3)$	
	25°C	32°C
<b>C1</b>	0,64	0,75
<b>C2</b>	0,10	0,20
<b>D2</b>	3,48	7,37
<b>E2</b>	1,08	0,72
<b>H</b>	1,42	1,48
<b>H7</b>	7,95	2,82

**Tabla 14.** Cálculo del parámetro  $J_0$  –elasticidad instantánea- de las fórmulas *C1*, *C2*, *D2*, *E2*, *H* y *H7* a partir de reogramas de *creep-recovery* (25° y 32±1°C).

Además, este tipo de diagrama permite estudiar la **recuperación** alcanzada por el sistema tras eliminar el esfuerzo:  $\delta J$ . En la materia que nos ocupa -aplicación tópica de preparaciones cosméticas y medicamentosas-, este parámetro puede ayudar a prever la aplicabilidad y aceptabilidad de dichos preparados ya que,

una vez extendidos sobre la piel, interesa que recuperen, al menos parcialmente, su estructuración interna de forma que queden retenidos sobre la superficie cutánea. Cuanto más elevado sea el valor de  $\delta J$ , más elástico será el sistema y viceversa; es decir, los valores bajos serán indicativos de un mayor carácter viscoso.

El cálculo matemático de  $\delta J$  se puede llevar a cabo según la ecuación:

$$\delta J = \frac{J(60s) - J(120s)}{J(60s)} \times 100$$

La Tabla 15 muestra los valores obtenidos del análisis de  $\delta J$  para las fórmulas anteriores a las temperaturas de 25° y 32±1°C

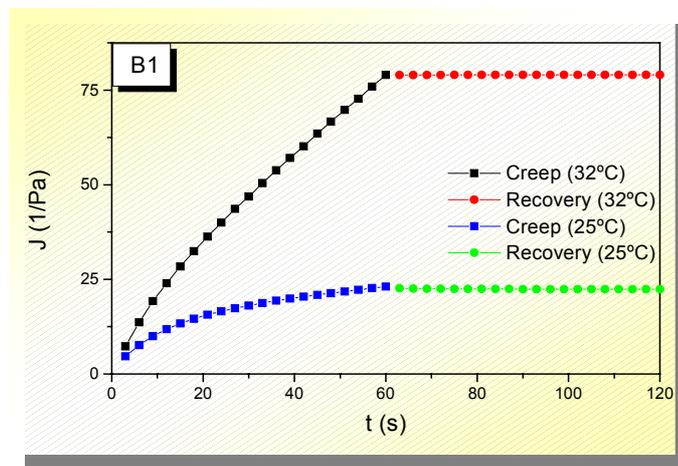
<i>Temperatura</i> (°C)	<i>δJ (%)</i>					
	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>D2</b>	<b>E2</b>	<b>H</b>	<b>H7</b>
<b>25°</b>	65,740	71,428	52,304	12,721	495,429	24,498
<b>32°</b>	62,907	57,230	32,915	53,852	98,371	50,575

**Tabla 15.** Valores de recuperación del sistema ( $\delta J$ ) obtenidos en el estudio de *creep-recovery* de las fórmulas *C1*, *C2*, *D2*, *E2*, *H* y *H7* (25° y 32±1°C).

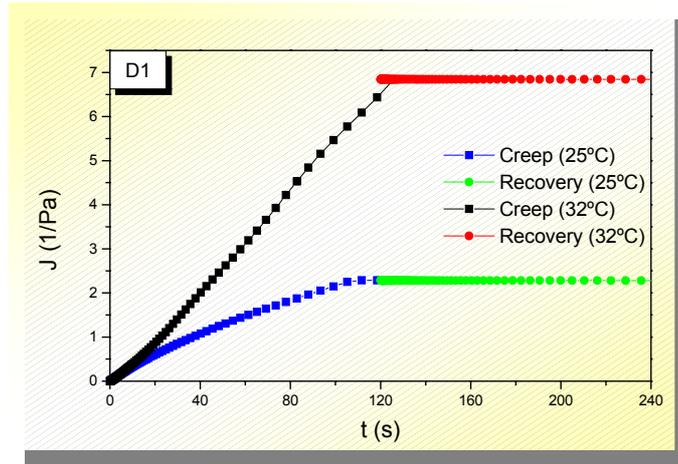
Los resultados indicados en la tabla anterior sólo sirven para la comparación de las formulaciones *C1*, *D2*, *H* y *H7* entre sí, o bien, para *C2* y *E2* debido a que el tiempo experimental asignado en el ensayo de *creep-recovery* fue, en un caso, de 60 s para cada tramo

y, en otro, de 120 s. Esta diferencia en el tiempo de aplicación del esfuerzo durante el *creep* afecta al comportamiento de las muestras en la curva de *recovery* dado el intenso carácter tixotrópico que han manifestado las preparaciones en ensayos anteriores y la elevada sensibilidad de esta técnica analítica.

- Hay, en cambio, preparaciones como **B1** y **D1** (Figuras 78 y 79, respectivamente) que han manifestado un comportamiento viscoso consistente con los resultados de viscosimetría, en que se presentaban como sistemas pseudoplásticos fluidificantes.



**Figura 78.** Diagrama de *creep-recovery*: Fluencia ( $J$ ) frente al tiempo ( $s$ ) de la formula **B1** a  $25^\circ$  y  $32\pm 1^\circ\text{C}$ . Tiempo de *creep* =60 s; tiempo de *recovery* =60 s.



**Figura 79.** Diagrama de *creep-recovery*: Fluencia ( $J$ ) frente al tiempo (s) de la fórmula *BI* a  $25^\circ$  y  $32\pm 1^\circ\text{C}$ . Tiempo de *creep* =120 s; tiempo de *recovery* =120 s.

La respuesta de las muestras frente a la variación de temperatura es uniforme con valores de módulo de *creep* ( $J$ ) más elevados a  $32^\circ$  que a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , exceptuando las situaciones ya discutidas anteriormente correspondientes a la fórmula *H7*, con valores de  $J$  más elevados a  $25^\circ\text{C}$  debidos al fenómeno de evaporación del disolvente producido por el calentamiento de la muestra, y los que han resultado del análisis de *E2*.

No se ha realizado esta experiencia a la *serie A* debido a que no presenta *ZVL* que asegure el mantenimiento de la estructura interna del sistema y, por tanto, la fiabilidad de los resultados que se obtengan.

### **II.3. SELECCIÓN DE FORMULACIONES COMO VEHÍCULOS**

La caracterización organoléptica y reológica de las preparaciones oleosas así como de los hidrogeles ha orientado la selección de los mismos como vehículos adecuados para la incorporación de un activo cosmético –AcVE- y de un fármaco antiinflamatorio para administración tópica –Mx-. En particular, el conocimiento de algunos parámetros reológicos ha servido como criterio discriminatorio por su repercusión directa sobre la extensibilidad, estabilidad y consistencia de las preparaciones tales como la viscosidad aparente a determinadas velocidades de deformación, la tixotropía de los geles, el carácter elástico o viscoso de las muestras, etc.

#### **II.3.a. SELECCIÓN DE LIPOGELES**

Los *Lipogeles D1* y *C1*, elaborados con un 3% de etilcelulosa y un 5% de agente tensioactivo Olivem -700 y 900, respectivamente- en cantidad suficiente de aceite de oliva han manifestado las mejores características **organolépticas** tanto por su homogeneidad y textura como por su extensibilidad y adherencia a la superficie donde sean extendidos – cfr. Anexo II-. Los hemos denominado a partir de este momento a lo largo del estudio de liberación, cesión y permeación de sendos activos: *Lipogel 1* a la fórmula *D1* y *Lipogel 2*, a la *C1*.

El estudio **reológico** de las preparaciones confirma esta selección mostrándolas idóneas por su comportamiento viscoelástico. La fórmula *D1 -Lipogel 1-* se ha caracterizado por un comportamiento pseudoplástico fluidificante mientras que la fórmula *C1 -Lipogel 2-* ha manifestado un comportamiento plástico. La presencia de cierto carácter plástico en ambas formulaciones facilita el envasado y dosificación de las mismas ya que ambas presentan en estado de reposo una cierta consistencia que, al ser sometida a un esfuerzo de aplicación sobre la piel, disminuye fluyendo con facilidad y permitiendo, por tanto, la extensión de las mismas.

Ambas presentaron un intenso carácter tixotrópico –considerando el cálculo del área de histéresis- que aconsejó la renovación de la muestra en cada réplica de los ensayos reológicos.

Por otra parte, el estudio de oscilometría ha manifestado cierto carácter elástico a determinados valores de frecuencia que ha sido confirmado por el estudio de los diagramas de *creep-recovery* así como por el cálculo de los parámetros: elasticidad instantánea a tiempo 0,  $J_0$  y recuperación alcanzada por el sistema tras eliminar el esfuerzo,  $\delta J$ . Esta propiedad –elasticidad-, en principio, es adecuada para la administración tópica ya que, una vez extendidas, al eliminar el esfuerzo aplicado, las preparaciones tienden a recuperar parcialmente su forma favoreciendo la retención del producto sobre la zona aplicada. Sin embargo, el carácter elástico no se manifiesta en estas muestras tras la aplicación de valores de

esfuerzo superiores al esfuerzo umbral –en el caso del *Lipogel 2*- o valores de esfuerzo elevados –*Lipogel 1*- ya que, en estas condiciones, ambos preparados experimentan una desestructuración progresiva del sistema que, como se comentó al describir las condiciones previas al análisis reológico, se denomina tixotropía. Esto es, que cuando son sometidas a tales esfuerzos de deformación, las muestras se debilitan internamente de tal forma que tardan incluso horas en recuperar el estado de consistencia original. Por tanto, como la administración tópica supone la aplicación de esfuerzos de cizalladura elevados alcanzando velocidades de deformación ( $d\gamma/dt$ ) comprendidas en el intervalo  $10^4$ - $10^5$  s<sup>-1</sup> (Barnes HA, 1989), al ser extendidas sobre la piel, no manifestarán la capacidad de recuperación de su consistencia que es observable tras la aplicación de valores bajos de esfuerzo.

En cualquier caso, la aplicación tópica de ambas formulaciones es fácil y agradable; es decir, poseen cierta cualidad cosmética que, asociada al beneficio que aporta a la piel el elevado contenido en ácido oleico y otros compuestos propios del aceite de oliva, se presentan como preparaciones dermocompatibles susceptibles de la inclusión de meloxicam para una terapia tópica local, o bien, de AcVE para uso cosmético.

### **II.3.b. SELECCIÓN DE HIDROGELES**

La caracterización reológica de los hidrogeles ha sido, a diferencia de la de los lipogeles, un estudio *a posteriori*. En este caso, una vez elaborada la serie de geles hidrofílicos de AcVE, se procedió al ensayo de liberación del activo en dispositivo de difusión sin membrana. La fórmula que presentó el perfil cinético de liberación más adecuado fue, después, sometida al estudio reológico. Esta fórmula de elección se trata del hidrogel de AcVE elaborado con Tween 80 –**Hidrogel 3**- que, así como el **Hidrogel 4**, presentaron las mejores características organolépticas – consistencia, extensibilidad y color-.

Debido a que el componente mayoritario de la formulación citada es el gel de Carbopol<sup>®</sup>, se ensayó en el reómetro el propio vehículo – denominado Hidrogel **H**- que lo ha sido también de meloxicam manifestando un comportamiento plástico y un valor de esfuerzo umbral ( $\sigma_0$ ) que se considera indicativo de texturas demasiado rígidas, difíciles de extender sobre la piel. Tanto los ensayos de oscilometría como los de *creep-recovery* indicaron cierto carácter elástico en las muestras.

El Hidrogel 7 –**H7**- de AcVE, formulado para llevar a cabo el ensayo de permeación, presenta una textura y aspecto adecuados para su uso tópico y ha sido también caracterizado reológicamente. De modo análogo, se ha clasificado como plástico y presentó, asimismo, propiedades elásticas tanto en los oscilogramas como en las curvas de *creep-recovery*.

## **II.4. CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE MELOXICAM**

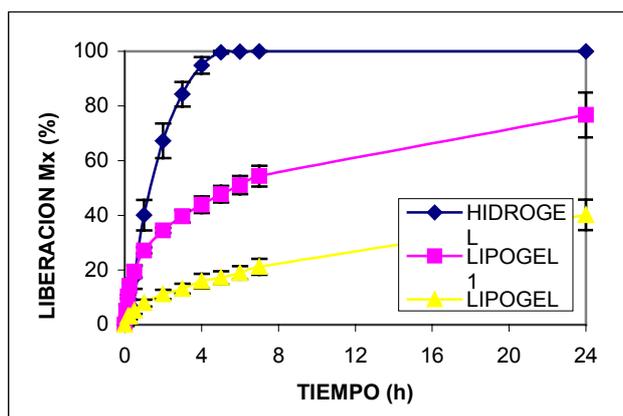
### **II.4.a. ENSAYO DE LIBERACIÓN EN DISPOSITIVO DE DIFUSIÓN SIN MEMBRANA**

Se llevaron a cabo ensayos de liberación en dispositivo de difusión sin membrana, de fundamento teórico análogo al del dispositivo de paleta sobre membrana para ensayos de disolución de la USP (USP 23/NF 18, 1995), como método de selección de las formulaciones que se someterían, después, al ensayo de cesión y permeación en celdas de Franz –tanto en el caso de las preparaciones medicamentosas como de las cosméticas-.

Los resultados del estudio de liberación de las formulaciones de Mx indican un perfil cinético correspondiente al ***Hidrogel*** notablemente superior al de las formulaciones oleosas. Considerando como parámetro puntual modelo-independiente la concentración de fármaco presente en el medio receptor transcurrida una hora desde el inicio del experimento, podemos citar que la formulación hidrofílica de meloxicam dio lugar a una concentración de  $12,69 \pm 1,71 \mu\text{g/ml}$  mientras que las preparaciones oleosas liberaron cantidades inferiores alcanzándose una concentración a  $t=1\text{h}$  de  $8,30 \pm 0,34 \mu\text{g/ml}$  y  $2,81 \pm 0,97 \mu\text{g/ml}$  en los ensayos del ***Lipogel 1*** y ***Lipogel 2***, respectivamente.

La Figura 80 muestra la liberación (%) de las fórmulas ensayadas en la que se evidencia un porcentaje de liberación de meloxicam superior a partir del hidrogel que de los lipogeles. Este comportamiento puede

deberse a la mayor afinidad del vehículo hidrofílico –que contiene el fármaco en solución- por el medio acuoso receptor con el que está en contacto directo en este experimento de difusión sin membrana. Las fórmulas oleosas, en cambio, por su naturaleza hidrofóbica presentan cierta resistencia a la cesión del fármaco –contenido en suspensión- a la solución receptora.



**Figura 80.** Perfil de liberación de meloxicam (%) frente al tiempo. Cada punto indica la media  $\pm$  desviación estándar.

Se han determinado los parámetros modelo-independientes (programa informático Excel 2000): Eficiencia de disolución ( $EF$ ), que se calcula a partir de las curvas acumulativas de fármaco disuelto y Tiempo medio de residencia o de disolución ( $MDT$ ), según las expresiones matemáticas siguientes:

$$EF(\%) = \frac{AUC_0^T}{Q_{100} \cdot T} \cdot 100$$

$$MDT = \frac{\sum[(t_i) \cdot \Delta Q_i]}{Q_\infty}$$

En la Tabla 16 se presentan los resultados de los parámetros citados correspondientes a las tres formulaciones estudiadas.

	EFICIENCIA (%)		MDT	
	MEDIA	D.E.	MEDIA	D.E.
<b>HIDROGEL</b>	6,809	0,819	0,078	0,007
<b>LIPOGEL 1</b>	4,433	0,279	0,032	0,001
<b>LIPOGEL 2</b>	1,743	1,713	0,016	0,014

**Tabla 16.** Parámetros modelo-independientes –Eficiencia ( $EF$ , %) y Tiempo medio de permanencia ( $MDT$ , h)- calculados para las formulaciones hidro y lipofílicas.

Según los resultados expuestos, el valor más elevado de Eficiencia de disolución corresponde a la fórmula hidrofílica. Por otra parte, el tiempo medio de residencia del fármaco en estado sólido fue menor para el *Lipogel 2*.

El ajuste cinético de los perfiles de las cantidades liberadas corregidas en función del tiempo se ha llevado a cabo atendiendo al criterio de información de Akaike ( $AIC$ ) –cuya ecuación matemática se

muestra a continuación- según el cual el menor valor de  $AIC$  corresponde a la ecuación cinética que mejor se adapta a los resultados.

$$AIC = n \cdot \ln SSQ + 2p$$

La Tabla 17 muestra los valores de  $AIC$  correspondientes al ajuste cinético de las tres preparaciones en estudio.

	AIC							
	Orden uno		Raíz cuadrada		Raíz cúbica		Orden cero	
	MEDIA	D.E.	MEDIA	D.E.	MEDIA	D.E.	MEDIA	D.E.
<b>HIDRO</b>	95,548	3,003	222,437	0,641	94,964	1,498	220,448	0,390
<b>LIPO 1</b>	110,552	0,827	206,276	1,729	94,135	3,548	217,560	0,187
<b>LIPO 2</b>	98,118	2,727	184,553	3,051	125,875	4,258	221,793	0,741

**Tabla 17.** Valores del  $AIC$  obtenidos del estudio estadístico de los residuales del perfil de cantidades acumuladas de fármaco en el tiempo en ensayo de liberación.

Los valores del  $AIC$  obtenidos del ajuste cinético de liberación de meloxicam a partir del **Hidrogel** aparentemente indican la posibilidad de cesión según una ecuación de *orden uno* o bien de *raíz cúbica* ya que los resultados de dicho criterio no presentan diferencias significativas.

De esta forma, la cinética de liberación de la fórmula hidrofílica se ajustaría a la de *orden uno* según la siguiente ecuación:

$$\ln(Q_{\infty} - Q) = 5,3921 - 0,5669 \cdot t$$

O bien, a una ecuación de raíz cúbica con los siguientes términos:

$$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = -1,1246 + 4,0488 \cdot \sqrt{t}$$

Por otra parte, el análisis estadístico de los valores de *AIC* correspondientes al ajuste cinético de liberación del **Lipogel 1** indica que el mejor ajuste del perfil de liberación es según una cinética de *raíz cúbica*:

$$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = 0,7265 + 0,4941 \cdot \sqrt{t}$$

El **Lipogel 2**, como se deduce de los valores de *AIC* de la tabla anterior, se adapta también a una cinética de *orden uno*:

$$\ln(Q_{\infty} - Q) = 4,2697 - 0,4428 \cdot t$$

Por lo general, las formas farmacéuticas semisólidas se ajustan a cinéticas de raíz cuadrada, por aplicación de la ecuación de Higuchi, en cualquiera de las dos situaciones que cabría considerar: que la mayor parte del fármaco se encuentre en suspensión, o bien, cuando una parte significativa de la dosis se halle disuelta en el excipiente. Es menos frecuente, en cambio, que se comporten según una cinética de orden uno o de raíz cúbica.

#### **II.4.b. ENSAYO DE CESIÓN DE MELOXICAM EN CELDAS DE DIFUSIÓN DE FRANZ**

Las investigaciones en absorción transdérmica de fármacos (Carafa M, 2002) requieren el empleo de dispositivos donde se verifique la liberación y absorción *in vitro* del principio activo tales como las celdas de Franz (Franz TJ, 1978) así como de un método analítico capaz de cuantificar tanto el fármaco liberado como el acumulado en los distintos estratos de la piel y el que alcanza la microcirculación dérmica. Los primeros ensayos –de cesión- se llevan a cabo empleando membranas artificiales mientras que, los segundos, -de permeación- requieren el empleo de membranas naturales como la piel humana (Smith JC, 2000) o animal dermatomizada (Santoyo S, 1996).

Las propiedades físico-químicas tanto del vehículo como de la droga ejercen una notable influencia en la velocidad de liberación del fármaco desde una preparación de administración tópica. De hecho, el perfil cinético de liberación está determinado por las interacciones vehículo-fármaco. La absorción transdérmica de fármacos administrados por vía tópica depende tanto de la velocidad de cesión como de la permeabilidad de tales moléculas a través de la piel.

En este apartado se ha estudiado la capacidad de cesión de meloxicam, fármaco de acción antiinflamatoria (Bravesh Dasandi, 2002; Del Río RM, 2000; Luger P, 1996; Turck D, 1995) a partir de diversos

geles –hidrofílicos, de Carbopol<sup>®</sup> (Boylan JC, 1988; Pena L, 1990) y lipogeles (Aiache JM, 1992; Fukasawa J, 1989) elaborados a base de aceite de oliva-. Como paso previo a los ensayos de cesión en celdas de Franz se llevó a cabo un estudio de selección de membrana artificial con objeto de emplear la que resulte más adecuada; es decir, aquella que facilite más la difusión del principio activo.

El objetivo de esta investigación, en definitiva, ha sido estudiar la posibilidad de seleccionar un gel –hidro y/o lipofílico- que presente características organolépticas y reológicas idóneas para su administración tópica (Welin-Berger K, 2001; Ruiz MA, 2003) –es decir, con extensibilidad y textura adecuadas- que, además, permita la máxima velocidad de liberación del principio activo con objeto de no constituir un factor limitativo de la posterior absorción transdérmica (Auner BG, 2004; Valenta C, 2004). En sentido inverso, también podríamos decir que, además de optimizar el vehículo de aplicación tópica para maximizar la biodisponibilidad del fármaco, es también importante asegurarse de que la formulación sea estéticamente aceptable para el paciente, fácil de usar y que se adhiera al área tratada el tiempo requerido (Ruiz MA, 2004).

#### **II.4.b.1. SELECCIÓN DE MEMBRANA**

Se ha llevado a cabo un estudio de selección de membrana previo a la realización de los ensayos de cesión de fármaco a partir de las formulaciones de uso tópico para comparar los perfiles de difusión de una solución de meloxicam.

La solución de meloxicam para el compartimento donador se preparó disolviendo el fármaco en una cantidad apropiada de solución tampón de fosfatos pH 5,6 (500 µg/ml). Se realizaron los ensayos con dos tipos de membranas artificiales de naturaleza hidrofílica comúnmente usadas en dispositivos de difusión de Franz: MF<sup>TM</sup> 0,45 µm HA –éster de celulosa- y Durapore<sup>®</sup> 0,45 µm HV, ambas suministradas por Millipore<sup>®</sup>.

Las membranas sintéticas se mantuvieron inmersas en la solución tampón durante 24 h previas al montaje de las celdas de difusión. El compartimento receptor tiene una capacidad de 17±0,1 ml. Se tuvo especial cuidado de evitar la presencia de burbujas de aire que impidieran el contacto entre la membrana y la solución receptora. Se colocaron 1,5 ml de solución de meloxicam (500 µg/ml) en el compartimento donador cubriendo la superficie de la membrana. El dispositivo se mantuvo a 32±1°C con agitación magnética continua. Se analizó el contenido en meloxicam de las muestras mediante espectrofotometría UV (Perkin Elmer, lambda 40; véase Anexo IV) a la longitud de onda de máxima absorción del analito,  $\lambda = 362$  nm.

La liberación del fármaco a través de sendas membranas se produjo rápidamente alcanzando una meseta o *plateau* de liberación máxima. En la Tabla 18 se representan los valores de liberación obtenidos con el empleo de la membrana de tipo Durapore<sup>®</sup> 0,45 µm HV y, en la Tabla 19, los correspondientes a la difusión a través de membrana MF<sup>TM</sup> 0,45 µm, HA.

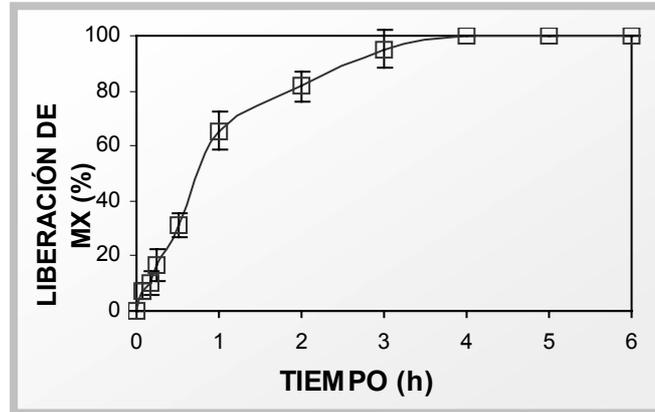
Tiempo (h)	Concentración de meloxicam ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4
0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,083	1,41	2,76	6,30	4,69
0,17	2,50	6,30	3,85	8,66
0,25	5,79	7,14	9,50	13,80
0,50	7,90	16,66	17,42	21,30
1,00	26,52	34,70	38,66	42,96
2,00	36,47	45,40	47,51	51,72
3,00	40,17	53,15	55,01	60,65
4,00	40,34	60,00	60,00	60,00
5,00	40,51	60,00	60,00	60,00
6,00	40,50	60,00	60,00	60,00

**Tabla 18.** Concentración de fármaco ( $\mu\text{g/ml}$ ) liberado al compartimento receptor empleando una membrana de tipo Durapore<sup>®</sup> 0,45  $\mu\text{m}$  HV.

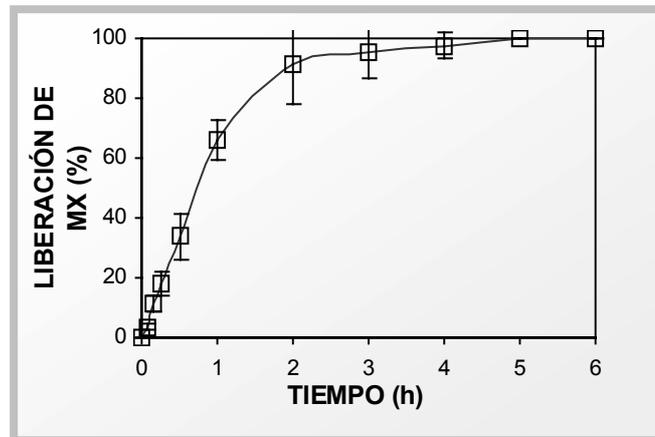
Tiempo (h)	Concentración de meloxicam ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4
0	0	0,00	0,00	0,00
0,083	1,58	2,67	1,91	2,09
0,17	5,03	8,07	7,48	6,40
0,25	8,07	12,03	12,11	12,11
0,50	15,48	24,25	21,30	22,24
1,00	41,69	40,68	34,61	36,67
2,00	51,21	63,52	48,60	48,60
3,00	50,71	60,00	60,00	58,00
4,00	54,67	60,00	60,00	60,00
5,00	59,31	60,00	60,00	60,00
6,00	60,00	60,00	60,00	60,00

**Tabla 19.** Valores de concentración de fármaco ( $\mu\text{g/ml}$ ) liberado al compartimento receptor empleando una membrana artificial de tipo MF<sup>TM</sup> 0,45  $\mu\text{m}$  HA.

Los mejores perfiles de liberación se obtuvieron en los ensayos con filtro de membrana celulósico MF<sup>TM</sup> tal como se observa en las Figuras 81 y 82 que representan el porcentaje de fármaco cedido al medio receptor en función de los tiempos de toma de muestra con el empleo de membrana Durapore<sup>®</sup> y MF<sup>TM</sup>, respectivamente.



**Figura 81.** Porcentaje de liberación de meloxicam desde una solución (500 µg/ml) empleando membrana Durapore<sup>®</sup> en celdas de difusión de Franz.



**Figura 82.** Porcentaje de liberación de meloxicam desde una solución (500 µg/ml) empleando membrana MF<sup>TM</sup> en celdas de difusión de Franz.

En Anexo V.1. se detalla el estudio estadístico (ANOVA) ejecutado según el programa Statgraphics v. 5.1 de la cinética de liberación de meloxicam en el ensayo de selección de membrana. Los perfiles de cesión de cada una de las réplicas han dado lugar a un p-valor en la tabla ANOVA inferior a 0,05 por lo que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables *cantidades corregidas* y *tiempo* (logaritmo de las cantidades corregidas frente al tiempo) para un nivel de confianza del 95,0%.

Asimismo, se realizó el análisis comparativo de dos muestras para conocer si existe diferencia estadísticamente significativa en el perfil de fármaco cedido a través de las diversas membranas empleadas en el estudio de selección (Anexo V.2.). Los resultados de esta valoración estadística demuestran que no hay diferencia estadísticamente significativa a un 95,0% entre las medias de las dos variables (empleo de cada una de las membranas en el ensayo de cesión) siendo el p-valor del test F superior a 0,05. A pesar de la semejanza manifestada en el estudio estadístico, el tipo de membrana seleccionada para llevar a cabo el ensayo de cesión de meloxicam desde diversas preparaciones es el *éster de celulosa MF<sup>TM</sup>*, con diámetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , HA y naturaleza hidrofílica por haber presentado valores ligeramente superiores en el perfil de liberación del analito en el estudio ya descrito de selección de membrana.

#### II.4.b.2. ENSAYO DE CESIÓN A PARTIR DE LAS FORMULACIONES

Los ensayos de cesión de las diversas formulaciones se han llevado a cabo en celdas de difusión de Franz empleando membranas artificiales de naturaleza celulósica con objeto de estudiar la influencia que sobre la liberación *in vitro* del activo pueden tener la naturaleza y características reológicas propias de cada vehículo (Realdon N, 1996; Realdon N, 2001; Valenta C, 2004). Se han estudiado los perfiles de cesión en función de la naturaleza físico-química y viscosidad de las formulaciones.

Para el experimento de cesión se han depositado muestras de 0,3 g homogéneamente extendidas sobre cada membrana en el compartimento donador. El medio receptor del fármaco ha sido una solución tampón de fosfatos a pH 5,5 que se ha mantenido en agitación mediante placa magnética durante el tiempo de ensayo para evitar el efecto de saturación bajo la membrana y así asegurar las condiciones *sink*. Las membranas se sumergieron en solución tampón durante 24 horas previas al ensayo. La temperatura de los dos compartimentos se ha aproximado a 32°C gracias a la recirculación de agua procedente de un baño termostatado a través de la doble cámara de cristal de la celda de difusión.

En los tiempos prefijados (5-10-15-30 minutos, 1-2-3-4-5-6 horas) se tomaron del medio receptor alícuotas de 0,5 ml con posterior reposición de medio fresco. Las muestras han sido valoradas espectrofotométricamente (Perkin Elmer, Lambda 40) a la longitud de onda de máxima absorción de meloxicam,  $\lambda_{\text{máx}} = 362 \text{ nm}$ .

Los ensayos de cesión de meloxicam llevados a cabo en celdas de difusión de las tres formulaciones estudiadas nos han permitido conocer los perfiles de liberación del principio activo para relacionarlos con la viscosidad de las preparaciones y la diversa naturaleza hidro/lipídica de dichos vehículos.

El análisis espectrofotométrico de las muestras permitió conocer los correspondientes valores de absorbancia.

Tiempo (h)	Concentración de meloxicam ( $\mu\text{g/n l}$ )			
	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4
0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,083	1,91	2,33	3,51	1,74
0,17	4,27	3,43	3,60	2,84
0,25	3,85	4,36	4,44	3,51
0,50	5,12	7,98	5,45	4,61
1,00	6,80	7,81	8,49	6,72
2,00	11,10	12,28	14,05	11,69
3,00	15,40	15,40	17,59	15,99
4,00	17,08	16,66	19,44	17,76
5,00	17,25	19,44	21,38	19,53
6,00	19,36	19,61	22,56	20,71

**Tabla 20.** Representación de los valores de concentración de fármaco ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el medio receptor en el ensayo de cesión de meloxicam (0,3%) desde *Lipogel I*. Se muestran los resultados de 4 réplicas.

Tiempo (h)	Concentración de meloxicam ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4
0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,083	0,00	0,00	3,51	1,74
0,17	0,00	0,00	3,60	2,84
0,25	0,00	0,23	4,44	3,51
0,50	3,18	3,35	5,45	4,61
1,00	7,56	8,07	8,49	6,72
2,00	11,69	12,78	12,05	11,69
3,00	17,67	17,59	15,49	15,99
4,00	20,03	20,45	19,44	17,76
5,00	22,14	22,22	21,38	19,53
6,00	24,67	24,50	22,56	20,71

**Tabla 21.** Representación de los valores de concentración de fármaco ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el ensayo de cesión de meloxicam (0,3%) desde *Lipogel 2*.

Tiempo (h)	Concentración de meloxicam ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4
0	0,00	0,00	0	0
0,083	0,00	0,65	0,00	0,73
0,17	0,00	1,24	0,00	0,90
0,25	0,00	1,91	1,74	0,73
0,50	0,00	2,00	2,76	1,41
1,00	2,08	2,00	2,92	2,33
2,00	2,42	3,60	4,27	3,18
3,00	6,72	4,19	6,04	4,69
4,00	6,13	6,04	7,73	7,56
5,00	6,13	6,13	9,92	6,80
6,00	9,41	8,82	9,92	8,57

**Tabla 22.** Representación de los valores de concentración de fármaco en el medio receptor en el ensayo de cesión de meloxicam (0,3%) de *gel de Carbopol<sup>®</sup>* en celdas de difusión de Franz. Se indican los resultados de 4 réplicas.

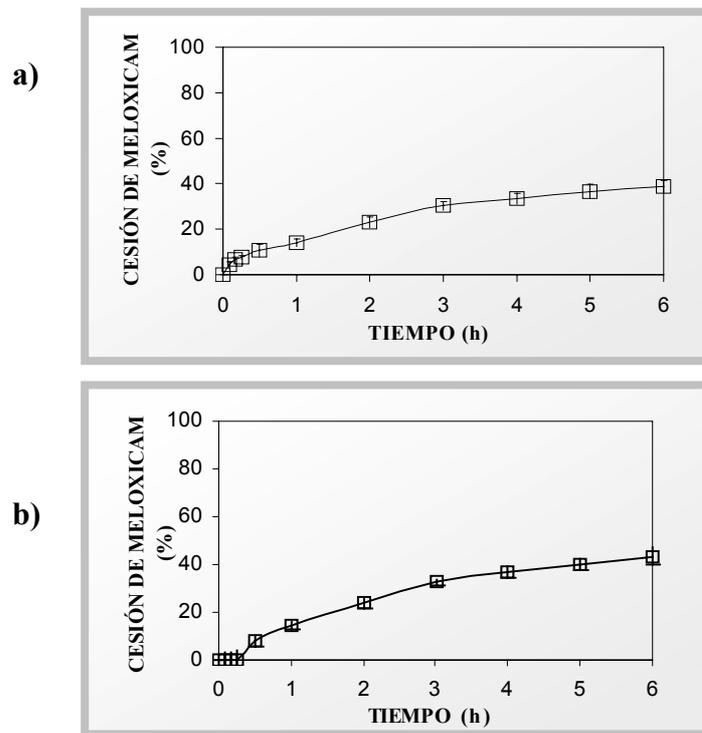
Las Tablas 20-22 muestran los datos de absorbancia convertidos en valores de concentración de fármaco cedido al medio receptor ( $\mu\text{g/ml}$ ) por interpolación en la recta de regresión de meloxicam previamente validada.

Los valores más elevados de concentración de fármaco cedido en el ensayo de difusión con membrana celulósica corresponden a los ensayos de *Lipogel 2* de meloxicam (0,3%). Considerando como parámetro puntual empírico el valor medio de concentración de las muestras en las distintas celdas a las 6h desde el comienzo del ensayo se indica que fue de  $23,11 \mu\text{g/ml}$  con un porcentaje medio de liberación de meloxicam de  $43,49 \pm 3,51\%$ . La naturaleza fuertemente lipofílica del *Lipogel 2* que vehiculiza en suspensión al principio activo en forma de sal hidrosoluble puede justificar la mayor tendencia a la cesión de dicha molécula debido precisamente a la escasa afinidad entre ambos constituyentes del medicamento.

En orden de magnitud, el siguiente perfil de liberación ligeramente inferior al ya descrito corresponde a las muestras de *Lipogel 1* de meloxicam que, al final del ensayo, mostró un valor medio de concentración en el medio receptor de  $20,56 \mu\text{g/ml}$  que, expresado en porcentaje de liberación del activo, corresponde a  $38,72 \pm 2,74\%$  (Figura 83, a).

Las características reológicas de ambas preparaciones oleosas –*Lipogel 1* y *2*- y, concretamente, sus respectivos valores de viscosidad cuando

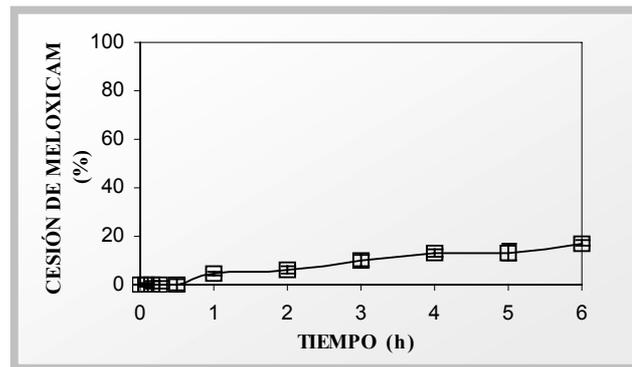
son sometidos a un mismo esfuerzo de deformación bajo las mismas condiciones de experimentación se mostraron superiores para el *Lipogel 2* (Figura 83, b) –según ha descrito nuestro grupo de investigación en trabajos ya citados-. Los resultados del ensayo de cesión resultan contrarios a lo que cabría esperar ya que, según indica la bibliografía consultada, los valores de viscosidad más elevados tienden a dificultar la cesión del fármaco en los ensayos *in vitro* (Realdon N, 2001). Sin embargo, por tratarse el meloxicam de una molécula de tamaño molecular no elevado, su difusión en el vehículo no tiene por qué obedecer a este comportamiento que podríamos llamar reológico-dependiente. Además, en cualquier caso, parece que las características reológicas ejercen una menor influencia en los ensayos de permeación *in vitro* que parece no comprometer la biodisponibilidad del fármaco *in vivo*.



**Figura 83.** Porcentaje de cesión de meloxicam desde *Lipogel 1* (a) y *Lipogel 2* (b) en ensayo de cesión en celdas de Franz con membrana celulósica.

Con respecto al estudio de cesión del *Hidrogel* de meloxicam (0,3%) los valores determinados de concentración en el medio han sido de 9,18  $\mu\text{g/ml}$  como valor promedio al finalizar el ensayo (Figura 84). El correspondiente porcentaje de liberación para este tiempo es de  $14,18 \pm 4,15\%$ .

La afinidad fisico-química vehículo-fármaco justifica la dificultad de cesión de la molécula activa y, por tanto, los menores valores de concentración en el medio receptor. Es decir, que al encontrarse una mayor cantidad de fármaco solubilizado en el excipiente hidrofílico, su actividad termodinámica disminuye y también su liberación.



**Figura 84.** Porcentaje de cesión de meloxicam desde *gel de Carbopol*<sup>®</sup> en ensayo de difusión de Franz con membrana celulósica.

El cálculo del Flujo ( $J$ ) a partir de los perfiles de cesión así como el del tiempo de latencia (*time lag*) se llevaron a cabo por ajuste lineal  $y=ax+b$  (Excel 2000), donde  $a$  se interpreta como el *time lag* y  $b$  indica el Flujo ( $J \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ ) (Tabla 23).

FÓRMULAS	$J (\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h})$		<i>Time lag</i> (min)	
	MEDIA	SEM	MEDIA	SEM
<b>LIPOGEL 1</b>	48,81	2,41	30,09	3,46
<b>LIPOGEL 2</b>	57,86	0,53	5,56	3,02
<b>HIDROGEL</b>	21,82	1,97	43,52	7,36

**Tabla 23.** Valores de Flujo ( $J$ ) y *Time lag* (min) calculados a partir del ajuste lineal del perfil de cesión de los *Lipogeles* e *Hidrogel* de meloxicam.

Los valores del Flujo,  $J$ , confirman la interpretación indicada anteriormente sobre los perfiles de cesión de las tres formulaciones estudiadas siendo el *Lipogel 2* el que presenta mayor capacidad de cesión del fármaco seguido del *Lipogel 1* e *Hidrogel* cuyos valores de Flujo son más bajos. Por otra parte, el menor tiempo de latencia o *time lag* corresponde a la fórmula *Lipogel 2*. Tratándose de medicamentos de acción antiinflamatoria interesa particularmente que este tiempo de retardo se minimice. Por tanto, según este criterio y por haber presentado la mayor capacidad de liberación del principio activo, la fórmula *Lipogel 2* resulta de elección tras la interpretación de los resultados de este ensayo de cesión *in vitro*.

### II.4.b.3. PARAMETRIZACIÓN DE LAS CURVAS

Se han ensayado diferentes modelos matemáticos con la finalidad de elegir el que con mayor fiabilidad sea capaz de explicar la cinética de disolución del fármaco a partir de las formas de dosificación propuestas en este trabajo. El ajuste cinético de los perfiles de cesión de meloxicam en el tiempo se ha procesado en el programa informático Excel 2000. El principio discriminatorio de la función de ajuste escogido es el criterio de información de Akaike, cuya ecuación es:

$$AIC = n \cdot \ln SSQ + 2p, \text{ siendo:}$$

$n$  = número de pares de valores experimentales (Q/t).

$SSQ$  = suma de los cuadrados de los residuales.

$p$  = número de parámetros de la función de ajuste.

La función que presente el menor valor de AIC es la que, estadísticamente, indica el mejor ajustado *global*; es decir, que explica mejor el proceso de disolución estudiado. Se han realizado cuatro réplicas de las formas farmacéuticas ensayadas –*Lipogeles 1 y 2* e *Hidrogel* de meloxicam-, las cuales deberán someterse al mismo tipo de ajustado (uniformidad de lote).

La Tabla 24 muestra los resultados de los parámetros modelo independientes –Eficiencia de disolución (*EF*) y Tiempo medio de residencia o de disolución (*MDT*), cuyas expresiones matemáticas han sido detalladas anteriormente - obtenidos tras el análisis estadístico de los datos de cantidades acumuladas en el tiempo en el ensayo de cesión.

	EFICIENCIA (EF, %)		MDT ( min)	
	MEDIA	D.E.	MEDIA	D.E.
<b>HIDROGEL</b>	3,377	0,166	0,004	0,002
<b>LIPOGEL 1</b>	4,350	0,123	0,012	0,003
<b>LIPOGEL 2</b>	11,882	1,572	0,014	0,004

**Tabla 24.** Parámetros modelo independientes –Eficiencia (*EF*) y Tiempo medio de residencia (*MDT*)- obtenidos del análisis estadístico de las cantidades acumuladas de meloxicam en el tiempo en ensayo de cesión.

La *EF* es un parámetro adimensional muy operativo en estudios comparativos. En el presente estudio, teniendo en cuenta este parámetro, el **Lipogel 2** se presenta como la forma más eficiente. La interpretación, en cambio, del *MDT* indica que el **Hidrogel** es la forma que ofrece la menor resistencia a la disolución del fármaco; es decir, el menor tiempo de residencia del meloxicam en estado sólido en la forma que lo contiene.

	AIC							
	Orden uno		Raíz cuadrada		Raíz cúbica		Orden cero	
	MEDIA	D.E.	MEDIA	D.E.	MEDIA	D.E.	MEDIA	D.E.
<b>HIDRO</b>	60,48	10,72	116,83	2,36	95,17	3,00	160,61	0,09
<b>LIPO 1</b>	55,72	0,04	128,36	1,25	78,86	1,64	160,21	0,09
<b>LIPO 2</b>	76,98	2,16	136,92	1,30	72,05	2,21	157,87	0,38

**Tabla 25.** Valores del *AIC* obtenidos del estudio estadístico de los residuales del perfil de cantidades acumuladas en el tiempo en ensayo de cesión de meloxicam a partir de las fórmulas hidrofílica y oleosas.

Para la interpretación del *AIC* de cada uno de los ajustes de las cinéticas estudiadas (Tabla 25) se ha considerado que la función que presente el menor valor de dicho parámetro es la que, estadísticamente, explica mejor el proceso de disolución estudiado.

Tanto el **Hidrogel** como el **Lipogel 1** de meloxicam se ajustan a una ecuación cinética de *orden uno*, característica de formas de dosificación convencionales de liberación no sostenida -comprimidos, cápsulas, supositorios...-, según se deduce de la tabla anterior. Es más frecuente, sin embargo, que las formas farmacéuticas semisólidas se ajusten a cinéticas de *raíz cuadrada*, por aplicación de la ecuación de Higuchi.

Se detallan a continuación las ecuaciones correspondientes a sendos perfiles de cesión de meloxicam:

- Ecuación cinética de *orden uno* del perfil de cesión del

**Hidrogel:**

$$\ln(Q_{\infty} - Q) = 2,076 - 0,626 \cdot t$$

- Ecuación de *orden uno* correspondiente al **Lipogel 1:**

$$\ln(Q_{\infty} - Q) = -2,987 - 1,899 \cdot t$$

El **Lipogel 2** cede el fármaco según una cinética de *raíz cúbica* de expresión matemática:

$$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = 0,2351 + 0,2727\sqrt{t}$$

#### **II.4.c. PERMEACIÓN DE MELOXICAM**

Los experimentos de permeación y acumulación en la piel se llevaron a cabo empleando piel congelada extraída de oreja de conejo, a pesar de las limitaciones que comporta la extrapolación de los resultados a la piel humana (Ostacolo C, 2004).

Se ha determinado, por tanto, la capacidad de permeación de meloxicam durante el tiempo de ensayo (24 h) y su acumulación en epidermis y dermis tras la aplicación de cada una de las formulaciones seleccionadas para este estudio; a saber, *Lipogeles 1 y 2* e *Hidrogel* (Colombo G, 2003). Todas ellas se formularon con una concentración en meloxicam de 0,3%. El *Hidrogel*, como se detallará más adelante, se ha sometido, además, a la aplicación de la técnica de iontoforesis catódica evaluando su permeabilidad a un pH de 4,18 y de 7,1. El método analítico en HPLC se validó previamente (Anexo IV).

El ensayo de permeación del *Lipogel 1 de meloxicam* –elaborado con Olivem 700- dio lugar a los valores de concentración que se detallan en la Tabla 26. Los resultados corresponden al análisis de las muestras tomadas del medio receptor –solución tampón de fosfatos, pH 7,4- cada hora hasta el tiempo  $t=8$  h desde el inicio del ensayo así como a  $t=12$ , 16, 20 y 24 h.

Tiempo (h)	Q/A ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )				Media	DE	SEM
	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4			
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,25	1,58	0,24	0,00	0,52	0,72	0,41
2	1,79	10,31	3,49	4,45	5,01	3,70	2,14
3	4,77	23,57	6,73	7,97	10,76	8,64	4,99
4	8,82	38,24	11,11	13,75	17,98	13,65	7,88
5	13,48	54,78	16,76	20,81	26,46	19,12	11,04
6	18,67	70,73	23,47	28,36	35,31	23,94	13,82
7	24,51	84,93	31,03	35,72	44,05	27,64	15,96
8	30,98	98,17	39,25	43,30	52,93	30,60	17,66
12	60,67	150,43	79,95	85,00	94,01	39,05	22,54
16	98,83	207,02	131,99	143,20	145,26	45,28	26,14
20	135,91	255,92	193,41	203,31	197,14	49,18	28,39
24	172,09	301,77	254,98	263,20	248,01	54,57	31,50

**Tabla 26.** Cantidad de meloxicam acumulada en la piel por unidad de superficie tras la administración de Lipogel 1 (Q/A,  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Análisis de la media, desviación estándar y SEM.

Se calculó el *Flujo* ( $J$ ,  $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ ) en el estado estable que, por definición, indica la cantidad de fármaco que es capaz de atravesar la superficie cutánea en la unidad de tiempo, aplicando un ajuste lineal según el programa informático Microsoft Excel 2000. La expresión matemática del *Flujo* es la siguiente:

$$J = \frac{DxK}{H} xC$$

donde  $H$  es la longitud del camino de difusión (cm),  $C$  es la concentración de la formulación donadora ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) y  $D$ , el coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2/\text{h}$ ).

Así, se obtuvo como media de las cuatro réplicas consideradas en el ensayo de *Lipogel 1* un valor de flujo de  $12,05 \pm 1,52 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$  (Media  $\pm$  SEM).

El ensayo de permeación del *Lipogel 2 de meloxicam* –elaborado con Olivem 900- dio lugar a los valores de concentración que se detallan en la Tabla 27. Los resultados corresponden, como en el caso anterior, al análisis de las muestras tomadas del medio receptor –tampón fosfato, pH 7,4- cada hora hasta el tiempo  $t=8$  h, así como a  $t=12, 16, 20$  y  $24$  h.

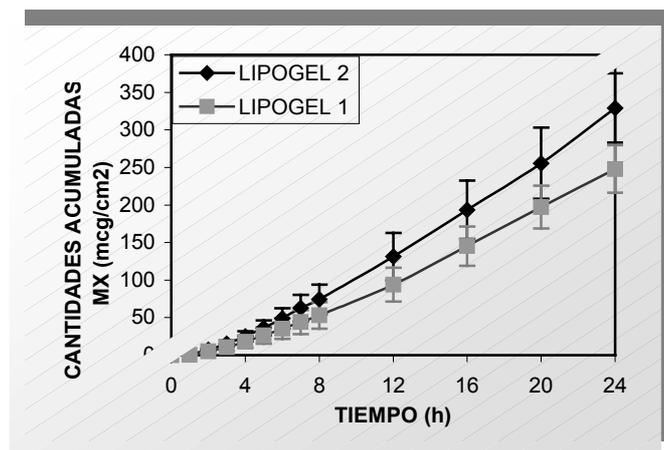
Tiempo (h)	Q/A ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )				Media	DE	SEM
	Celda 1	Celda 2	Celda 3	Celda 4			
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	1,59	1,68	0,08	1,76	1,28	0,80	0,46
2	8,62	9,01	2,93	8,72	7,32	2,93	1,69
3	18,13	18,95	4,98	19,81	15,47	7,03	4,06
4	28,81	30,86	7,67	33,30	25,16	11,80	6,81
5	40,72	43,98	10,77	49,39	36,21	17,34	10,01
6	55,21	58,13	14,53	68,08	48,99	23,62	13,64
7	69,23	72,33	19,15	90,30	62,75	30,52	17,62
8	84,58	88,73	23,86	100,23	74,35	34,30	19,80
12	150,73	153,83	50,23	170,01	131,20	54,64	31,55
16	226,33	219,62	93,35	235,00	193,58	67,11	38,75
20	301,53	276,36	134,43	310,00	255,58	82,02	47,35
24	378,25	331,45	215,58	391,10	329,10	79,90	46,13

**Tabla 27.** Representación de la cantidad de meloxicam acumulada en la piel por unidad de superficie tras la administración de *Lipogel 2* (Q/A,  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Análisis estadístico de la media, desviación estándar y SEM.

Se obtuvo como media de las cuatro réplicas consideradas en el ensayo de *Lipogel 2* un valor de flujo de  $15,45 \pm 1,95 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$  (Media  $\pm$  SEM).

El estudio estadístico comparativo de las dos muestras con respecto a su capacidad de permeación –media del flujo de *Lipogel 1* y de *Lipogel 2*- se procesó según el programa informático Statgraphics según el cual, el p- valor del test F en la tabla de ANOVA es superior a 0,05 por lo que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un 95,0%.

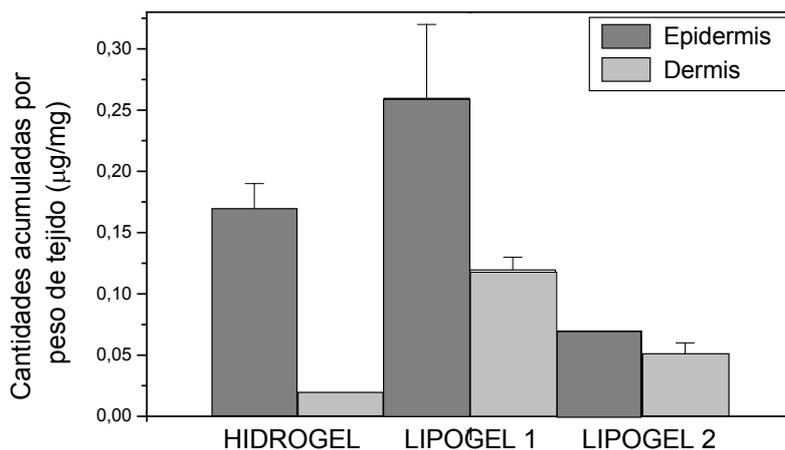
Los perfiles de permeación que han presentado sendas formulaciones se muestran en la Figura 85.



**Figura 85.** Perfiles de permeación de meloxicam a través de piel de oreja de conejo a partir de una dosis de 250 mg de *Lipogel 1* y 2. Valores medios  $\pm$  SEM.

Los perfiles obtenidos a partir de la fórmula **Lipogel 2** presentan valores más elevados que los obtenidos de los ensayos de **Lipogel 1**. Debido a la mayor consistencia que presenta el primero cabría suponer que la cesión del activo sería menor que a partir del **Lipogel 1** que presenta características viscosimétricas de tipo pseudoplástico fluidificante. Sin embargo, y en conformidad con el estudio publicado sobre esta materia por Realdon y col. (Realdon N, 2001), las diferencias en cuanto a las características reológicas de las diversas formulaciones pueden dar lugar a diferencias significativas en los estudios de cesión *in vitro*; sin embargo, se observa una influencia menor en el estudio de permeación *in vitro*. Las diferencias reológicas, por tanto, parecen no intervenir de modo significativo en la biodisponibilidad del fármaco *in vivo*. Además, debido al modesto tamaño molecular del fármaco estudiado (PM de meloxicam =351,41), las características viscosimétricas del medio parecen no influir significativamente en la difusión de meloxicam en el vehículo y acceso al estrato córneo para, posteriormente, poder atravesar el tejido cutáneo.

El histograma siguiente muestra el análisis de las cantidades acumuladas de fármaco en epidermis y dermis en los diversos experimentos llevados a cabo de las tres preparaciones. Se representan los valores medios -indicando el error estadístico de la media (SEM)- de las cantidades acumuladas de meloxicam por peso de tejido ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ).



**Figura 86.** Representación de las cantidades acumuladas de meloxicam en epidermis y dermis ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) en el ensayo de permeación de las fórmulas *Hidrogel* y *Lipogel 1* y *2*.

Los perfiles de permeación obtenidos se analizaron según la siguiente ecuación que es una solución a la segunda ley de difusión de Fick en una membrana homogénea:

$$Q(t) = (KH)Cd \left[ \frac{D}{H^2}t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-n^2\pi^2 \frac{D}{H^2}t\right) \right]$$

donde  $Q(t)$  es la cantidad de  $Mx$  permeado en función del tiempo ( $\mu\text{g}$ ),  $H$  es la longitud del camino de difusión (cm),  $Cd$  es la concentración de la formulación donadora ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) y  $D$ , el coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2/\text{h}$ ).

El ajuste se llevó a cabo con  $n$  igual a 10 usando el programa Kaleidagraph<sup>TM</sup> en un ordenador MacIntosh Power G3. Los parámetros

de permeación ( $KH$  y  $D/H^2$ ) calculados para las diversas formulaciones – hidro y lipogeles- se presentan en la tabla 28.

$KH$  es indicativo del *reparto* de la molécula entre el estrato córneo y la formulación, mientras que  $D/H^2$  representa el parámetro de *difusión*. El coeficiente de *permeabilidad* ( $P$ ) se calculó como  $KH \times D/H^2$ .

El parámetro de *partición* ( $KH$ ) ha resultado mayor para el **Lipogel 2** que para el **Lipogel 1**. Sin embargo, el análisis de la varianza de la Tabla ANOVA indica un p-valor superior a 0,05 por lo que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un 95,0% (Anexo VI.1.). En cambio, la comparación de los valores del parámetro de *partición* de los lipogeles con respecto al hidrogel resultó significativa (Tabla 28).

El parámetro de *difusión* ( $D/H^2$ ), de forma análoga, no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones oleosas ( $p > 0,05$ ) (Anexo VI.2.); sin embargo, sí se advierte diferencia en comparación con el **Hidrogel** a pH 4 ( $p < 0,05$ ).

El mayor coeficiente de permeabilidad ( $P$ ) lo presentó el **Lipogel 2** con un valor de  $41,20 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$  seguido del **Lipogel 1** e **Hidrogel** - $29,93$  y  $1,30 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ , respectivamente-.

El tiempo de latencia (*time lag*), calculado como  $H^2/6D$ , dio lugar a valores similares en el ensayo de las formulaciones oleosas, de aproximadamente 2 horas. El **Hidrogel**, en cambio, presentó un *time lag* inferior -de 1 hora aproximadamente-.

Por tanto, considerando la naturaleza físico-química de los excipientes, las formulaciones oleosas facilitan en mayor proporción la permeación del fármaco que el gel hidrofílico ( $p < 0,05$ ) (Anexo VI.3.). Con objeto de promover la difusión pasiva de meloxicam a través de la piel a partir del **Hidrogel** se aplicó la técnica de iontoforesis catódica (Guy RH, 2001).

<b>Fórmula clonadora</b>	<b>KH (cm) x 10<sup>3</sup></b>	<b>D/H<sup>2</sup> (h<sup>-1</sup>) x 10</b>	<b>P (cm h<sup>-1</sup>) x 10<sup>4</sup></b>	<b>Time lag (h)</b>
<b>I ipogel 1<sup>1</sup></b>	37,99	0,77	29,93	2,16
<b>I ipogel 2<sup>1</sup></b>	49,51	0,83	41,20	2,00
<b>F idrogel <sup>2</sup></b>	1,20	1,34	1,30	1,24

<sup>1</sup> Concentración de meloxicam: 250 mg (0,3%)

<sup>2</sup> Concentración de meloxicam: Dosis infinita (0,3%)

**Tabla 28.** Cálculo de parámetros de permeación: reparto (*KH*), difusión ( $D/H^2$ ), coeficiente de permeabilidad (*P*) y *time lag*.

A partir de los parámetros anteriores, se llevó a cabo la determinación del Flujo *J*, según la ecuación:

$J = P \cdot C$  , expresado en  $\frac{\mu g}{cm^2 \cdot h}$ , donde:

$P$ = coeficiente de permeabilidad.

$C$ = concentración de la formulación donadora.

FÓRMULAS	J (P·C)	J (Ajuste lineal)
LIPOGEL 1	8,98	11,16
LIPOGEL 2	12,36	14,87
HIDROGEL (pH=4) <sup>1</sup>	0,39	0,34
HIDROGEL (pH=4) <sup>2</sup>	0,39	0,34
HIDROGEL (pH=7) <sup>2</sup>	1,17	0,94

<sup>1</sup>Sin aplicar la técnica de iontoforesis

<sup>2</sup>Con aplicación de iontoforesis catódica

**Tabla 29.** Valores de Flujo ( $J$ ) calculados a partir de la ecuación de permeación y del ajuste lineal de los perfiles de permeación de meloxicam de las formulaciones. Se ensayaron dos métodos: permeación pasiva de los Lipogeles e Hidrogel y aplicación de la técnica iontoforética al Hidrogel a pH 4 y 7.

Los resultados que se muestran en la Tabla 29 confirman que los valores de flujo calculados a partir de los parámetros de permeación no difieren significativamente de los que se aproximaron según el método de ajuste lineal. El valor de flujo más elevado corresponde al **Lipogel 2** seguido del **Lipogel 1** ( $p < 0,05$ ) (Anexo VI.4.).

La aplicación de la iontoforesis al estudio de permeación del **Hidrogel** a **pH 4** no consiguió un incremento de la difusión del fármaco ( $p > 0,05$ ) (Anexo VI.5.) debido a que el  $pK_a$  del meloxicam coincide con el pH de la formulación hidrofílica por lo que, según la ecuación de Henderson-Hasselbach, las moléculas se encuentran ionizadas en un 50%. El porcentaje de formas ionizadas parece no resultar suficiente como para permitir un incremento del flujo de fármaco como consecuencia de la aplicación de una cierta intensidad de corriente. En cualquier caso, los mecanismos implicados en la iontoforesis no son del todo conocidos como pudiera ocurrir con la absorción pasiva percutánea (Guy RH, 2001). Así, con la intención de incrementar el flujo de fármaco se ha elevado el pH de la formulación hasta la neutralidad de manera que aumente el porcentaje de formas ionizadas de la molécula activa. Así, la aplicación de la iontoforesis al **Hidrogel** de **pH 7** ha conseguido un incremento estadísticamente significativo del flujo ( $p < 0,05$ ) desde  $0,39 \pm 0,34 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$  a  $1,17 \pm 0,94 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$  –valores calculados a partir de la ecuación de permeación- (Anexo VI.6.).

## II.5. CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE ACETATO DE VITAMINA E

### II.5.a. ENSAYO DE LIBERACIÓN EN DISPOSITIVO DE DIFUSIÓN SIN MEMBRANA

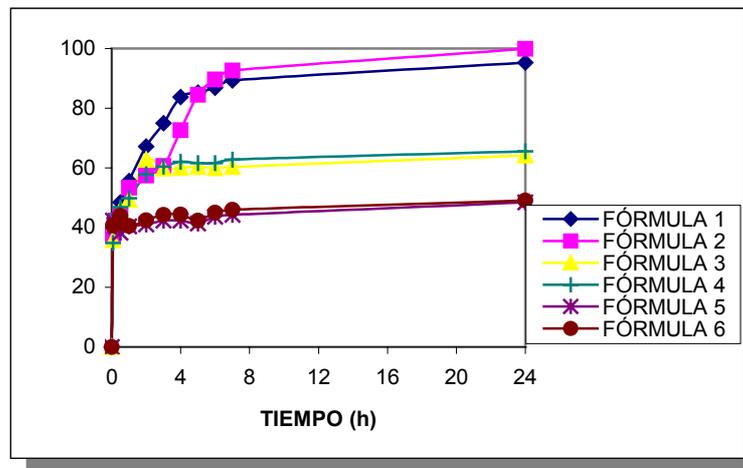
Se llevaron a cabo ensayos de liberación en dispositivo de difusión sin membrana, de fundamento teórico análogo al del dispositivo de paleta sobre membrana para ensayos de disolución de la USP (USP 23/NF 18, 1995), como estudio previo de selección de las formulaciones cosméticas que se someterían, después, al ensayo de cesión y permeación en celdas de Franz.

Los resultados de los ensayos de liberación de AcVE indican que los *Hidrogeles 1* y *2* (2,0%) presentan las cinéticas de liberación más adecuadas dando lugar a concentraciones en el medio transcurrida 1h del inicio del experimento ( $t=0$ ) –considerado como parámetro puntual empírico- de 111,2  $\mu\text{g/ml}$  para la *Fórmula 1*, y 106,8  $\mu\text{g/ml}$  para la *Fórmula 2*. No hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de las cantidades acumuladas en el tiempo del ensayo ( $p>0,05$ ) (Anexo VIII.1.). Estas preparaciones sólo difieren en la proporción que contienen en Olivem 700.

Los *Hidrogeles 3* y *4*, que incluyen Tween 80 a diversa concentración, presentan un perfil cinético retardado con respecto a las anteriores con valores de concentración a  $t=1\text{h}$  de 98,5  $\mu\text{g/ml}$  para la

**Fórmula 3**, y 99,7  $\mu\text{g/ml}$  para la **Fórmula 4**. No hay diferencias estadísticamente significativas entre los perfiles cinéticos de liberación de ambas preparaciones durante el ensayo de 24h ( $p>0,05$ ).

Los perfiles de liberación más lenta corresponden a las **Fórmulas 5** y **6**, elaboradas con una mezcla de PEG. Al cabo de 1h, la concentración de las muestras es de 80,89  $\mu\text{g/ml}$  en el ensayo de la **Fórmula 5**, y de 81,06  $\mu\text{g/ml}$  en el de la **Fórmula 6** ( $p>0,05$ ).



**Figura 87.** Perfil de liberación (%) de AcVE de los *Hidrogeles 1-6* ensayados en dispositivo de difusión sin membrana.

En la Figura 87 se muestran los valores expresados en porcentaje de liberación desde cada fórmula con respecto al tiempo. Se desprende de la explicación anterior que los porcentajes más elevados de liberación del acetato correspondan a las **Fórmulas 1** y **2**, que alcanzan un promedio de 54% a  $t=1\text{h}$ , seguidas de las **Fórmulas 3** y **4**, con un promedio de 49% y,

con valores inferiores, las **Fórmulas 5** y **6** liberan un 40%. La rápida liberación del activo en los primeros intervalos de tiempo puede ser justificada por el efecto del gradiente de concentración, fenómeno espontáneo que tiende a igualar concentraciones entre la formulación y el medio receptor.

A continuación se muestran en la Tabla 30 los resultados del análisis del Flujo ( $J$ , mg/cm<sup>2</sup>h) y Tiempo de latencia (*Time lag*, min) calculados por ajuste lineal de los perfiles de las cantidades acumuladas en el medio receptor durante el tiempo de ensayo.

<b>HII ROGELES</b>	<b>F. UJO (J)</b> <b>(mg/cm<sup>2</sup>h)</b>	<b>TIME LAG</b> <b>(min)</b>
FÓRMULA 1	4,99	18,74
FÓRMULA 2	2,88	31,14
FÓRMULA 3	0,69	29,89
FÓRMULA 4	1,20	27,84
FÓRMULA 5	0,83	20,34
FÓRMULA 6	0,84	21,15

**Tabla 30.** Valores de *Flujo (J)* y *Time lag* (min) calculados según ajuste lineal (Excel 2000) de las cantidades (mg) acumuladas de AcVE liberadas en ensayo de difusión sin membrana.

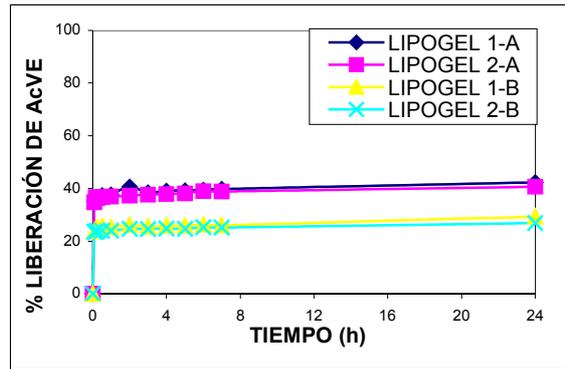
Los lipogeles, por otra parte, y como era de esperar, presentan cinéticas de liberación más lenta que las anteriores (El Gendy AM, 2002),

debido probablemente a la menor afinidad de los vehículos oleosos hacia el medio de liberación acuoso (tampón de pH 5,5).

La fórmula **Lipogel 1-A** –elaborada con Olivem 700, con procedimiento de incorporación del AcVE durante la síntesis del gel- da lugar a un valor de concentración de 75,3 µg/mL a t=1h, mientras que el **Lipogel 2-A** –que incluye Olivem 900 con un método de adición de la provitamina similar al anterior- proporciona un valor de 73,6 µg/mL a un t=1h ( $p>0,05$ ) (Anexo VIII.2.).

Las fórmulas **Lipogel 1** y **2-B** –en las que se incorporó el AcVE al gel ya elaborado- presentan valores inferiores de concentración para un mismo tiempo (t=1h): 50,6 µg/mL en el ensayo del **Lipogel 1-B** y 47,8 µg/mL en el del **Lipogel 2-B**. No hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias del perfil de cantidades acumuladas en el ensayo de los **Lipogeles 1 y 2-B** ( $p>0,05$ ).

La Figura 83 muestra los porcentajes de liberación correspondientes a los distintos tiempos de toma de muestra del ensayo. Se puede comprobar que, transcurrida 1h del ensayo, las *fórmulas B* presentan una liberación de 24%, mientras que las *fórmulas A* dan lugar a valores superiores de liberación alcanzando un 37% ( $p<0,05$ ).



**Figura 88.** Perfil de liberación de AcVE desde los *Lipogel* 1 y 2 elaborados según dos métodos diversos de incorporación de la provitamina.

Se deduce de la anterior figura que ejerce una mayor influencia sobre el perfil de liberación el método de adición del AcVE que la propia composición de los vehículos –que difieren en el tipo de agente tensioactivo, Olivem-. Aquellas en que se incluye la vitamina durante la elaboración del lipogel (*Serie A*) liberan con mayor facilidad el activo cosmético.

Resultan de elección las fórmulas de hidrogeles de AcVE que incluyen Tween 80 en su composición –*Hidrogeles 3* y *4*- por sus adecuadas características organolépticas –consistencia, extensibilidad y color- así como por su comportamiento cinético en el ensayo de liberación del AcVE, por el que afirmamos que no ofrece impedimentos para la posterior fase de acumulación y posible permeación cutánea de la vitamina. El *Hidrogel 3* será posteriormente estudiado en cuanto a su capacidad de cesión y permeación en celdas de Franz

Los lipogel, por su untuosidad y permanencia en la piel resultan adecuados para un empleo localizado en tratamientos cosméticos antienvjecimiento por la acción antioxidante de la vitamina E.

Se llevó a cabo el ajuste de los perfiles cinéticos de las cantidades acumuladas corregidas de AcVE a las ecuaciones matemáticas más usuales atendiendo al criterio de información de Akaike (*AIC*) para la elección de la más adecuada. La Tabla 31 muestra los valores medios del *AIC* de cada uno de los ajustes cinéticos calculados para cada formulación.

	AIC			
	Orden uno	Raíz cuadrada	Raíz cúbica	Orden cero
HIDROGEL 1	108,32	234,70	92,44	218,84
HIDROGEL 2	108,86	236,06	95,89	217,17
HIDROGEL 3	116,57	231,48	80,35	218,71
HIDROGEL 4	115,97	231,59	80,17	218,61
HIDROGEL 5	132,44	226,93	83,90	223,28
HIDROGEL 6	131,12	227,50	83,53	222,65

**Tabla 31.** Valores medios del *AIC* del ajuste cinético de liberación de los *Hidrogeles* de AcVE (2,0%).

Los perfiles cinéticos de liberación de AcVE de los Hidrogeles ensayados se ajustan, según el criterio del *AIC*, a una ecuación cinética de raíz cúbica, característica de formas farmacéuticas semisólidas por aplicación de la ecuación de Higuchi. Se detallan a continuación las expresiones matemáticas correspondientes a las cinéticas de raíz cúbica (Tabla 32):

Fórmulas	Ecuaciones cinéticas
HIDROGEL 1	$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = 2,0819 + 7,9313 \cdot \sqrt{t}$
HIDROGEL 2	$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = 4,0721 + 9,1183 \cdot \sqrt{t}$
HIDROGEL 3	$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = 7,5005 + 1,6712 \cdot \sqrt{t}$
HIDROGEL 4	$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = 7,3350 + 1,8019 \cdot \sqrt{t}$
HIDROGEL 5	$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = 6,9118 + 0,4696 \cdot \sqrt{t}$
HIDROGEL 6	$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = 7,1020 + 0,5238 \cdot \sqrt{t}$

**Tabla 32.** Ecuaciones cinéticas de raíz cúbica correspondientes a la liberación de los *Hidrogeles 1-6* en dispositivo de difusión sin membrana.

La Tabla 33 muestra los resultados del cálculo de parámetros modelo independientes -Eficiencia (*EF*, %) y Tiempo medio de disolución (*MDT*, h)- a partir del perfil de liberación de los hidrogeles.

	EF (%)	MDT (h)
HID ROGEL 1	51,71	0,04
HID ROGEL 2	56,10	0,04
HID ROGEL 3	51,18	0,02
HID ROGEL 4	50,06	0,02
HID ROGEL 5	46,64	0,01
HID ROGEL 6	46,78	0,00

**Tabla 33.** Parámetros modelo independientes  $-EF$  y  $MDT$ - correspondientes a las formulaciones hidrofílicas de AcVE (2,0%).

Todos los Hidrogeles han presentado unos valores de Eficiencia de disolución ( $EF$ ) cercanos al 50% por lo que manifiestan una importante capacidad de disolución del activo en el seno del vehículo. El Tiempo medio de permanencia ( $MDT$ ), por otra parte, muestra valores bajos y, por tanto, adecuados, muy parecidos entre las distintas fórmulas.

El ajuste cinético de los lipogeles se evaluó, asimismo, según el criterio de Akaike ( $AIC$ ). Los valores menores de  $AIC$  (Tabla 34) corresponden al ajuste a una cinética de *raíz cúbica*.

	AIC			
	Orden uno	Raíz cuadrada	Raíz cúbica	Orden cero
L.IPOGEL 1	130,09	225,44	81,95	224,97
L.IPOGEL 2	131,15	224,98	82,26	225,38

**Tabla 34.** Valores medios del  $AIC$  del ajuste cinético de liberación de AcVE

desde las fórmulas oleosas.

- Ecuación cinética de raíz cúbica correspondiente a la cesión de AcVE desde *Lipogel 1*:

$$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = 6,2124 + 0,4465 \cdot \sqrt{t}$$

- Ecuación correspondiente a la cesión del *Lipogel 2*:

$$\sqrt[3]{Q_{100}} - \sqrt[3]{(Q_{100} - Q)} = 6,0794 + 0,4118 \cdot \sqrt{t}$$

	EF (%)	MDT (h)
L. POGEL 1	42,02	0,01
L. POGEL 2	40,95	0,01

**Tabla 35.** Parámetros modelo independientes –EF y MDT- del análisis del perfil de liberación de AcVE desde los *Lipogeles 1 y 2*.

Los valores de Eficiencia de disolución presentan valores aceptables en torno al 40%. El cálculo del Tiempo medio de disolución ha resultado de igual valor para ambas preparaciones oleosas –0,01 h-.

### II.5.b. ENSAYO DE SELECCIÓN DE MEMBRANA EN CELDAS DE DIFUSIÓN DE FRANZ

Se ha llevado a cabo un estudio de selección de membrana previo a la realización de los ensayos de cesión de AcVE a partir de las formulaciones cosméticas para comparar los perfiles de difusión de una solución de AcVE.

Las condiciones del ensayo se detallan en el apartado “Material y Métodos” de esta Memoria. Se realizaron los experimentos con membranas artificiales de naturaleza hidrofílica e hidrófoba así como con las de tipo Spectra-Por<sup>®</sup> que tratan de reproducir la naturaleza hidrolipídica de la piel.

El análisis espectrofotométrico de las muestras tomadas del medio receptor en el ensayo de selección de membrana no produjo ninguna señal de absorbancia. Puede deberse, en el caso del empleo de membranas hidrofílicas, a la falta de afinidad fisicoquímica del analito –hidrófobo– con la propia membrana. Por esta razón se probó con una membrana sintética de naturaleza hidrofóbica, pero tampoco se registró ninguna lectura de absorbancia en el análisis de las muestras.

Las membranas tipo Spectra-Por<sup>®</sup> tampoco resultaron adecuadas para este ensayo de cesión puesto que no permitieron el paso del analito ni se observó retenido en su entramado.

Por tanto, no se llevó a cabo el ensayo de cesión de las formulaciones de AcVE empleando estas membranas artificiales sino que se optó por el estudio de permeación que permite determinar la posible acumulación y absorción transdérmica del activo a través de piel animal.

### **II.5.c. ENSAYO DE PERMEACIÓN EN CELDAS DE FRANZ** **ACUMULACIÓN EN LA PIEL Y METABOLISMO DE AcVE**

Los experimentos de acumulación en la piel y metabolismo cutáneo se llevaron a cabo empleando piel recientemente extraída de oreja de conejo, que ha demostrado tener una razonable analogía en cuanto a la permeabilidad con respecto a la piel humana (Bonina F, 1996; Nicoli S, 2003). En cambio, no hay ningún modelo animal que pueda reflejar el comportamiento metabólico de la piel humana. Por otra parte, esta última suele estar disponible congelada y el proceso de congelación puede inactivar algunas enzimas y/o romper estructuras celulares liberando, por tanto, enzimas intercelulares. Todo lo anterior puede producir artefactos que alteren los experimentos de metabolismo cuando se utiliza piel congelada. Por estas razones, se utilizó el mismo modelo animal, piel fresca extraída de oreja de conejo, para evaluar el metabolismo cutáneo, teniendo en cuenta las limitaciones que comporta la extrapolación de los resultados a la piel humana (Ostacolo C, 2004).

Se ha determinado la acumulación de AcVE y de su metabolito, VE, en epidermis y dermis tras la aplicación de cada una de las formulaciones seleccionadas para este estudio; a saber, ***Lipogeles 1 y 2*** así como ***Hidrogel 3 y 7***. Todas ellas se formularon con una concentración en AcVE del 2%. El método analítico en HPLC se validó previamente (Anexo VII).

El ensayo de permeación de los *Lipogeles 1 y 2 de AcVE* – elaborados con Olivem 700 y 900, respectivamente y con idéntica concentración de agente gelificante (cfr. I.2.c.)- dio lugar a unos valores tan bajos de acumulación y permeación del acetato y la VE que no se pueden discutir con rigor ya que se encuentran cercanos al límite de detección y cuantificación del método analítico. De hecho, apenas se ha detectado alguna señal en el análisis de los extractos de epidermis y dermis. Sí, en cambio, se evidencia una cierta concentración de VE en el análisis de la muestra tomada del medio receptor a las 4 horas desde el inicio del ensayo. La presencia de dicha molécula indica la metabolización sufrida por el AcVE en la piel por acción de las enzimas esterazas.

Esta dificultad en la acumulación se podría explicar desde un punto de vista físico-químico teniendo en cuenta la elevada afinidad entre el vehículo oleoso y el activo cosmético, liposoluble. La cesión de la molécula activa se ve dificultada por la mayor apetencia hacia el vehículo que la contiene. De esta forma, los lipogeles ensayados demuestran no ser buenos vehículos del AcVE ya que se espera que un vehículo sea capaz de ceder el activo cosmético para que éste alcance el estrato córneo y se acumule en la piel llevando a cabo su efecto cosmético.

Se muestran a continuación algunos de los resultados del ensayo de permeación del *Lipogel 2* que, como en los experimentos llevados a cabo

con *Lipogel 1*, ponen de manifiesto estos bajos niveles de acumulación ya discutidos.

Extractos epidermis	Conc (µg/ml)	Q (µg)	Q/A (µg/cm <sup>2</sup> )	Q/W (µg/mg)	Media	SD	SEM
E1	0,117	0,233	0,389	0,092	0,689	1,055	0,527
E2	0,077	0,154	0,256	0,068			
E3	1,144	2,288	3,814	1,907			
E4	0,117	0,233	0,389	0,145	0,461	0,592	0,296
E5	0,077	0,154	0,256	0,093			
E6	1,144	2,288	3,814	1,144			

**Tabla 36.** Resultados del análisis de los extractos de epidermis (t=4 h) del ensayo de permeación de AcVE a partir de la fórmula *Lipogel 2* (2%).

Extractos dermis	Conc (µg/ml)	Q (µg)	Q/A (µg/cm <sup>2</sup> )	Q/W (µg/mg)	Media	SD	SEM
D1	0,068	0,135	0,226	0,007	0,015	0,013	0,006
D2	0,111	0,222	0,369	0,009			
D3	0,399	0,799	1,331	0,030			
D4	0,068	0,135	0,226	0,007	0,020	0,016	0,008
D5	0,111	0,221	0,369	0,014			
D6	0,399	0,799	1,331	0,038			

**Tabla 37.** Resultados del análisis de los extractos de dermis (t=4 h) del ensayo de permeación de AcVE a partir de la fórmula *Lipogel 2* (2%).

Extractos epidermis	Conc (µg/ml)	Q (µg)	Q/A (µg/cm <sup>2</sup> )	Q/W (µg/mg)	Media	SD	SEM
E1	0,003	0,005	0,009	0,003	0,003	0,001	0,001
E2	0,003	0,007	0,012	0,004			
E3	0,001	0,003	0,005	0,001			
E4	0,003	0,005	0,009	0,002	0,002	0,001	0,000
E5	0,003	0,007	0,012	0,003			
E6	0,001	0,003	0,005	0,002			

**Tabla 38.** Resultados del análisis de los extractos de epidermis (t=4 h) del ensayo de permeación de VE a partir de la fórmula *Lipogel 2* (2%).

Extractos dermis	Conc (µg/ml)	Q (µg)	Q/A (µg/cm <sup>2</sup> )	Q/W (µg/mg)	Media	SD	SEM
D1	0,009	0,018	0,031	1E-03	0,003	0,004	0,002
D2	0,088	0,176	0,294	0,007			
D3	0,015	0,030	0,050	0,001			
D4	0,009	0,018	0,031	0,010	0,004	0,005	0,003
D5	0,088	0,176	0,294	0,011			
D6	0,015	0,030	0,050	0,001			

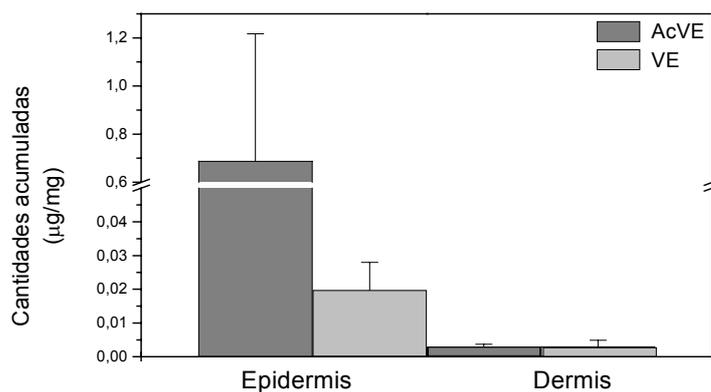
**Tabla 39.** Resultados del análisis de los extractos de dermis (t=4 h) del ensayo de permeación de VE a partir de la fórmula *Lipogel 2* (2%).

Réplicas	Conc ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cant perm ( $\mu\text{g}$ )	Q/A ( $\mu\text{g/cm}^2$ )	Media	SD	SEM
1	0,023	0,092	0,153	0,362	0,500	0,250
2	0,000	0,000	0,000			
3	0,140	0,559	0,932			
4	0,023	0,092	0,153			
5	0,000	0,000	0,000			
6	0,140	0,559	0,932			

**Tabla 40.** Resultados del análisis cromatográfico de las muestras tomadas del medio receptor ( $t=4$  h) expresados en cantidades permeadas de AcVE ( $\mu\text{g}$ ), cantidad con respecto al área de difusión y estudio estadístico de la media, desviación estándar y la media geométrica del error estándar.

Réplicas	Conc ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cant perm ( $\mu\text{g}$ )	Q/A ( $\mu\text{g/cm}^2$ )	Media	SD	SEM
1	0,106	0,426	0,710	0,518	0,394	0,197
2	0,010	0,039	0,065			
3	0,117	0,468	0,780			
4	0,106	0,426	0,709			
5	0,010	0,039	0,065			
6	0,117	0,468	0,780			

**Tabla 41.** Resultados del análisis cromatográfico de las muestras tomadas del medio receptor ( $t=4$  h) expresados en cantidades permeadas de VE ( $\mu\text{g}$ ), cantidad con respecto al área de difusión y estudio estadístico de la media, desviación estándar y la media geométrica del error estándar.



**Figura 89.** Acumulación de AcVE y VE en epidermis y dermis ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tejido) tras la aplicación de la fórmula *Lipogel 2* (AcVE 2%)

El histograma anterior muestra la acumulación de la provitamina y de su metabolito en los dos estratos de la piel estudiados apreciándose una mayor tendencia a quedar retenidas en epidermis que en dermis por la mayor lipofilia de la primera y, por tanto, mayor afinidad hacia dichas moléculas liposolubles.

Con respecto a la preparación hidrofílica de Carbopol<sup>®</sup> -*Fórmula 3*- que incluye el AcVE con la estrategia de la combinación con Tween 80 para conseguir incorporar la molécula lipofílica al gel acuoso, los resultados fueron poco favorables a la acumulación del activo en la piel. Es decir, que apenas se detectaron concentraciones eficaces de VE en los dos estratos de piel estudiados. Sin embargo, el análisis del medio receptor a las 4 horas de curso del experimento dio lugar a una cierta

concentración de VE, producto del metabolismo cutáneo de la provitamina.

Extractos epidermis	Conc (µg/ml)	Q (µg)	Q/cm <sup>2</sup>	Q/mg	Media	SD	SEM
E1	0,009	0,018	0,031	0,012	0,012	0,001	0,001
E2	0,009	0,017	0,029	0,011			
E3	0,009	0,018	0,030	0,011			

**Tabla 42.** Resultados del análisis de los extractos de epidermis (t=4 h) del ensayo de permeación de AcVE a partir de la fórmula *Hidrogel 3* (2%).

Extractos dermis	Conc (µg/ml)	Q (µg)	Q/A (µg/cm <sup>2</sup> )	Q/W (µg/mg)	Media	SD	SEM
D1	0,023	0,046	0,077	0,001	0,001	0,001	0,000
D2	0,009	0,018	0,029	8E-04			
D3	0,010	0,025	0,050	0,001			

**Tabla 43.** Resultados del análisis de los extractos de dermis (t=4 h) del ensayo de permeación de AcVE a partir de la fórmula *Hidrogel 3* (2%).

Extractos epidermis	Conc (µg/ml)	Q (µg)	Q/cm <sup>2</sup>	Q/mg	Media	SD	SEM
E1	0,003	0,006	0,010	0,004	0,003	0,001	0,000
E2	0,002	0,005	0,008	0,003			
E3	0,003	0,005	0,009	0,003			

**Tabla 44.** Resultados del análisis de los extractos de epidermis (t=4 h) del ensayo de permeación de VE a partir de la fórmula *Hidrogel 3* (2%).

Extractos dermis	Conc (µg/ml)	Q (µg)	Q/A	Q/W (µg/mg)	Media		SEM
D1	0,030	0,060	0,101	0,002	0,002	1E-05	6E-06
D2	0,019	0,038	0,064	0,002			
D3	0,022	0,042	0,089	0,002			

**Tabla 45.** Resultados del análisis de los extractos de dermis (t=4 h) del ensayo de permeación de VE a partir de la fórmula *Hidrogel 3* (2%).

Réplicas	Conc (µg/ml)	Cant perm (µg)	(µg/cm <sup>2</sup> )	Media	SD	SEM
1	0,093	0,374	0,623	0,622	0,001	0,000
2	0,093	0,373	0,622			
3	0,094	0,373	0,622			

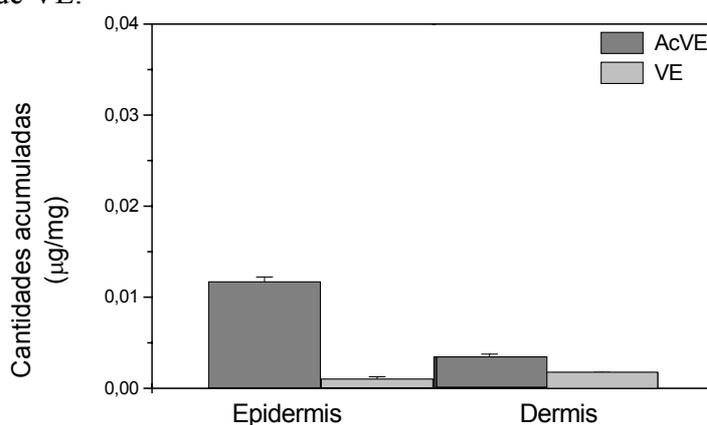
**Tabla 46.** Resultados del análisis cromatográfico de las muestras tomadas del medio receptor (t=4 h) expresados en cantidades permeadas de AcVE (µg), cantidad con respecto al área de difusión y estudio estadístico de la media, desviación estándar y la media geométrica del error estándar.

Réplicas	Conc (µg/ml)	Cant perm (µg)	Q/A (µg/cm <sup>2</sup> )	Media		SEM
1	0,111	0,444	0,740	0,621	0,169	0,084
2	0,075	0,301	0,502			
3	0,900	0,340	0,570			

**Tabla 47.** Resultados del análisis cromatográfico de las muestras tomadas del medio receptor (t=4 h) expresados en cantidades permeadas de VE (µg),

cantidad con respecto al área de difusión y estudio estadístico de la media, desviación estándar y la media geométrica del error estándar.

La razón que podría justificar la dificultad en la cesión del activo cosmético y, por tanto, los bajos niveles de acumulación en la piel puede ser, en este caso, la posible formación de una micela de Tween 80 que incluya al AcVE de tal forma que impida su cesión a un medio hidrofílico como es el gel de carbopol constituyendo, por tanto, un obstáculo o impedimento al contacto directo entre el activo y la piel. Esto trae como consecuencia la dificultad tanto en la acumulación como en la permeación (Figura 90). Aunque con valores bajos, se mantiene la tendencia a la acumulación de ambas moléculas lipofílicas preferentemente en la epidermis que en la dermis acuosa. Asimismo, se observa el efecto del metabolismo sobre la provitamina que, al alcanzar la dermis, por acción de las enzimas esterases libera una mayor proporción de VE.



**Figura 90.** Acumulación de AcVE y VE en epidermis y dermis tras la

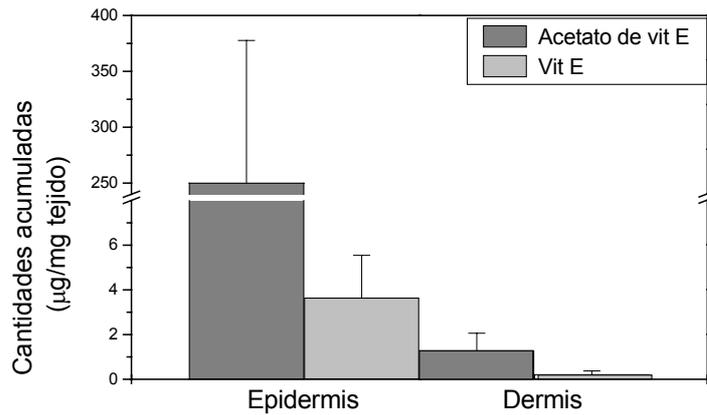
aplicación de la fórmula *Hidrogel 3* (AcVE, 2%).

Por último, para completar el estudio de absorción transdérmica de AcVE y dado que la complejidad de la formulación hidrofílica anteriormente descrita ha resultado un impedimento para la adecuada cesión y posterior acumulación del activo cosmético, se planteó la formulación de un gel acuoso –*Hidrogel 7*– de composición sencilla que no supusiera un obstáculo, al menos considerándolo *a priori*, como en el caso anterior.

De esta manera, se recurrió a una fórmula conocida para el grupo de investigación del Departamento Farmacéutico (Universidad de Parma, Italia) que ha servido en otros estudios como vehículo de activos cosméticos (Marconi B, 1999).

La preparación cuya composición se detalla en el Apartado I.2.c. se ensayó, asimismo, en celdas de Franz empleando piel fresca de oreja de conejo durante un tiempo de 4 horas.

Los resultados del estudio manifiestan que, tras la aplicación del preparado de AcVE, la epidermis contiene tanto el derivado inalterado como VE, originada por el metabolismo cutáneo del éster de acetato, siendo cuantitativamente superior la presencia del AcVE. La acumulación en la dermis siguió la misma tendencia aunque con valores inferiores expresados en cantidad de analito por peso de tejido ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) (Figura 91).



**Figura 91.** Acumulación de la provitamina (AcVE) y su metabolito activo (VE) en la piel a partir de la aplicación tópica de *Hidrogel 7* con AcVE (2%).

Como en el estudio de permeación de las fórmulas anteriores se detallan a continuación los resultados numéricos de la acumulación y permeación de las dos formas de vitamina E.

Extractos epidermis	Conc (µg/ml)	Q (µg)	(µg/cm)	Q/W	Media	SEM
E1	216,975	433,950	723,250	175,700	250,400	127,270
E2	237,879	475,760	792,930	344,800		
E3	823,412	1646,80	2744,700	370,900		
E4	337,423	674,850	1124,700	110,400		

**Tabla 48.** Resultados del análisis de los extractos de epidermis (t=4 h) del ensayo de permeación de AcVE a partir de la fórmula *Hidrogel 7* (2%).

Extractos dermis	Conc (µg/ml)	Q (µg)	Q/A (µg/cm <sup>2</sup> )	Q/W (µg/mg)	Media	SD	SEM
D1	16,691	33,382	55,637	0,988	3,660	1,886	0,943
D2	40,584	81,168	135,280	5,415			
D3	43,861	87,722	146,200	3,993			
D4	53,435	106,870	178,120	4,244			

**Tabla 49.** Resultados del análisis de los extractos de dermis (t=4 h) del ensayo de permeación de AcVE a partir de la fórmula *Hidrogel 7* (2%).

Extractos epidermis	Conc (µg/ml)	Q (µg)	Q/A (µg/cm <sup>2</sup> )	Q/W (µg/mg)	Media	SD	SEM
E1	2,053	4,106	6,843	1,662	1,302	0,764	0,382
E2	1,521	3,042	5,069	2,204			
E3	1,645	3,290	5,484	0,741			
E4	1,835	3,670	6,117	0,601			

**Tabla 50.** Resultados del análisis de los extractos de epidermis (t=4 h) del ensayo de permeación de VE a partir de la fórmula *Hidrogel 7* (2%).

Extractos dermis	Conc (µg/ml)	Q (µg)	Q/A (µg/cm <sup>2</sup> )	Q/W (µg/mg)	Media	SD	SEM
D1	2,492	4,985	8,309	0,148	0,227	0,148	0,074
D2	3,364	6,729	11,216	0,449			
D3	1,844	3,689	6,148	0,168			
D4	1,816	3,632	6,054	0,144			

**Tabla 51.** Resultados del análisis de los extractos de dermis (t=4 h) del ensayo de permeación de VE a partir de la fórmula *Hidrogel 7* (2%).

Réplicas	Conc (µg/ml)	Cant perm (µg)	Q/A (µg/cm <sup>2</sup> )	Media	SD	SEM
1	0,863	3,453	5,754	123,300	199,890	99,947
2	63,372	253,490	422,480			
3	4,005	16,021	26,702			
4	5,753	23,015	38,359			

**Tabla 52.** Resultados del análisis cromatográfico de las muestras tomadas del medio receptor (t=4 h) expresados en cantidades permeadas de AcVE (µg), cantidad con respecto al área de difusión y estudio estadístico de la media, desviación estándar y la media geométrica del error estándar.

Réplicas	Conc (µg/ml)	Cant perm (µg)	Q/A (µg/cm <sup>2</sup> )	Media	SD	SEM
1	1,524	6,097	10,162	10,060	1,889	0,944
2	1,230	4,920	8,2003			
3	1,894	7,578	12,631			
4	1,389	5,559	9,2647			

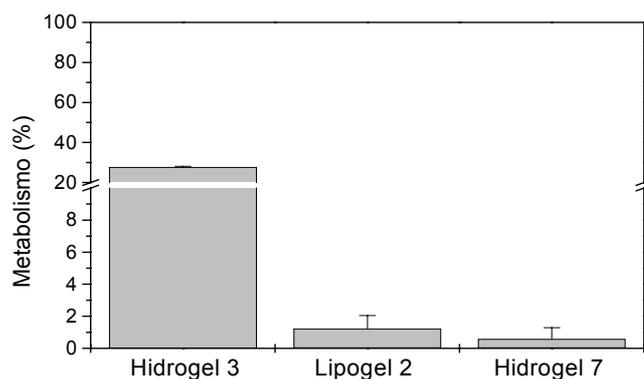
**Tabla 53.** Resultados del análisis cromatográfico de las muestras tomadas del medio receptor (t=4 h) expresados en cantidades permeadas de VE (µg), cantidad con respecto al área de difusión y estudio estadístico de la media, desviación estándar y la media geométrica del error estándar.

Se ha llevado a cabo el cálculo del porcentaje de metabolismo –*Extent of metabolism, E (%)*- de acuerdo con la ecuación propuesta por Rangarajan y Zatz (Rangarajan M, 2001):

$$E = \frac{VE}{VE + PV} \%$$

donde VE es  $\alpha$ -tocoferol y PV representa el derivado de  $\alpha$ -tocoferol acumulado en la piel (dermis y epidermis).

Según el artículo publicado por Ostacolo –ya citado anteriormente- el AcVE presenta un porcentaje de metabolismo notablemente superior al de otras provitaminas estudiadas como los derivados glicínico, alanínico y del ácido glutámico, a pesar de que su vida media es similar a la del derivado glicínico. La explicación de dicho comportamiento puede radicar en la elevada hidrofobia del derivado acetato que manifiesta una mayor afinidad hacia el posible bolsillo hidrofóbico en el sitio activo del enzima esterasa. La Figura 92 representa el porcentaje de provitamina que ha sido metabolizado en la piel –originando VE-, después de 4 horas para las fórmulas ***Lipogel 2*** e ***Hidrogeles 3*** y 7.



**Figura 92.** Porcentaje de metabolismo (*E*, Extent of Metabolism, %) de las formulaciones *Hidrogel 3* y *7* así como del *Lipogel 2* a un  $t=4$  h de comienzo del ensayo. Cada valor es la media de 3 a 6 experimentos.

La fórmula que dio lugar a un mayor porcentaje de metabolismo fue el ***Hidrogel 3*** aunque, teniendo en cuenta los bajos niveles de acumulación en los estratos cutáneos, no resulta significativo. Una cantidad tan pequeña de provitamina permite suponer que las enzimas esterases no se encuentran saturadas sino disponibles para recibir al sustrato que, de esta forma, resulta metabolizado en un porcentaje mayor que cuando se produce un fenómeno de acumulación de la provitamina cuantitativamente más elevado. Tal es el caso del ***Hidrogel 7*** que, dando lugar a niveles de acumulación más elevados, sin embargo presenta un porcentaje de metabolismo muy bajo.

Existe cierta controversia entre diversos autores en cuanto a la efectividad del AcVE en el tejido cutáneo cuando permanece inalterado sin metabolizarse a VE. Sin embargo, son numerosos los que defienden la efectividad *per se* de la provitamina, como se ha detallado en la parte teórica de esta Memoria de Tesis. En cualquier caso, los estudios publicados indican un porcentaje de metabolismo generalmente no superior al 5% en el mejor de los casos (Trevithick JR, 1993).

*Conclusiones*

### **III. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos del desarrollo experimental propuesto en el plan de trabajo de esta Memoria de Tesis, que pretende el acceso al Grado de Doctora según la regulación del Doctorado Europeo de esta Universidad de Granada, nos permiten establecer las conclusiones que más adelante se detallan.

Se han diseñado y sintetizado nuevas formulaciones de geles hidrófilos *-hidrogeles-* e hidrófobos, elaborados mayoritariamente a partir de aceite de oliva *-lipogeles-*, como vehículos para la administración tópica de meloxicam *-fármaco antiinflamatorio-* y acetato de vitamina E *-activo cosmético antioxidante-* que han sido caracterizados desde un punto de vista organoléptico y reológico con objeto de seleccionar las formulaciones más adecuadas que, posteriormente, han sido sometidas a ensayos de liberación, cesión y permeación del activo correspondiente.

Se exponen a continuación las conclusiones de cada uno de los aspectos citados:

1. Con respecto a la **caracterización organoléptica**:

- Los **Lipogeles** denominados **1** y **2**, elaborados con un 3% de etilcelulosa y un derivado tensioactivo *Olivem -700* y *900*, respectivamente- en cantidad suficiente de aceite de oliva han manifestado las mejores características **organolépticas** tanto por su homogeneidad y textura como por su extensibilidad y previsible adherencia a la superficie de la piel.
- Los **Hidrogeles** **3** y **4**, elaborados con Tween 80 como estrategia de incorporación del acetato de vitamina E en el seno del gel de Carbopol® presentaron, a su vez, las mejores características organolépticas –consistencia, extensibilidad y color-. El **Hidrogel** **7** presentó una textura y aspecto idóneos para su uso tópico. Se advierte, sin embargo, cierto olor a metanol, componente de la formulación, que no resulta adecuado para su administración cutánea.

2. **Caracterización reológica:**

El cálculo de determinados parámetros reológicos ha servido como criterio discriminatorio por su repercusión directa sobre la extensibilidad, estabilidad y consistencia de las preparaciones tales como la viscosidad aparente a determinadas velocidades de deformación, la tixotropía de los geles, el carácter elástico o viscoso de las muestras, etc.

- **Lipogeles:**
  - El estudio reológico de los **Lipogeles 1 y 2** confirma la selección anterior mostrando la idoneidad de su comportamiento viscoelástico. **Lipogel 1** se ha caracterizado como *pseudoplástico fluidificante* mientras que **Lipogel 2** ha manifestado un comportamiento *plástico no ideal*. La presencia de cierto carácter plástico en ambas formulaciones facilita el envasado y dosificación de las mismas ya que ambas presentan en estado de reposo una cierta consistencia que, al ser sometida a un esfuerzo de aplicación sobre la piel, disminuye fluyendo con facilidad y permitiendo, por tanto, la extensión de las mismas.
    - La presencia del tensioactivo *Olivem 900* confiere una consistencia más elevada a **Lipogel 2** que a **Lipogel 1** - que contiene *Olivem 700*- y se manifiesta con valores más elevados de viscosidad y esfuerzo umbral ( $\sigma_0$ ).
    - El comportamiento de ambos fue uniforme con respecto a la temperatura mostrando valores de viscosidad más elevados a 25°C que a 32°C; es decir, se produce un efecto de fluidificación con respecto a la temperatura.
    - El valor de esfuerzo umbral ( $\sigma_0$ ) de **Lipogel 1** se considera, sin embargo, incluido en la categoría de las preparaciones demasiado fluidas que dificultan su dosificación por el riesgo de goteo. **Lipogel 2**, en cambio, en

virtud de su valor de esfuerzo umbral ( $\sigma_0$ ), presenta una textura adecuada, extensible que permite una cómoda aplicación.

- Ambas formulaciones manifestaron un intenso carácter *tixotrópico* que aconsejó la renovación de la muestra en cada réplica de los ensayos reológicos.

- Los estudios de oscilometría y *creep-recovery* fueron consistentes indicando la existencia de cierto carácter elástico en las muestras cuando se aplican valores de esfuerzo bajos (1-5 Pa). Sin embargo, dado que la aplicación tópica supone la aplicación de esfuerzos de cizalla elevados ( $10^4$ - $10^5$  Pa), que superan el valor de  $\sigma_0$  o el de desestructuración progresiva, en cada caso, no tendrá lugar una recuperación elástica de la estructura una vez sea extendido el producto.

- ***Hidrogeles:***

- El hidrogel ***H*** de Carbopol® manifestó un comportamiento *plástico no ideal* con tixotropía y un valor de esfuerzo umbral ( $\sigma_0$ ) que se considera indicativo de texturas demasiado rígidas, difíciles de extender sobre la piel. El estudio de *creep-recovery* manifestó un comportamiento ordinario con respecto a la influencia de la temperatura con un carácter elástico más acusado a 25°C que a 32°C.

- El hidrogel ***H7*** se ha caracterizado, de modo análogo, como *plástico tixotrópico no ideal* aunque con un

valor de esfuerzo umbral ( $\sigma_0$ ) inferior al gel de carbopol que le confiere mejores características de extensibilidad. Presentó cierta capacidad elástica en oscilometría y en el ensayo de *creep*.

### 3. Cesión de meloxicam desde las formulaciones:

- **Lipogeles:**

- **Lipogel 2** presentó la mayor capacidad de cesión de meloxicam debido a su naturaleza fuertemente lipofílica ya que vehiculiza en suspensión al principio activo en forma de sal hidrosoluble. Puede justificarse, por tanto, por la escasa afinidad entre ambos constituyentes. El perfil de cesión de las cantidades corregidas de fármaco con respecto al tiempo se ajusta a una cinética de *raíz cúbica*.

- El porcentaje de liberación fue inferior en el ensayo de **Lipogel 1** a pesar de presentar valores de viscosidad más bajos. Sin embargo, por tratarse el meloxicam de una molécula de tamaño molecular no elevado, su difusión en el vehículo no tiene por qué obedecer a este comportamiento que podríamos llamar reológico-dependiente. Esta formulación cede el fármaco según una cinética de *orden uno*.

- **Hidrogel:**

La afinidad físico-química vehículo-fármaco justifica la dificultad de cesión de la molécula activa y, por tanto, los

valores más bajos de concentración en el medio receptor debido a la menor actividad termodinámica. La cesión de meloxicam se ajusta a una cinética de *orden uno*.

#### 4. Estudio de permeación de meloxicam:

- **Lipogeles:**

- No se han apreciado diferencias estadísticamente significativas en el perfil de permeación de los **Lipogeles** ensayados en piel de oreja de conejo. Este resultado viene a confirmar el postulado que sostiene que la diversa consistencia de las preparaciones puede influir en los ensayos de cesión *in vitro* sin observarse una influencia significativa en el estudio de permeación *in vitro*. Las diferencias reológicas, por tanto, parecen no intervenir de modo significativo en la biodisponibilidad del fármaco *in vivo*.

- El parámetro de partición ( $KH$ ) calculado a partir de la ecuación de Fick modificada no ha presentado diferencias significativas en el ensayo de las dos formulaciones oleosas pero sí con respecto al hidrogel.

- De modo análogo, el parámetro de difusión ( $D/H^2$ ) no difiere significativamente entre los lipogeles pero sí en comparación con el hidrogel.

- El tiempo de latencia (*time lag*,  $H^2/6D$ ) se aproximó a 2h en el ensayo de los lipogeles mientras que fue de 1h en el caso del hidrogel.

- El **hidrogel** de meloxicam manifestó una escasa capacidad de difusión pasiva a través de la piel. Para promoverla, se aplicó la técnica de iontoforesis catódica.

- El **hidrogel de pH 4** no consiguió un incremento significativo de difusión del fármaco ( $p > 0,05$ ) debido a que el  $pK_a$  de meloxicam coincide con el pH de la formulación hidrofílica. Un 50% de formas ionizadas parece no resultar suficiente como para permitir un incremento del flujo por efecto de la aplicación de intensidad de corriente.

- La aplicación de la iontoforesis al **Hidrogel a pH 7** ha conseguido un incremento estadísticamente significativo del flujo ( $p < 0,05$ ).

## 5. Cesión de acetato de vitamina E:

- **Lipogeles:**

Los lipogeles, que incluyen en solución el activo cosmético, presentan cinéticas de liberación más lenta que las formulaciones hidrofílicas, debido a la menor afinidad de los vehículos oleosos hacia el medio de liberación acuoso. Su perfil de liberación se ajusta a ecuaciones cinéticas de *raíz cúbica*.

- **Hidrogeles:**

Los perfiles de liberación más rápida corresponden a las formulaciones **1** y **2** sin presentar diferencias significativas entre sí; seguidas de las fórmulas **3** y **4**, con un porcentaje de liberación

inferior aunque aceptable. Los seis hidrogeles estudiados presentan, asimismo, cinéticas de liberación de *raíz cúbica*.

#### 6. Estudio de permeación de acetato de vitamina E:

- El ensayo de los *Lipogeles 1* y *2* dio lugar a unos valores tan bajos de acumulación y permeación del acetato y la VE que no se pueden discutir con rigor ya que se encuentran cercanos al límite de detección del método analítico. Apenas se ha detectado alguna señal en el análisis de los extractos de epidermis y dermis.
- En el ensayo de *Hidrogel 3* los resultados fueron poco favorables a la acumulación del activo en la piel debido a la posible formación de una micela de Tween 80 que incluya al AcVE de tal forma que impida su cesión a un medio hidrofílico como es el gel de carbopol constituyendo, por tanto, un obstáculo o impedimento al contacto directo entre el activo y la piel.
- La aplicación de *Hidrogel 7* de acetato de VE se acumuló con niveles eficaces en epidermis y dermis, siendo cuantitativamente superiores los valores de concentración en la primera, por su menor hidrofilia. Se comprobó la transformación metabólica de la provitamina a la forma activa de VE en ambos estratos de la piel aunque el cálculo del porcentaje de metabolismo no resultó elevado debido al fenómeno de saturación de las enzimas estererasas.

Como **conclusiones generales** de este trabajo de investigación podríamos indicar que:

- Con respecto a los *medicamentos*:
  1. Los *lipogeles* de meloxicam y, en particular, ***Lipogel 2***, por razones de afinidad físico-química entre el vehículo y la molécula activa en suspensión, producen niveles adecuados de permeación a través de piel de oreja de conejo, de razonable analogía con la piel humana. Además, por sus propiedades viscoelásticas plásticas con capacidad de recuperación elástica de su estructura al ser sometida a pequeños esfuerzos y las adecuadas características organolépticas -homogeneidad y textura, así como su extensibilidad-, resulta de elección para la administración tópica local del fármaco antiinflamatorio. Presenta, sin embargo, como inconveniente el excesivo tiempo de latencia que ha manifestado en los ensayos de permeación.
  2. No se han apreciado diferencias estadísticamente significativas en el perfil de permeación de los ***Lipogeles*** ensayados en piel de oreja de conejo. Este resultado viene a confirmar el postulado que sostiene que la diversa consistencia de las preparaciones puede influir en los ensayos de cesión *in vitro* sin observarse una influencia significativa en el estudio de permeación *in vitro*. Las diferencias reológicas, por tanto, parecen no intervenir de

modo significativo en la biodisponibilidad del fármaco *in vivo*. Además, por tratarse el meloxicam de una molécula de tamaño molecular no elevado, su difusión en el vehículo no tiene por qué obedecer a este comportamiento que podríamos llamar reológico-dependiente según el cual las preparaciones más fluidas deberían liberar con más facilidad la molécula activa que aquéllas de mayor consistencia.

3. La aplicación de iontoforesis catódica ha logrado incrementar significativamente el flujo de meloxicam ( $p < 0,05$ ) vehiculizado en gel de carbopol aunque sin alcanzar los niveles producidos por los lipogeles.

- Con respecto a las *formulaciones cosméticas*:
  4. Durante el estudio organoléptico, reológico y de liberación ha resultado de elección el **Hidrogel 3** de AcVE que incluye Tween 80 en su composición, por su adecuada consistencia, extensibilidad y color así como por su comportamiento cinético en el ensayo de liberación del AcVE, según el cual se preveía la acumulación cutánea de la provitamina. Sin embargo, los bajos niveles de acumulación en el ensayo de permeación sobre piel de conejo nos orienta, más bien, hacia la elección de otras formulaciones.

5. El *Hidrogel 7*, por su parte, ha producido niveles de acumulación de AcVE adecuados así como un perfil reológico idóneo para la aplicación tópica del preparado. Para la optimización de la fórmula, sin embargo, habría que reducir la concentración de metanol para evitar un efecto desecante de la piel y potencialmente tóxico.
6. Los *Lipogeles 1 y 2 de AcVE* se mostraban idóneos según la caracterización organoléptica y reológica. Sin embargo, tanto en el ensayo de liberación como en el de permeación, estas formulaciones no han cedido la provitamina en cantidad suficiente debido a la excesiva afinidad físico-química entre el vehículo oleoso y el activo liposoluble por lo que no son capaces de llevar a cabo el efecto cosmético deseado.
7. Los perfiles de liberación y permeación de AcVE a partir de los *Lipogeles* no han presentado diferencias significativas por lo que el diverso comportamiento reológico de los mismos parece no influir en la biodisponibilidad del activo cosmético.

*Conclusions*

## CONCLUSIONS

These are the conclusions of the present work of investigation:

- As regards anti-inflammatory meloxicam preparations:
  1. *Lipogels* of meloxicam and, particularly, *Lipogel 2*, because of the physico-chemical interactions between the vehicle and the suspended active molecule, produce adequate levels of permeation through rabbit ear skin, which have a reasonable analogy with human skin. These lipogels have been characterized as plastics with such a viscoelastic behaviour that allow them to recover their structure when subjected to low shear stress. Their organoleptic characteristics –homogeneity, extensibility and texture- also contribute to the suitability of these formulae. For all these reasons, lipogels could be the vehicles of choice for the topical administration of meloxicam. However, there is a disadvantage related to the too long experimental time lag in permeation studies.
  2. We have not found significant statistical differences in the permeation profiles of the essayed lipogels. This result confirms the postulate according to which the different consistency of preparations could determine the *in vitro* release experiments but not the *in vitro* permeation ones. Rheological

differences do not seem to influence the *in vivo* bioavailability of the drug. The diffusion of the active molecule does not follow a rheology-dependent behaviour because of the low molecular weight of meloxicam. Therefore, the most fluid preparation – ***Lipogel 1***- does not present the highest release rate values.

3. The application of cathodic iontophoretic technique to the hydrogel leads to a significant increase in the diffusion flux of meloxicam ( $p < 0,05$ ) but these levels are still lower than those obtained from the lipogel permeation studies.

- As far as *cosmetic formulations of vitamin E acetate* (VEAc) are concerned:

***4.Hydrogel 3***, that includes VEAc with addition of Tween 80 as a surfactant has been considered a suitable vehicle of the provitamin, based on the organoleptic, rheological and release studies. This formula presents an adequate consistency, spreadability and colour as well as an appropriate profile of release kinetics. Right levels of accumulation could be expected for the provitamin and its metabolite in the skin after the permeation study on fresh rabbit ear skin. However, the low levels of both analytes quantified in epidermis and dermis after this permeation study indicate that this hydrogel is not appropriate for the administration of VEAc.

**5. Hydrogel 7** has produced adequate levels of accumulation of the active molecule in permeation studies as well as suitable rheological characteristics for the topical administration of the cosmetic product. Thus, *Hydrogel 7* could be the vehicle of choice for the rapid release and onset of the provitamin after topical application. It would be advisable to reduce the concentration of methanol to improve the quality of the formula and to avoid the drying up effect on the skin as well as the risk of toxicity.

**6. Lipogels 1 and 2 with VEAc** have been characterized from organoleptic and rheological points of view showing right properties for the topical administration of the preparations. However, their release and permeation profiles have not been found acceptable due to a too high physico-chemical affinity between the oily vehicles and the liposoluble active compound. Therefore, they cannot perform the desired cosmetic effect.

7. Release and permeation profiles of VEAc from both **Lipogels** have not showed significant differences so it can be concluded that the different rheological behaviours of the formulae does not influence the bioavailability of the cosmetic compound.

## *BIBLIOGRAFÍA*

## **BIBLIOGRAFÍA**

Aiache JM. "Biofarmacia", Editorial El Manual Moderno (1983)

Aiache JM. New gelification method for vegetable oils I: Cosmetic applications. *Int J of Cosmet Sci*, 14: 228-232 (1992)

Alvarez-Román R, Merino G, Kalia YN, Naik A, Guy RH. Skin permeability enhancement by low-frequency sonophoresis: lipid extraction and transport pathways. *Pharm Sci*, 92: 1138-1146 (2003)

Amari S, Bregaglio G. Olivem 700 e Olivem 900- Dall'olivo due emulsionanti dotati di grande versatilità, funzionalità e grandevolezza cosmetica. *Cosmetic News*, 109-114 (1996)

Amari S, Orta V, Roig N. Derivados del aceite de oliva: nuevos componentes de aplicación en fórmulas cosméticas. *NCP Documenta*, 236: 11-13 (1998)

Amorosa M. "Principi di tecnica farmaceutica", Libreria Universitaria L. Tinarelli, Bologna, Cap. 26: 335 (1986)

Armijo M, Camacho F. "Tratado de Dermatología", Vol. 1: 3. Libros Princeps. Biblioteca Aula Médica. Madrid (1998)

Artusi M, Nicoli S, Colombo P, Bettini R *et al.* Effect of chemical enhancers and iontophoresis on thiocolchicoside permeation across rabbit and human skin *in vitro*. *J Pharm Sci*, 93 (10): 2431-2438 (2004)

Auner BG, Valenta C. Influence of phloretin on the skin permeation of lidocaine from semisolid preparations. *Eur J of Pharm and Biopharm*, 57 (2): 307-312 (2004)

Barry BW. "Dermatological formulations percutaneous absorption": 145. Marcel Dekker Inc. New York (1983)

Ben Miled DD, Smaoui A, Zarrouk M, Chérif A. Do extraction procedures affect olive oil quality and stability? *Biochem Soc Trans*, 28: 929-933 (2000)

Benson HAE. Transdermal Drug Delivery: Penetration enhancement Techniques. *Current Drug Delivery*, 2 (1): 23-33 (2005)

Berton TR, Conti CJ, Mitchell DL. The effect of vitamin E acetate on ultraviolet-induced mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinogen*, 23 (3); 175-184 (1998)

Billmeyer EW. "Textbook of Polymer Science", 3<sup>a</sup> Edición. Wiley-Interscience. New York (1984)

Bonina F, Lanza M, Montenegro L *et al.* Transport of alpha-tocopherol and its derivatives through erythrocyte membranes. *Pharmaceut Res*, 13 (9): 1343-1347 (1996)

Boylan JC, Swarbrick J. "Gels and jellies". En: "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", Vol. 6: 415. New York (1988)

Bravesh Dasandi, Shivaprakash, Sarej H, Bhat KM. LC determination and pharmacokinetics of meloxicam. *J Pharmaceut Biomed*, 28: 999-1004 (2002)

Bronaugh RL, Maibach HI. "Percutaneous absorption. Drugs, cosmetics, mechanisms, methodology" 3<sup>a</sup> Edición. Culinary and Hospitality Industry Publications Services (2005)

Buckin V, Kudryashov E. Ultrasonic shear wave rheology of weak particle gels. *Adv Colloid Interface Sci*, 89-90: 401-22 (2001)

Budiyanto A, Ahmed NU, Wu A, Bito T *et al.* Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB exposure of mice. *Carcinogenesis*, 21 (11): 2085-90 (2000)

Burrell H. "Polymer Handbook", IV: 337 (1975)

Cantera RC. "Características de estado sólido, formación de complejos y propiedades en disolución del tenoxicam". Tesis Doctoral. Universidad de Navarra. Pamplona (1995)

Carafa M, Santucci E, Lucania G. Lidocaine-loaded non-ionic surfactant vesicles: characterization and in vitro permeation studies. *Int J Pharm*, 231 (1): 21-32 (2002)

Chronakis IS, Doublier JL, Piculel L. Viscoelastic behaviour for kappa- and iota-carrageenan in aqueous NaI from the liquid-like to the solid-like behaviour. *Int J Biol Macromol*, 28: 1-14 (2000)

Ciement-Lacroix P, Micheli L, Moysan A. UVA-induced immunosuppression in human skin: protective effect of vitamin E in human epidermal cells in vitro. *Br J Dermatol*, 134 (1): 77-84 (1996)

Colombo G, Zucchi A, Allegra F *et al.* In vitro and in vivo study of 5-Methoxypsoralen skin concentration after topical application. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 16: 130-136 (2003)

Colombo P, Catellani PL, Gazzaniga A *et al.* "Principi di tecnologie farmaceutiche". Casa editrice Ambrosiana, Cap. 9: 459. Milano (2004)

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (CGCOF). "Catálogo de Especialidades Farmacéuticas". Madrid (2004)

Couarraze G, Grossiord JL. "Initiation à la rhéologie. Technique et documentation", Lavoisier. Paris (1983)

Darr D, Dunston S, Faust H. Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants. *Acta Derm-Venereol*, 76 (4): 264-268 (1996)

Davis SS. Viscoelastic properties of pharmaceutical semisolids I: ointment bases. *J Pharm Sci*, 58: 412-418 (1969)

De Vicente J, Durán J, Delgado A. Electrokinetic and viscoelastic properties of magnetorheological suspensions of cobalt ferrite. *Colloid Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 195: 181-188 (2001)

Deem DE. "Rheology of Dispersed Systems". En: Lieberman HA, Rieger MM y Banker GS. "Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems" Marcel Dekker, Inc: 367. New York (1988)

Del Pozo A. "Pomadas, lipogeles, cremas y pastas". En: Faulí i Trillo C. "Tratado de Farmacia Galénica", Luzón 5, S.A. de Ediciones: 625. Madrid (1993)

Del Río RM y Del Río J. "Antiinflamatorios no esteroideos. Fármacos antirreumáticos y antigotosos". En: "Farmacología Básica", Editorial Síntesis, S.A.: 168. Madrid (2000)

Dequeker J, Hawkey C, Cahan A *et al.* Improvement in gastrointestinal tolerability of the selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitor, meloxicam, compared with piroxicam: results of the safety and efficacy large-scale evaluation of COX-inhibiting therapies (SELECT) trial in osteoarthritis. *Br J Rheumatol*, 37 (9): 946-51 (1998)

Doliwa A, Santoyo S, Campanero MA, Ygartua P. Sensitive LC determination of piroxicam after in vitro transdermal permeation studies. *J Pharmaceut Biomed*, 26: 531-537 (2001)

Dolz-Planas M, Roldan-García C. Thixotropy of different concentrations of microcrystalline cellulose:sodium carboxymethyl cellulose gels. *J Pharm Sci*, 80 (1): 75-79 (1991)

Doménech J, Martínez J, Plá JM. "Biofarmacia y Farmacocinética, Vol. 2: Biofarmacia": 407. Síntesis. Madrid (1998)

Dreher F, Denig N, Gabard B. Effect of topical antioxidants on UV-induced erythema formation when administered after exposure. *Dermatology*, 198 (1): 52-55 (1999)

Dreher F, Gabard B, Schwindt DA. Topical melatonin in combination with vitamins E and C protects skin from ultraviolet-induced erythema: a human study in vivo. *Brit J Dermatol*, 139 (2): 332-339 (1998)

Dubertret I. "UVA and oxidative stress. Protection of the skin against ultraviolet radiations" Rougier A, Schaefer H. Eds. John Libbey Eurotext: 23-31. Paris (1998)

El Gendy JM, Jun HW, Kassem AA. In vitro release studies of flurbiprofen from different topical formulations. *Drug Develop Ind Pharm*, 28 (7): 823-831 (2002)

Everett DW, Olson NF. Dynamic Rheology of Renneted Milk Gels Containing Fat Globules Stabilized with Different Surfactants *J Dairy Sci*, 83 (6): 1203-1208 (2000)

Ferry JD. Protein gels. *Adv Protein Chem*, 4: 1-82 (1948)

Ferry JD. "Viscoelastic Properties of Polymers", 3ª Edición. Wiley. New York (1980)

Finzi A, Marinovich M. "Dermofarmacologia". UTET, Cap. 1. Torino (1998)

Flory PJ, *Discuss. Faraday Soc*, 57: 7-12 (1974)

Ford JL, Timmins P. "Pharmaceutical thermal analysis. Technics and applications", Ellis Horwood Series in Pharmaceutical Technology. West Sussex (1989)

Franz TJ. The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption. *Curr Probl Dermatol*, 7: 58-68 (1978)

Fuchs J, Milbradt R. Antioxidant exhibition of skin inflammation induced by reactive oxidants: evaluation of the redox couple dihydrolipoate/ lipoate. *Skin Pharmacol*, 7: 278-284 (1994)

Fukasawa J. New oil-gelling agents for cosmetics: formation mechanism of oil gels. *Int J of Cosmet Sci*, 11: 153 (1989)

Gallardo V, Aybar N, Hernández A, Ruiz MA. Sunscreen formulation: A study of silicone-emulsifiant concentration. *J Appl Cosmetol*, 16: 37-44 (1998)

Gallardo V, Muñoz M, Ruiz MA. Formulations of hydrogels and lipogels with vitamin E. *J Cos Derm*. Aceptado: Diciembre 2004. In Press.

García H. "Valoración sensorial de los aceites de oliva vírgenes". En: Mataix J. "Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario", Vol. 1: 137. Editorial Universidad de Granada (2001)

García ME. "Síntesis y caracterización de un látex de etilcelulosa como transportador de glucocorticoides en formas farmacéuticas tópicas": 73. Tesis Doctoral. Universidad de Granada (2002)

García de Jalón E, Blanco-Prieto MJ, Ygartua P, Santoyo S. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers. *J Control Release*, 75: 191-197 (2001)

Geinoz S, Guy RH, Carrupt PA, Testa B. Quantitative structure-permeation relationships (QSPeRs) to predict skin permeation: A critical evaluation. *Pharm Res*, 21: 83-92 (2004)

Gennaro AR, Chase GD, Marderosian AD, Hanson GR *et al*. "Remington. Farmacia", 19ª Edición. Tomo 1: 426. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires (1998)

Gennaro AR, Chase GD, Marderosian AD, Hanson GR *et al*. "Remington. Farmacia", 19ª Edición. Tomo 2: 1290. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires (1998)

Gensler HL, Aickin M, Peng YM. Importance of the form of topical vitamin E for prevention of photocarcinogenesis. *Nutr Cancer*, 26 (2): 183-191 (1996)

Gensler HL, Magdaleno M. Topical vitamin E inhibition of immunosuppression and tumorigenesis induced by ultraviolet irradiation. *Nutr Cancer*, 15 (2): 97-106 (1991)

González-Rodríguez M, Holgado M, Sánchez-Lafuente C, Rabasco A *et al.* Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release. *Int J Pharm*, 232: 225-234 (2002)

Goodman A, Goodman LS, Gilman A. “Las bases farmacológicas de la terapéutica”, Editorial Médica Panamericana: 675. Buenos Aires (1981)

Gottlob P, Krahn G, Peter RU. Cutaneous radiation syndrome: clinical features, diagnostic criteria and therapy. *Hautarzt*, 51 (8): 567-574 (2000)

Greminger GK. “Encyclopedia of Chemical Technology”, Vol. 5: 143. Interscience Encyclopedia Inc. New York (1978)

Gupta RR, Jain SK, Varshney M. AOT water-in-oil microemulsions as a penetration enhancer in transdermal drug delivery of 5-fluorouracil. *Colloid Surface B Biointerfaces*, 41 (1): 25-32 (2005)

Gupta SK, Bansal P, Bhardwaj RK *et al.* Comparison of analgesic anti-inflammatory activity of meloxicam gel with diclofenac and piroxicam gels in animal models: Pharmacokinetic parameters after topical application. *Skin Pharmacol*, 15: 105-111 (2002)

Guy RH, Yogeshvar NK, Delgado-Charro MB *et al.* Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. *J Control Release*, 64: 129-132 (2000)

Guy RH, Delgado-Charro MB, Kalia YN. Iontophoretic Transport across the Skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14: 35-40 (2001)

Haighton AJ. Blending, chilling and tempering of margarines and shortenings. *J Am Oil Chem Soc*, 36: 345-348 (1959)

Hallywell B. "Reactive oxygen species in pathology with special reference to the skin" En: Fuchs J, Packer L. "Oxidative Stress in Dermatology". Eds. Marcel Dekker Inc.: 3-11 New York (1993)

Hartmann A, Niess AM, Grünert-Furchs M *et al.* Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutation Research*, 346 (4): 195-202 (1995)

Hernández M, Mercier-Fresnel MM. "Les vitamines. Les oligo-éléments". En: "Dossier de l'esthétique cosmétique. Préparation aux examens d'Etat", Maloigne: 256. Paris (1988)

Houwink R. "Elasticity, Plasticity and Structure of Matter", 2<sup>a</sup> Edición. Harren Press. Washington D.C. (1953)

Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill *et al.* Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated  $\beta$ -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer. *J Agric Food Chem*, 50: 1815-1821 (2002)

Hunter RJ. "Foundations of Colloid Science", Vol. 2. Claredon Press. Oxford (1989)

Ichihashi M, Ahmed NU, Budiyanto A *et al.* Preventive effect of antioxidant on ultravioletinduced skin cancer in mice. *J Dermatol Sci*, 23 (1): 545-550 (2000)

Idson B. Vehicle effects in percutaneous absorption. *Drug Metab Rev*, 14 (2): 207-222 (1983)

Iza M, Stoianovici G, Viora L. Hydrogels of poly(ethyleneglycol): mechanical characterization and release of a model drug. *J Control Release*, 52 (1-2): 41-51 (1998)

Jain AK, Panchagnula R. Transdermal delivery of imipramine hydrochloride: Development and evaluation (*in vitro* and *in vivo*) of reservoir gel formulation. *Biopharm Drug Dispos*, 26 (2): 41-49 (2004)

Jung HD, Holzegel K. Contact allergy to olive oil. *Derm Beruf Umwelt*, 35 (4): 131-133 (1987)

Kählig H, Valenta C, Dampfhart U, Auner BG. Rheology and NMR self-diffusion experiments as well as skin permeation of diclofenac-sodium and cyproterone acetate of new gel preparations. *J Pharm Sci*, 94: 288-296 (2005)

Krol ES, Kramer-Stickland KA, Liebler DC. Photoprotective actions of topically applied vitamin E. *Drug Metab Rev*, 32 (3-4): 413-420 (2000)

Kuriyama K, Shimizu T, Horiguchi T *et al.* Vitamin E ointment at high dose levels suppresses contact dermatitis in rats by stabilizing keratinocytes. *Inflamm Res*, 51 (10): 483-489 (2002)

Lampen P, Pittermann W, Heise HM *et al.* "Quantification of vitamin E-acetate (cosmetic formulations) in the stratum corneum of an in vitro model by tape stripping, UV spectroscopy and HPLC-method" Stratum Corneum III, Oral presentation 09. Basel, Sept 12-14 (2001)

Lissarrague JC, Frank MF. "La protección de la piel. El sol". En: "Cosmetología teórico-práctica". Publicaciones del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos: 163. Madrid (1978)

López RFV, Bentley MVLB, Delgado-Charro MB, Salomon D *et al.* Enhanced delivery of 5-aminolevulinic acid esters by iontophoresis *in vitro*. *Photochem Photobiol*, 77: 304-308 (2003)

Loren N, Hermansson AM. Phase separation and gel formation in kinetically trapped gelatin/maltodextrin gels. *Int J Biol Macromol*, 27 (4): 249-262 (2000)

Luger P, Daneck K, Engel W *et al.* Structure and physicochemical properties of meloxicam, a new NSAID. *Eur J Pharm Sci*, 4: 175-187 (1996)

Makosco CW. "Rheology Principles, Measurements and Applications", VCH Publishers Inc. (1994)

Malmkvist Padoan S, Pettersson A, Svensson A. Olive oil as a cause of contact allergy in patients with venous eczema, and occupationally. *Contact Dermatitis*, 23 (2): 73-79 (1990)

Manzur-Ul-Haque H. "Vitamine E ( $\alpha$ -Tocopherol)". En: "Assay of vitamins in pharmaceutical preparations", John Wiley & Sons: 360. Bristol (1973)

Marconi B, Mancini F, Colombo P *et al.* Distribution of khellin in excised human skin following iontophoresis and passive dermal transport. *J Control Release*, 60: 261-268 (1999)

Mc Vean M, Liebler DC. Prevention of DNA photodamage by vitamin E compounds and sunscreens: Roles of ultraviolet absorbance and cellular uptake. *Mol Carcinogen*, 24 (3): 169-176 (1999)

Medina JM, Sánchez de Medina F, Vargas AM. "Bioquímica". Edit. Síntesis: 85. Madrid (1996)

Mo Y, Kubota K, Nishinari K. Rheological evidence of the gelation behavior of hyaluronan-gellan mixtures. *Biorheology*, 37 (5-6): 401-8 (2000)

Moison RMW, Doerga R, Van Henegouwen GMJB. Increased antioxidant potencial of combined topical vitamin E and C against lipid peroxidation of eicosapentaenoic acid in pig skin induced by simulated solar radiation. *Int J Radiat Biol*, 78 (12): 1185-1193 (2002)

Muñoz M. "Nutrición aplicada y dietoterapia": 435. EUNSA. Pamplona (1999)

Narishetty STK, Panchagnula R. Effect of 1-menthol and 1,8-cineole on phase behavior and molecular organization of SC lipids and sk of zidovudine. *J Contr Rel*, 102 (1): 59-70 (2005)

Nicoli S, Amoretti V, Colombo P, Santi P. Bioadhesive transdermal film containing caffeine. *Skin Pharmacol Physiol*, 17: 119-123 (2004)

Nicoli S, Cappellazzi M, Colombo P, Santi P. Characterization of the permselective properties of rabbit skin during transdermal iontophoresis. *J Pharm Sci*, 92 (7): 1482-1488 (2003)

Nicoli S, Colombo P, Santi P. Release and permeation kinetics of caffeine from bioadhesive transdermal films. *The AAPS Journal*. In Press (2005)

Nielsen IE. "Mechanical Properties of Polymers and Composites", Vol. 2. Dekker. New York (1974)

Noble S, Balfour BJ. Meloxicam. *Drugs*, 3: 424-430 (1996)

Oh SY, Guy RH. Effects of iontophoresis on the electrical properties of human skin in vivo. *Int J Pharm*, 124: 137-142 (1995)

Ostacolo C, Marra F, Laneri S, Sacchi A.  $\alpha$ -Tocopherol pro-vitamins: synthesis, hydrolysis and accumulation in rabbit ear skin. *J Control Release*, 99: 403-413 (2004).

Paulisch M. "Pomadas". En: "Tecnología Farmacéutica": 176. Acribia. Zaragoza (1981)

Pena L. "Gel dosage forms: theory, formulations and processing. Topical drug delivery formulations": 381. Marcel Dekker Inc. New York (1990)

Peyrefitte G. "Dermocosmética y Estética. Vol. 1: Biología de la piel": 3. Masson. Barcelona (1995)

Pinnell SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress and topical antioxidant protection. *J Am Acad Dermatol*, 48 (1): 1-19 (2003)

Pons L, Parra JL. "Ciencia Cosmética. Bases fisiológicas y criterios prácticos": 90. Publicaciones del CGCOF. Madrid (1995)

Prouse PJ, Bevis BJ, Bluhmki E *et al.* Evaluation of the safety, tolerability and efficacy of meloxicam tablets in patients with osteoarthritis. *Clin Ther*, 18; 429-439 (1996)

Qiu HC, Mc Call JW, Jun HW. Formulations of topical insect repellent N, N-diethyl-m-toluamide (DEET): vehicle effects on DEET in vitro skin permeation. *Int J Pharm*, 163 (1-2): 167-176 (1998)

Quiroga MI, Guillot CF. "Cosmética dermatológica práctica", El Ateneo: 40, 50. Buenos Aires (1973)

Rainsford KD. Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Am J Med*, 107 (6A): 27-36 (1999)

Rangarajan M, Zatz JL. Skin delivery of vitamin E. *J Cosmet Sci*, 50 (4): 249-279 (1999)

Rangarajan M, Zatz JL. Effect of formulation on the delivery and metabolism of  $\alpha$ -tocopheryl acetate. *J Cosmet Sci*, 52: 225-236 (2001)

Real Farmacopea Española (RFE), 2ª Edición 2002. Suplemento, 2.1: 2923

Realdon N, Dal Zotto M, Ragazzi E, Dalla Fini G. Drug release from lipogels according to gelling conditions and mechanical treatment. *Drug Develop Ind Pharm*, 22 (2): 125-134 (1996)

Realdon N, Ragazzi E, Ragazzi E. Effect of gelling conditions and mechanical treatment on drug availability from a lipogel. *Drug Develop Ind Pharm*, 27 (2): 165-70 (2001)

Ree T, Eyring H. "Rheology", Vol. 2. Academic. New York (1958)

Reiner M. "Deformation, Strain and Flow", 2ª Edición. Interscience. New York (1960)

Rekhi GS, Jambhekar SS. Ethylcellulose-A polymer review. *Drug Dev Ind Pharm*, 21: 61-77 (1995)

Rhodes LE. Topical and systemic approaches for protection against solar radiation-induced skin damage. *Clin Dermatol*, 16 (1): 75-82 (1998)

Rigano L, Leporatti R, Maramaldi G. Olivem 900: Make up e skin care. *Cosmetic News*, XXII, 126: 211-215 (1999)

Rigano L, Trenti R, Maramaldi G. Ottimizzazione applicativa di un emulsionanti derivato dall' olio di oliva. *Cosmetic News*, XXII, 124: 42-46 (1999)

Rodríguez F, Michaud P, Lovera V. Les produits gélifiants. Caractérisation et évaluation pour un dossier pharmaceutique. *Sci Techn Pharm, Pharma Pratiques* 9 (hors-série): 15-18 (1999)

Rosado C, Rodrigues, LM. Solvent effects in permeation assessed *in vivo* by skin surface biopsy. *BMC Dermatology*, 3: 5-9 (2003)

Ruiz MA, Muñoz M, García JD, Gallardo V. Meloxicam release study from oilgels of olive oil. Received: 15 Dec 2004. In Press.

Ruiz MA, Muñoz M, Morales ME, Gallardo V. Influence of gelling agent on the rheological characteristics of oleogels. *Il Farmaco*, 58: 1289-1294 (2003)

Santoyo S. "Absorción percutánea de piroxicam: desarrollo de una formulación tópica" Tesis Doctoral. Universidad de Navarra. Pamplona (1996)

Schick MJ. "Physiological activity of non-ionic surfactants. Effects on the skin". En: "Nonionic surfactants": 954. Marcel Dekker Inc. New York (1967)

Schicksnus G, Müller-Goymann CC. Lateral diffusion of Ibuprofen in Human Skin during Permeation Studies. *Skin Pharmacol*, 17: 84-90 (2004)

Sebastiani P, Nicoli S, Santi P. Effect of lactic acid and iontophoresis on drug permeation across rabbit ear skin. *Int J Pharm*. In Press (2005)

Sherman P. "Industrial Rheology", Academic. New York (1970)

Sieg A, Guy RH, Delgado-Charro MB. Electroosmosis in transdermal iontophoresis: Implications for non-invasive and calibration-free glucose monitoring. *Biophys J*. In Press (2004)

Singh S y Sing J. Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: a review. *Med Res Rev*, 13(5): 569-621 (1993)

Smith JC, Irwin WJ. Ionisation and the effect of absorption enhancers on transport of salicylic acid through silastic rubber and human skin. *Int J Pharm*, 210 (1-2): 69-82 (2000)

Society of Great Britain. "Handbook of Pharmaceutical Excipients": 281. The Pharmaceutical Press. London (1983)

Sorg O, Tran C, Saurat JH. Cutaneous vitamin A and E in the context of ultraviolet- or chemically-induced oxidative stress. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14 (6): 363-372 (2001)

Stein P, Kruss B, Wiegand J, Trach V. Local tissue tolerability of meloxicam, a new NSAID: indications for parenteral, dermal and mucosal administration. *Br J Rheumatol*, 35 (1): 44-50 (1996)

Strohecker R, Henning HM. "Análisis de vitaminas. Métodos comprobados", Edit. Paz Montalvo: 343. Madrid (1967)

Suzuki YJ, Touchiya M, Wassal SR, Choo YM *et al*. Structural and dynamic membrane properties of  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry*, Vol 32 (40): 10692-10699 (1993)

Terech P, Rossat C, Volvio F. On the Measurement of Phase Transition Temperatures in Physical Molecular Organogels. *J Colloid Interface Sci*, 227 (2): 363-369 (2000)

Torrallba A. "Histología y fisiología de la piel y sus anejos. Aspectos básicos e implicaciones cosméticas". En: "Cosmetología teórico-práctica": 13. Publicaciones del CGCOF. Madrid (1978)

Touitou E, Meidan VM, Herwitz E *et al*. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *J Control Release*, 56 (1-3): 7-21 (1998)

Trevithick JR, Mitton KP. Topical application and uptake of vitamin E acetate by the skin and conversion to free vitamin E. *Biochem Mol Biol Int*, 31 (5): 869-78 (1993)

Trevithick JR, Shum DT, Redae S *et al.* Reduction of sunburn damage to skin by topical application of vitamin E acetate following exposure to UVB radiation: effect of delaying application of vitamin E acetate applied. *Scanning Microsc*, 7 (4): 1269-81 (1993)

Trevithick JR, Xiong H, Lee S *et al.* Topical tocopherol acetate reduces post-UVB sunburn-associated erythema, edema and skin sensitivity in hairless mice. *Arch Biochem Biophys*, 296 (2): 575-82 (1992)

Trivedi JS, Krill SL, Fort JJ. Vitamin E as a human skin penetration enhancer. *Eur J Pharm Sci*, 3 (4): 241-243 (1995)

Tsai RS, Carrupt PA, El Tayar N *et al.* Physicochemical and Structural Properties of Non-steroidal Anti-inflammatory Oxicams. *Helv Chim Acta*, Vol. 76: 842-854 (1993)

Tunich MH. Rheology of Dairy Foods that Gel, Stretch, and Fracture. *J Dairy Sci*, 83 (8): 1892 (2000)

Turck D, Busch U, Heinzl G, Narjes H. Clinical pharmacokinetics of meloxicam. *Arzneimittelforschung*, 47 (3): 253-258 (1997)

USP 23/NF 18: U.S. Pharmacopeia/ National Formulary, 1995. United States Pharmacopeial Convention, Inc: 1797. Rockville, M.D. (1994)

Valenta C, Schultz K. Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsions formulations. *J Control Release*, 95: 257-265 (2004)

Van Wazer JR *et al.* "Viscosity and Flow Measurement", Interscience. New York (1963)

Velpandian T, Jaiswal J, Bhardwaj RK, Gupta SK. Development and validation of a new high-performance liquid chromatographic estimation method of meloxicam in biological samples. *J Chromatogr B: Biomed Appl*, 738 (2): 431-436 (2000)

Vicente J, Durán J, Delgado A. Electrokinetic and viscoelastic properties of magnetorheological suspensions of cobalt ferrite. *Colloid Surface A*, 195: 181-188 (2001)

Vogelsang C, Wijffels RH, Ostgaard K. Rheological properties and mechanical stability of new gel-entrapment systems applied in bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 70 (3): 247-253 (2000)

Voigt R, Bornschein M. "Ungüentos y pomadas". En: "Tratado de Tecnología Farmacéutica": 297. Acribia. Zaragoza (1982)

Volpato NM, Santi P, Colombo P. Iontophoresis enhances the transport of acyclovir through nude mouse skin by electrorepulsion and electrosmosis. *Pharm Res*, 12 (11): 1623-1627 (1995)

Voyt WF. Method of and composition for preventing sunburn while affording tanning. *United States Patent*, 4: 144-325 (13-Marzo-1979)

Walters K. "Rheometry-Industrial Applications", Wiley. New York (1980)

Welin-Berger K, Neelissen JAM, Bergenstah B. The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. *Eur J Pharm Sci*, 13 (3): 309-318 (2001)

Widmann G, Riesen R. "Thermal analysis. Terms, methods, applications", Friedrich Oehme Hüthig: 70 (1987)

Wilkinson WL. "Non Newtonian Fluids", Pergamon. New York (1960)

Wolf R, Wolf D, Ruocco V. Vitamin E: The radical protector. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 10 (2): 103-117 (1998)

*ANEXOS*

## ANEXO I.1. TÉCNICA DE OBTENCIÓN DE PIEL ANIMAL

El estudio de permeación transdérmica en células de difusión de Franz requiere el empleo de piel humana o animal a través de la cual se verifique el paso del fármaco al interior de la misma.

La bibliografía describe diversos métodos de obtención de piel tanto humana como animal (Doliwa A, 2001; Pons L, 1995) en los que es frecuente el empleo de dermatomos manuales o automáticos.

La técnica de dermatomización de piel de cerdo con dermatomo automático, en particular, fue aprendida por la doctoranda en la Estancia Breve concedida por el MEC en el Centro Galénico de la Facultad de Farmacia (Universidad de Navarra, Pamplona) los meses de Junio-Agosto de 2002.

Esta técnica nos permite obtener piel dermatomizada, es decir, exenta de dermis, de un determinado grosor establecido por un dermatomo, idónea para los estudios de permeación "in vitro" en celdas de difusión de Franz.

Se procede del siguiente modo:

Una vez obtenidas las orejas de cerdo gracias a la donación del Matadero Municipal de Navarra se procede al lavado con agua corriente de las mismas. Se colocan sobre una tabla de corcho, extendidas, fijándolas a la tabla con agujas para tensarlas de modo que quede

expuesta la parte externa de la oreja. Con un bisturí de cirugía se señala la máxima porción de piel aprovechable y se procede a separar la piel del cartílago y otros tejidos procurando no dañarla -evitando hacer incisiones que la rasguen o dejar restos de otros tejidos-. El trozo de piel extraído se conserva en un vaso de precipitado lleno de agua para que no se reseque.

Obtenidos, así, varios trozos se colocan de uno en uno sobre una tabla de corcho, extendidos, tensándolos por los extremos con ayuda de agujas. Se realiza una incisión longitudinal en la piel de unos 4 cm y, con el dermatomo, se procede al corte de la superficie de la piel. Se observa al trasluz por transparencia la homogeneidad en el espesor del corte. Debe ser homogéneo para asegurar durante el ensayo en las celdas de Franz la misma capacidad de difusión del fármaco en todos los puntos de la piel. Antes de los ensayos de permeación, la piel se debe observar al microscopio para verificar la integridad de la misma.

La piel dermatomizada se fragmenta en trozos de unos 9 cm<sup>2</sup>. Se envuelve cada trozo, extendido, en parafilm y se congelan hasta su utilización.

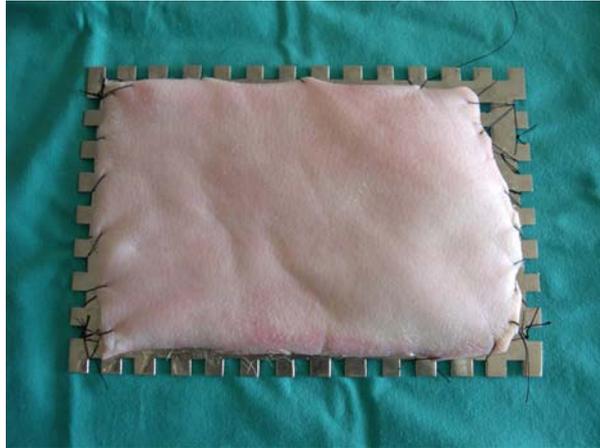
Se utiliza el cerdo como modelo de experimentación animal por tratarse de la especie animal cuya piel presenta mayor analogía con la humana para, después, poder extrapolar los valores de absorción percutánea al hombre.

Estudio comparativo con la piel humana:

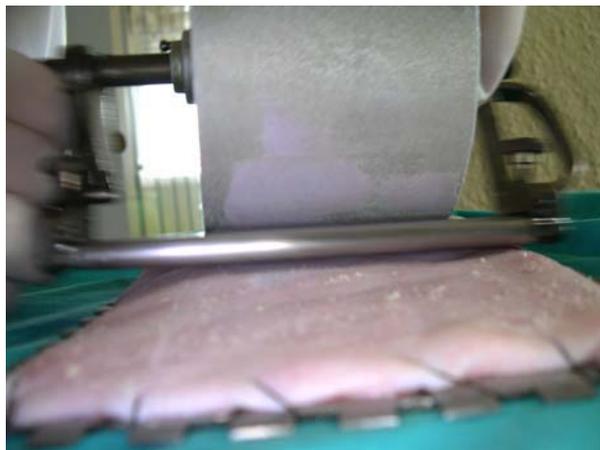
<b>Estrato de piel</b>	<b>Localización</b>	
Estrato córneo	100 $\mu\text{m}$	}
Epidermis	100-200 $\mu\text{m}$	
Dermis	200-500 $\mu\text{m}$	
Estrato córneo	40 $\mu\text{m}$	} PIEL HUMANA
Epidermis	115-120 $\mu\text{m}$	
Dermis	460 $\mu\text{m}$	

En este trabajo se ha ensayado la posibilidad de extraer piel de cerdo –previamente sacrificado en la Unidad de Cirugía Experimental del Edificio Licinio de la Fuente del Servicio Andaluz de Salud (SAS), de Granada- para ser posteriormente dermatomizada con ayuda de un dermatomo manual, por no disponer de uno automático.

A continuación se muestran algunas fotografías del procedimiento de extracción de la piel de cerdo.



**Fotografía 1.** Preparación de la muestra de piel de cerdo: Extensión y tensión de la misma sobre porta metálico –al que va cosida con hilo de seda- con objeto de alisar al máximo la superficie cutánea.



**Fotografía 2.** Aplicación del dermatomo sobre la piel previamente desengrasada con éter y pulverizada con adherente para facilitar la fijación y contacto entre ambas superficies.



**Fotografía 3.** Injerto de piel de cerdo extraído según el procedimiento descrito anteriormente sobre gasa estéril impregnada de solución salina.

Una vez realizadas las extracciones de los injertos se colocan sobre gasas humectadas en solución salina y se enrollan en ellas para su congelación.

Aproximadamente una hora antes de su utilización, se sacan del congelador y se sumergen los injertos en solución tamponada o bien en el medio receptor del ensayo en celdas de Franz.



**Fotografía 4.** Método manual de extracción de piel de la parte interna de oreja de conejo con bisturí de cirugía (Lab<sup>o</sup> Departamento Farmacéutico de Parma, Italia).



**Fotografía 5.** Porción de injerto parcialmente extraído de la oreja de conejo según procedimiento manual.

## ANEXO I.2. CELDAS DE DIFUSIÓN DE FRANZ.



**Fotografía 6.** Celda de Franz de vidrio con doble cámara de cristal para la recirculación de agua atemperada en un baño (17 ml aprox de capacidad). Se empleó en el ensayo de cesión.



**Fotografía 7.** Montaje en serie de celdas de Franz.

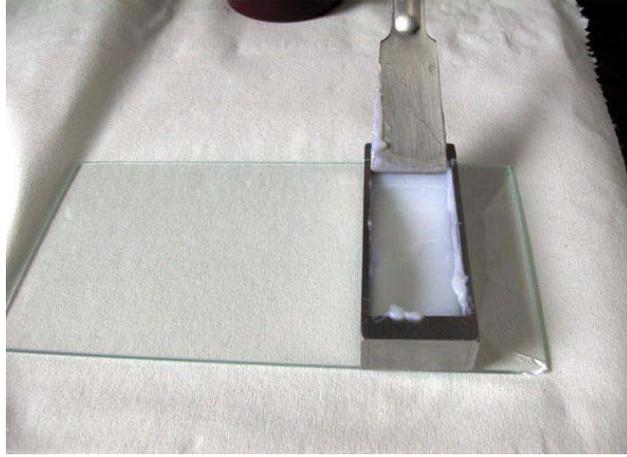


Camino de Jayena s/n,  
18620 (Alhendin) Granada, ESPAÑA  
Tel: 34-958-576486 Fax: 34-958-576389

**ANEXO II. CARACTERIZACIÓN ORGANOLÉPTICA: ANÁLISIS DE EXTENSIBILIDAD (FOTOGRAFÍAS DE LAS EXTENSIONES DE LIPOGELES E HIDROGELES REALIZADAS EN DOMCA, SA (25/05/2004)**

Para completar la caracterización de las fórmulas se llevó a cabo un estudio organoléptico que muestra el aspecto de las fórmulas ya que, por tener algunas de ellas un destino exclusivamente cosmético, resulta de gran interés. Y éste no sólo en cuanto a la aceptabilidad de tales formulaciones con vistas a su salida comercial sino porque, al verificarse la ausencia de discontinuidades o formación de orificios al ser extendidas, queda asegurado el contacto del activo cosmético –vitamina E- con toda la superficie cutánea expuesta.

Las primeras fotografías muestran el procedimiento sencillo de manejo del extensiómetro. Dicho dispositivo consta de lados que podríamos definir como asimétricos; es decir, que cada pared lateral permite ceder el producto bajo una determinada altura –200, 300, 400, 500 µm- permitiendo la extensión de una capa de gel de espesor uniforme.



**Fotografía 1.** Aplicación del preparado cosmético –hidrogel de vitamina E (2%)- en el interior del extensiómetro sobre una placa de vidrio



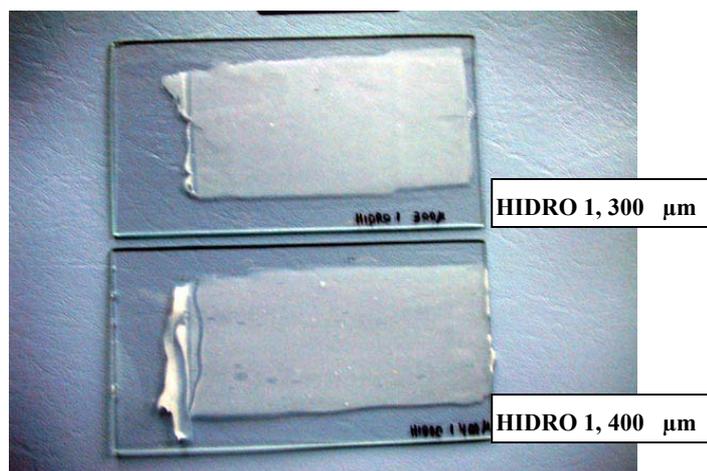
**Fotografía 2.** Procedimiento de extensión del preparado sobre placa de vidrio por deslizamiento del extensiómetro sobre ella.



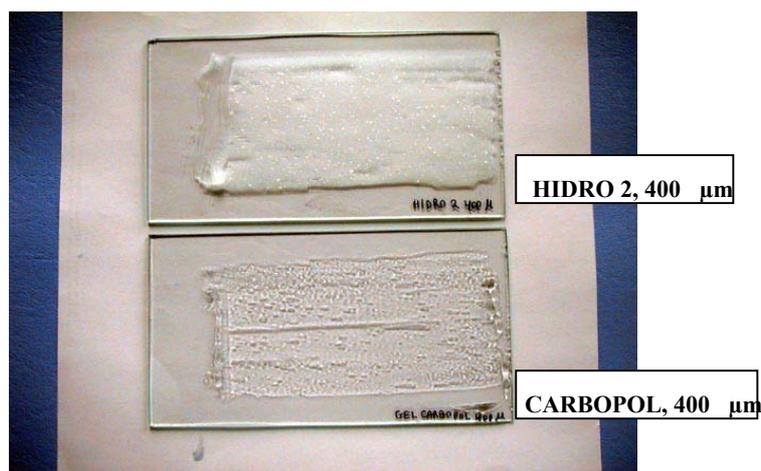
**Fotografía 3.** Fotografía de una extensión de 300 µm de la fórmula *hidrogel 1* con vitamina E (2%) –incorporada en PEG (400:1500, a/a al 5%) sobre placa de vidrio. Se muestra el extensiómetro en el extremo de la placa.



**Fotografía 4.** Fotografía de una extensión de 300 µm de la fórmula *hidrogel 1* con vitamina E (2%) sobre placa de vidrio.

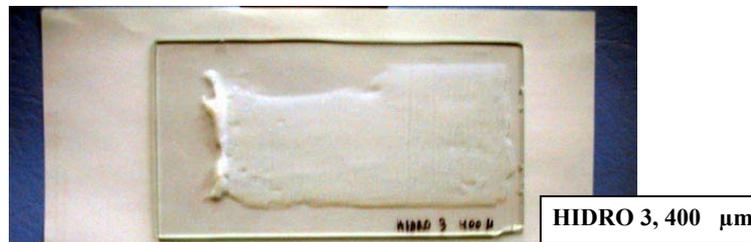


**Fotografía 5.** En la parte superior se muestra una extensión de 300  $\mu\text{m}$  de la fórmula *hidrogel 1* con vitamina E (2%) sobre placa de vidrio y, debajo, una de 400  $\mu\text{m}$  de la misma fórmula. La preparación forma una película uniforme sobre el vidrio con independencia de su espesor que presupone la adhesividad y adecuada extensibilidad sobre el estrato córneo.

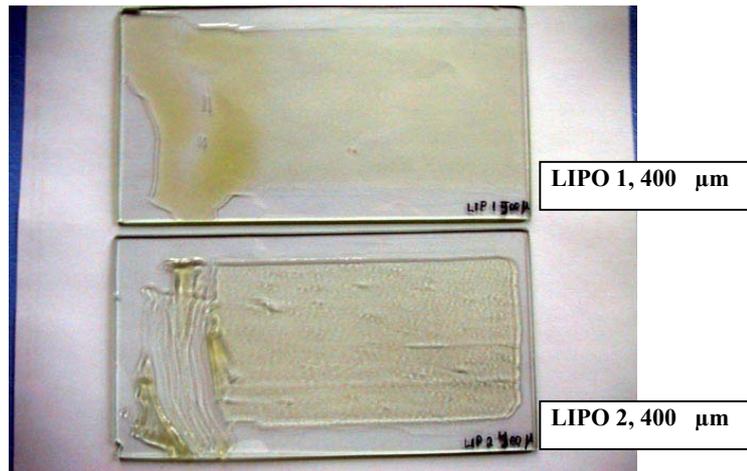


**Fotografía 6.** La placa superior muestra una extensión de 400  $\mu\text{m}$  de *hidrogel tipo 2* con vitamina E (2%) –incorporada en Olivem 700, al 10%–

que manifiesta una capacidad filmógena y adherente inferior al *hidrogel 1* ya que da lugar a algunas discontinuidades en la lámina extendida. Además, se evidencian ciertos grumos debidos a la solidificación del tensioactivo –de naturaleza cérea- en el proceso de formulación que da lugar a una granulometría no aceptable desde el punto de vista cosmético. La placa inferior, presenta una extensión del mismo espesor de *gel de carbopol* –excipiente base de todos los hidrogeles formulados- que, por su tendencia a incluir aire en la matriz, produce aperturas o huecos en la lámina extendida.



—  
una



**Fotografía 8.** Extensiones de lipogel: la placa superior muestra una extensión de 400  $\mu\text{m}$  de *lipogel 1* con vitamina E (2%) y, la inferior, otra del mismo espesor de la fórmula *lipogel 2* –que contiene, asimismo, el activo cosmético– sobre placa de vidrio. Ambas extensiones son fácilmente extensibles sobre la placa; se muestran homogéneas, con una textura suave.

**ANEXO III. CÁLCULO DEL ÁREA DE TIXOTROPÍA EN EL ESTUDIO VISCOSIMÉTRICO DE LAS SERIES C, D, E (Origin v. 5.0)**

**Lipogel C1 (25°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --> 60

x = 0,00117 --> 1202,5

Area	Peak at	Width	Height
147371,035	1202,5	793,66	198,37

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --> 59

x = 1213,2 --> 0,00162

Area	Peak at	Width	Height
-119453,65	1213,2	-584,22	198,33

**Lipogel C1 (32°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --> 123

x = 6,467E-4 --> 463,1

Area	Peak at	Width	Height
25376,060	463,1	258,67	94,226

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --> 63

x = 497,66 --> 1,9484E-4

Area	Peak at	Width	Height
-24735,615	497,66	-276,79	94,176

**Lipogel C2 (25°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --> 60

x = 5,889E-4 --> 437,49

Area	Peak at	Width	Height
41341,839	437,49	288,71	148,79

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --> 60

x = 444,18 --> 0,00105

Area	Peak at	Width	Height
-32103,325	444,18	-210,54	148,77

**Lipogel C2 (32°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 0,0144 --&gt; 614,27

Area	Peak at	Width	Height
32662,417	614,27	331,26	99,176

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 620,59 --&gt; 1,2031

Area	Peak at	Width	Height
-28891,668	620,59	-276,76	99,146

**Lipogel D1 (25°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 61

x = 0,01961 --&gt; 380,9

Area	Peak at	Width	Height
9925,50109	359,89	208,85	47,409

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 54

x = 349,44 --&gt; 7,6903E-4

Area	Peak at	Width	Height
-7652,332	349,44	-205,26	42,386

**Lipogel D1 (32°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 0,12863 --&gt; 671,94

Area	Peak at	Width	Height
16752,350	671,94	352,29	47,381

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 720,97 --&gt; 0,06076

Area	Peak at	Width	Height
-16368,264	720,97	-383,09	47,36

**Lipogel D2 (25°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 0,00221 --&gt; 861,25

Area	Peak at	Width	Height
53067,478	861,25	442,21	117,36

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 893,61 --&gt; 1,0146E-4

Area	Peak at	Width	Height
-52213,119	893,61	-486,63	117,16

**Lipogel D2 (32°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 6,7596E-4 --&gt; 767,25

Area	Peak at	Width	Height
38786,4309	767,25	395,91	94,613

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 811,25 --&gt; 2,4095E-4

Area	Peak at	Width	Height
-38392,551	811,25	-440,54	94,388

**Lipogel E1 (25°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 61

x = 0,02056 --&gt; 463,58

Area	Peak at	Width	Height
11859,909	463,58	247,14	47,421

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 59

x = 427,06 --&gt; 0,00276

Area	Peak at	Width	Height
-9061,998	427,06	-231,97	42,398

**Lipogel E1 (32°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 0,25447 --&gt; 791,79

Area	Peak at	Width	Height
18186,325	791,79	365,34	47,422

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 852,81 --&gt; 0,33785

Area	Peak at	Width	Height
-18037,235	852,81	-391,43	47,3

**Lipogel E2 (25°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 0,47689 --&gt; 362,27

Area	Peak at	Width	Height
9819,43616	362,27	201,43	49,59

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 364,87 --&gt; 1,6592

Area	Peak at	Width	Height
-8944,12594	364,87	-180,07	49,587

**Lipogel E2 (32°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 30

x = 0,00991 --&gt; 468,92

Area	Peak at	Width	Height
11638,795	468,92	242,74	47,422

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 502,48 --&gt; 7,7284E-4

Area	Peak at	Width	Height
-11515,050	502,48	-263,58	47,407

**Hidrogel (25°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 29

x = 0,00121 --&gt; 83,919

Area	Peak at	Width	Height
30621,759	83,919	79,3127	465,98

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 465,47 --&gt; 0,065

Area	Peak at	Width	Height
-8550,1884	465,47	-121,02	84,576

**Hidrogel (32°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 0,007 --&gt; 66,741

Area	Peak at	Width	Height
21306,617	66,741	64,1397	396,8

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 60

x = 396,67 --&gt; 3,4408

Area	Peak at	Width	Height
-5432,557	396,67	-73,14	66,866

**Hidrogel 7 (25°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 121

x = 0,00148 --&gt; 1123,8

Area	Peak at	Width	Height
171376,896	1123,8	1035,223	188,34

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --&gt; 59

x = 929,03 --&gt; 0,00187

Area	Peak at	Width	Height
-118142,52	929,03	-889,218	164,58

**Hidrogel 7 (32°C):**

Integration of "rampa de subida (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --> 122

x = 6,7607E-4 --> 921,76

Area	Peak at	Width	Height
139469,095	921,76	871,547	187,52

Integration of "rampa de bajada (esfuerzo)" from zero:

i = 1 --> 60

x = 746,35 --> 0,00226

Area	Peak at	Width	Height
-95624,202	746,35	-716,5	163,78

## ANEXO IV.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE VALORACIÓN DE MELOXICAM POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV (I). ESTUDIO ESTADÍSTICO.

En la Orden de 19 de Abril de 1985 (BOE nº 103 del 30 de Abril), por la que se introducen las Normas de Correcta Fabricación y Control de los Medicamentos, se define validación de un método analítico como *“la obtención de pruebas, convenientemente documentadas, demostrativas de que un método de fabricación o control es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos”*.

Validar es, en definitiva, verificar documentalmente que un método o proceso hace lo que tiene que hacer. Hay que tener en cuenta todas las variables del método, incluyendo la obtención y preparación de muestras, la separación cromatográfica o espectrofotométrica, la detección y evaluación de los datos y el empleo de la misma matriz (sangre, plasma, hígado, tampón, etc) en la que se va a encontrar la muestra.

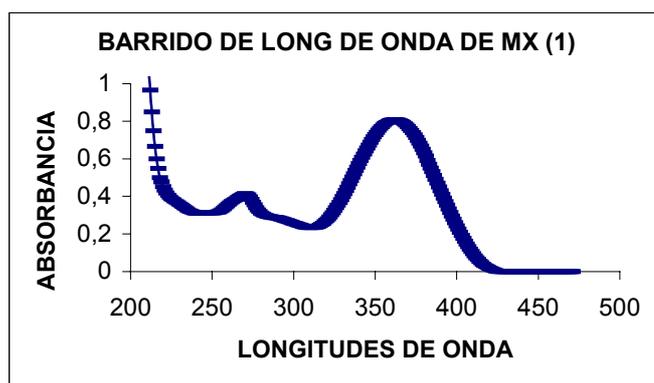
La validación proporciona un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados, así como permite un conocimiento profundo de las características de funcionamiento de dicho método.

Los parámetros que se estudian en una validación se seleccionan en función de las características de la muestra, tipo de método analítico y margen de concentración del analito. En el presente trabajo la validación del método

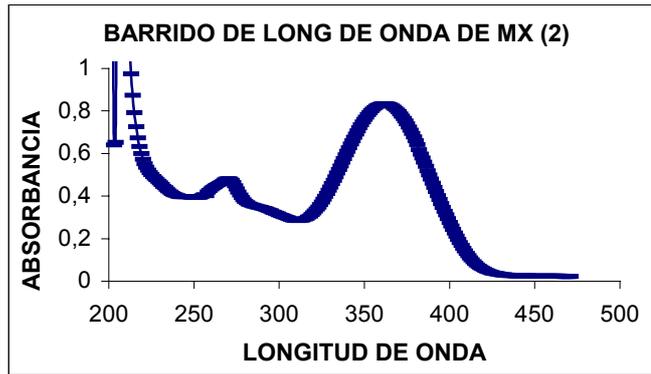
analítico para la valoración de meloxicam en solución tampón de fosfatos pH 5,5 en el intervalo de concentraciones 5-150  $\mu\text{g/ml}$  se ha realizado en base a los siguientes criterios:

- Límites de detección y de cuantificación
- Linealidad
- Precisión y exactitud.

Para conocer la longitud de onda de máxima absorción en espectrofotometría UV (Perkin Elmer lambda 40) de meloxicam en agua destilada se llevó a cabo un barrido de longitudes de onda de 200-470 nm. La señal espectrofotométrica que ha producido la máxima absorción ha sido 362 nm con una absorbancia de 0,8074 y 0,8336 en sendos barridos que se muestran a continuación.



**Figura 1.** Espectro de absorción UV de meloxicam en solución tampón de fosfatos pH 5,5 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) en espectrofotómetro Perkin Elmer lamda 40.



**Figura 2.** Espectro de absorción UV de meloxicam en solución tampón de fosfatos (20 µg/ml) en espectrofotómetro Perkin Elmer lamda 40.

### LÍMITES DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN

Existe una cierta confusión en relación con los términos que expresan la capacidad de un método de medir concentraciones bajas. Un término frecuentemente empleado es el de *sensibilidad*. Se dice que un método es sensible si pequeños cambios en la concentración provocan cambios considerables en la respuesta analítica. La capacidad de medir y de detectar pequeñas concentraciones se expresa como el límite de cuantificación y el de detección, respectivamente.

Se define **límite de cuantificación** como *la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas*. El **límite de detección** es *la menor cantidad o concentración de analito detectable con razonable certeza por el procedimiento analítico usado*.

El límite de cuantificación tiene un valor numérico superior al límite de detección y representa la menor cantidad de analito que puede ser medida con un coeficiente de variación que pueda ser aceptado. Concentraciones inmediatamente inferiores al límite de cuantificación serán detectadas pero nunca podrán ser medidas con precisión y exactitud y, por tanto, no deberán emplearse para la interpretación de resultados.

De los distintos procedimientos que se describen en la bibliografía para determinar los límites de detección y de cuantificación, en el presente trabajo se ha utilizado el que se basa en la determinación del coeficiente de variación de las respuestas espectrofotométricas.

F 1		F 2		F 3	
Conc. (µg/ml)	Absorbancia	Conc. (µg/ml)	Absorbancia	Conc. (µg/ml)	Absorbancia
0	0,000	0	0	0	0
0,5	0,052	0,5	0,064	0,5	0,079
1	0,056	1	0,076	1	0,088
2	0,069	2	0,085	2	0,092
3	0,077	3	0,091	3	0,102
4	0,088	4	0,105	4	0,109
5	0,100	5	0,116	5	0,121
10	0,155	10	0,168	10	0,170
20	0,262	20	0,272	20	0,274
30	0,367	30	0,375	30	0,373

**Tabla 1.** Determinación de la respuesta espectrofotométrica de soluciones a baja concentración de analito (0,5-30 µg/ml) .

Conc. Teórica	Desv. Estándar	Media	C. V. (%)
0	0	0	0
0,5	0,013	0,064	21,116
1	0,016	0,072	22,426
2	0,011	0,081	14,481
3	0,012	0,089	14,014
4	0,011	0,100	11,123
5	0,011	0,112	10,302
10	0,016	0,167	9,758
20	0,014	0,266	5,436
30	0,016	0,371	4,487

**Tabla 2.** Cálculo del coeficiente de variación (C.V.) para el análisis de los límites de detección y cuantificación de meloxicam en agua destilada.

Estableciendo como criterio de validez un coeficiente de variación inferior al 5%, consideramos como límite de cuantificación la concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  y, como límite de detección, la inmediatamente inferior, de 10  $\mu\text{g/ml}$ .

### LINEALIDAD

Se define **linealidad** como la *capacidad de un método analítico para obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración real del analito, dentro de un intervalo determinado.*

Para su determinación es necesario trazar primero una curva de calibración que relacione la respuesta espectrofotométrica y la concentración de analito de modo que, si se cumple la condición de linealidad en el intervalo de concentraciones estudiadas, la recta se ajuste a la siguiente ecuación:

$$y = bx + a$$

donde  $x$  es la concentración de meloxicam en solución tampón de fosfatos,  $y$  la respuesta espectrofotométrica,  $b$  el valor de la pendiente de esa recta, y  $a$  el término independiente. Dicha curva debe constar de al menos cinco puntos excluyendo el blanco.

Para definir esta ecuación, una vez estimado el límite de cuantificación de meloxicam en solución tampón, se han construido seis curvas de calibrado estableciendo un intervalo de concentraciones comprendido entre 20 y 150  $\mu\text{g/mL}$  a ocho niveles de concentración. En las tablas 1 y 2 se presentan las respuestas espectrofotométricas obtenidas para cada concentración.

F1		F2		F3	
Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia
0	0,000	0	0	0	0
20	0,262	20	0,272	20	0,274
30	0,367	30	0,375	30	0,373
40	0,479	40	0,496	40	0,477
50	0,583	50	0,595	50	0,582
75	0,787	75	0,676	75	0,832
100	1,047	100	1,077	100	1,080
125	1,307	125	1,342	125	1,288
150	1,559	150	1,599	150	1,593
<b>a = 0,0629</b> <b>b = 0,0099</b> <b>r= 0,9996</b>		<b>a = 0,0626</b> <b>b = 0,0100</b> <b>r= 0,9949</b>		<b>a = 0,0740</b> <b>b = 0,0099</b> <b>r= 0,9995</b>	

**Tabla 3.** Respuestas espectrofotométricas obtenidas para las distintas concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) de meloxicam en solución tampón de fosfatos (Rectas de calibrado 1-3)

I:4		F 5		R6	
Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia
0	0	0	0	0	0
20	0,266	20	0,285	20	0,240
30	0,372	30	0,397	30	0,350
40	0,488	40	0,495	40	0,420
50	0,589	50	0,594	50	0,580
75	0,880	75	0,837	75	0,770
100	1,193	100	1,085	100	1,020
125	1,415	125	1,285	125	1,200
150	1,655	150	1,576	150	1,500
<b>a = 0,0590</b> <b>b = 0,0108</b> <b>r = 0,9992</b>		<b>a = 0,0956</b> <b>b = 0,0097</b> <b>r = 0,9995</b>		<b>a = 0,0598</b> <b>b = 0,0094</b> <b>r = 0,9986</b>	

**Tabla 4.** Respuestas espectrofotométricas obtenidas para las distintas concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) de meloxicam en solución tampón de fosfatos (Rectas de calibrado 4–6).

Para evaluar la linealidad de estas rectas, se realiza una interpretación estadística de la regresión lineal calculando el coeficiente de correlación,  $r$  y el coeficiente de determinación  $r^2$ . El valor de  $r$  refleja el grado de relación o de ligazón existente entre las variables  $x$  e  $y$ , en este caso, concentración de analito y relación de valores de absorbancia. El valor máximo que puede presentar el coeficiente de correlación es 1; cuanto más cercano a la unidad sea el valor de  $r$ , mayor será la

probabilidad de que exista correlación entre las dos variables. Por su parte, el coeficiente de determinación indica la proporción de la varianza total de la respuesta ( $y$ ) que se explica por el modelo lineal de regresión.

En las tablas 1 y 2 se exponen los parámetros de las seis rectas de regresión y el valor de dichos coeficientes. Se puede afirmar que el método es lineal en el intervalo estudiado ya que el valor del coeficiente de correlación ( $r$ ) es mayor de 0,99 (Tabla 5).

Rectas de calibrado	Ecuación rectas (Ajuste lineal)	Coeff. de correlación ( $r$ )	Coeff. de determinación ( $r^2$ )
Recta 1	$y = 0,0099 x + 0,0629$	0,9996	0,99920
Recta 2	$y = 0,0100 x + 0,0626$	0,9949	0,98982
Recta 3	$y = 0,0099 x + 0,0740$	0,9995	0,99900
Recta 4	$y = 0,0108 x + 0,0590$	0,9992	0,99840
Recta 5	$y = 0,0097 x + 0,0956$	0,9995	0,99900
Recta 6	$y = 0,0094 x + 0,0598$	0,9986	0,99720

**Tabla 5.** Ecuaciones de las seis rectas de calibrado según ajuste lineal procesado en Excel 2000. Se muestran los valores de  $r$  y  $r^2$  correspondientes a cada una de ellas.

Se considera que el ajuste es bueno si la pendiente de la recta de calibrado que se obtiene en el test es estadísticamente diferente de 0, la ordenada en el origen no es estadísticamente diferente de 0 y el coeficiente de correlación no es estadísticamente diferente de 1. Las diferencias estadísticas se evalúan mediante la prueba  $t$  de Student.

Dado que la sensibilidad del espectrofotómetro está asegurada en el intervalo de absorbancia 0,2-0,8, el intervalo de concentraciones que consideramos válido desde este punto de vista del estudio es 20-75 µg/ml. Al haber establecido la concentración de 20 µg/ml como límite de cuantificación y teniendo en cuenta la Ley de Lambert-Beer según la cual la mayor amplitud en el intervalo de concentraciones disminuye la linealidad del método, consideramos lineal el intervalo 30-75 µg/ml.

## **PRECISIÓN Y EXACTITUD**

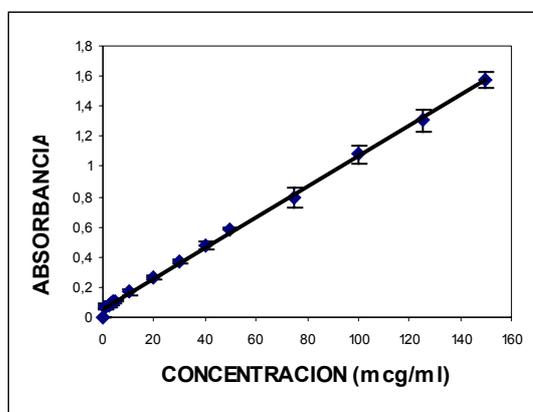
Se define **precisión** como *el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o, expresado de otra manera, la distribución de los valores analíticos alrededor de su media*. La precisión mide la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra. Matemáticamente se puede expresar por la desviación estándar ( $s_{n-1}$ ) o, preferentemente, por la desviación estándar relativa o coeficiente de variación ( $CV$ ):

$$CV = \frac{s_{n-1}}{\bar{X}} \cdot 100$$

donde  $\bar{x}$  es la media de los valores obtenidos. Se han considerado aceptables valores de CV no superiores al 10%; es decir, en el estudio que nos ocupa, 20-75 µg/ml.

Conc. Teórica	Desv.	Media	
0	0	0	0
20	0,014	0,266	5,436
30	0,016	0,371	4,487
40	0,026	0,475	5,652
50	0,006	0,587	1,025
75	0,070	0,794	8,891
100	0,058	1,082	5,431
125	0,071	1,304	5,463
150	0,051	1,579	3,229

**Tabla 6.** Cálculo de la *media*, *desviación estándar* y *coeficiente de variación* de las respuestas espectrofotométricas –medidas de absorbancia, indicadas en las Tablas 3 y 4-.



**Figura 3.** Representación de la media  $\pm$  desviación estándar de las seis curvas de calibrado (Absorbancia vs Concentración de meloxicam en solución tampón de fosfatos,  $\mu\text{g/ml}$ ).

La **exactitud** indica *la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posible al valor verdadero*. Para su determinación se ha llevado a cabo el cálculo de las concentraciones experimentales.

R1		R2		R3	
Absorbancia	Conc Exp (µg/ml)	Absorbancia	Conc Exp (µg/ml)	Absorbancia	Conc Exp (µg/ml)
0	0	0	0	0	0
0,262	20,017	0,272	20,802	0,274	21,001
0,367	30,575	0,375	31,034	0,373	30,835
0,479	41,837	0,496	43,055	0,477	41,16
0,583	52,294	0,595	52,890	0,582	51,599
0,787	72,807	0,676	60,937	0,832	76,435
1,047	98,951	1,077	100,774	1,08	101,072
1,307	125,095	1,342	127,100	1,288	121,736
1,559	150,435	1,599	152,631	1,593	152,036

**Tabla 7.** Valores de concentraciones experimentales (µg/ml) correspondientes a los resultados de absorbancia (respuesta espectrofotométrica) de las rectas de calibrado 1-3.

R4		R5		R6	
Absorbancia	Conc Exp (µg/ml)	Absorbancia	Conc Exp (µg/ml)	Absorbancia	Conc Exp (µg/ml)
0,266	19,092	0,285	19,342	0,24	19,210
0,372	28,872	0,397	30,786	0,35	30,080
0,488	39,575	0,495	40,799	0,424	38,410
0,589	48,893	0,594	50,915	0,582	55,070
0,88	75,742	0,837	75,745	0,774	75,320
1,193	104,620	1,085	101,085	1,021	101,360
1,415	125,103	1,285	121,521	1,199	120,140
1,655	147,246	1,576	151,255	1,5	151,880

**Tabla 8.** Valores de concentraciones experimentales (µg/ml) correspondientes a los resultados de absorbancia (respuesta espectrofotométrica) de las rectas de calibrado 4-6.

Conc. Teórica	Concentraciones experimentales ( $\mu\text{g/ml}$ )						Media	Desv. Est.
	R1	R2	R3	R4	R5	R6		
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0
20	20,00	20,80	21,00	19,10	19,34	19,21	19,90	0,833
30	30,60	31,00	30,80	28,90	30,79	30,08	30,35	0,800
40	41,80	43,10	41,20	39,60	40,80	38,41	40,78	1,644
50	52,30	52,90	51,60	48,90	50,92	55,07	51,91	2,062
75	72,80	60,90	76,40	75,70	75,75	75,32	72,61	5,959
100	99,00	100,80	101,10	104,60	101,09	101,36	101,30	1,839
125	125,09	127,10	121,73	125,10	121,52	120,14	123,42	2,698
150	150,43	152,63	152,03	147,24	151,25	151,88	150,90	1,946

E rror Relativo	C. V. (%)
0	0
0,515	4,188
-1,181	2,637
-1,947	4,033
-3,818	3,973
0,720	2,913
-1,297	1,815
1,260	2,186
-0,602	1,289

**Tabla 9.** Representación de los valores de concentración teórica y experimental de las seis rectas de calibrado así como del análisis de la *media, desviación estándar, error relativo y coeficiente de variación (%)* de las anteriores.

Admitiendo por válido en el análisis de la exactitud un CV de las concentraciones experimentales respecto de las teóricas menor del 5% y teniendo en cuenta los criterios anteriormente estudiados para la validación del análisis espectrofotométrico de meloxicam en solución tampón de fosfatos, se considera el método **lineal, preciso y exacto** en el intervalo de concentraciones 20-75  $\mu\text{g/ml}$ .

## CONTROL DE LA VALIDACIÓN DURANTE EL ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LAS MUESTRAS.

El control de la validación del método de valoración de cada analito –en esta memoria de tesis: meloxicam y acetato de  $\alpha$ -tocoferol- se ha realizado a partir de cuatro muestras control preparadas con concentraciones distintas de producto comprendidas en el intervalo validado.

Por cada serie de análisis espectrofotométricos realizada se ha procedido a la lectura de estas muestras al principio y al final para verificar la fiabilidad de los resultados.

## ANEXO IV.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE VALORACIÓN DE MELOXICAM POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV (II). ESTUDIO ESTADÍSTICO.

El método de análisis espectrofotométrico (Perkin Elmer, lambda 40) de valoración de meloxicam en agua destilada ha sido estudiado evaluando el **límite de detección** y **cuantificación** así como su **linealidad**, **exactitud** y **precisión** en el intervalo de concentraciones 4-28 µg/ml.

La selección de la longitud de onda de máxima absorción –362 nm- se realizó llevando a cabo un barrido de longitudes de onda desde 200-470 nm por duplicado como se ha descrito en el anterior Anexo IV.

### LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se define **límite de cuantificación** como *la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas*. El **límite de detección** es *la menor cantidad o concentración de analito detectable con razonable certeza por el procedimiento analítico usado*.

El límite de cuantificación tiene un valor numérico superior al límite de detección y representa la menor cantidad de analito que puede ser medida con un coeficiente de variación que pueda ser aceptado. Concentraciones inmediatamente inferiores al límite de cuantificación serán detectadas pero nunca podrán ser medidas con precisión y

exactitud y, por tanto, no deberán emplearse para la interpretación de resultados.

De los distintos procedimientos que se describen en la bibliografía para determinar los límites de detección y de cuantificación, en el presente trabajo se ha utilizado el que se basa en la determinación del coeficiente de variación de las respuestas espectrofotométricas.

Teniendo en cuenta que la solución de concentración más baja que se ha incluido en esta validación es de 4 µg/ml con un CV correspondiente de 3,533%, consideramos como límite de cuantificación cualquier valor inmediatamente inferior al de dicha concentración que, por ser tan bajo, se consideraría despreciable en el estudio que nos ocupa –cesión y permeación de principios activos-.

## **LINEALIDAD**

Se define **linealidad** como *la capacidad de un método analítico para obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración real del analito, dentro de un rango determinado.*

Para su determinación es necesario trazar primero una recta de calibrado que relacione la respuesta espectrofotométrica y la concentración de analito de modo que, si se cumple la condición de linealidad en el intervalo de concentraciones estudiadas, la recta se ajuste a la siguiente ecuación:

$$y = bx + a$$

donde  $x$  es la concentración de meloxicam en agua destilada,  $y$  el resultado espectrofotométrico,  $b$  el valor de la pendiente, y  $a$  el término independiente.

Para definir esta ecuación se han construido seis rectas de calibrado para el meloxicam en agua, estableciendo un intervalo de concentraciones comprendido entre 0,5 y 150  $\mu\text{g/ml}$  a trece niveles de concentración. En las tablas 1 y 2 se presentan las respuestas espectrofotométricas obtenidas para cada concentración.

R1		R2		R3	
Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia
28	1,275	28	1,246	28	1,245
26	1,184	26	1,180	26	1,166
24	1,091	24	1,102	24	1,074
22	1,021	22	0,999	22	0,992
20	0,918	20	0,906	20	0,903
18	0,815	18	0,829	18	0,818
16	0,726	16	0,743	16	0,724
14	0,679	14	0,651	14	0,651
12	0,581	12	0,590	12	0,560
10	0,479	10	0,476	10	0,476
8	0,400	8	0,383	8	0,397
6	0,316	6	0,306	6	0,295
4	0,227	4	0,214	4	0,228
0	0,000	0	0,000	0	0,000
$a = 0,0513$ $b = 0,0435$ $r = 0,9994$		$a = 0,0451$ $b = 0,0434$ $r = 0,9995$		$a = 0,0488$ $b = 0,0427$ $r = 0,9998$	

**Tabla 1.** Respuestas espectrofotométricas obtenidas para las distintas concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) de meloxicam en agua destilada (Rectas de calibrado 1-3).

R4		R5		R6	
Conc. (µg/ml)	Absorbancia	Conc. (µg/ml)	Absorbancia	Conc. (µg/ml)	Absorbancia
28	1,256	28	1,236	28	1,295
26	1,180	26	1,154	26	1,158
24	1,072	24	1,062	24	1,079
22	0,990	22	0,988	22,00	1,000
20	0,907	20	0,900	20,00	0,910
18	0,823	18	0,822	18,00	0,830
16	0,729	16	0,725	16,00	0,730
14	0,652	14	0,644	14,00	0,650
12	0,559	12	0,556	12,00	0,580
10	0,474	10	0,466	10,00	0,510
8	0,385	8	0,385	8,00	0,380
6	0,304	6	0,294	6,00	0,300
4	0,211	4	0,213	4,00	0,210
0	0,000	0	0,000	0,00	0,000
<b>a = 0,0389</b> <b>b = 0,0434</b> <b>r = 0,9999</b>		<b>a = 0,0418</b> <b>b = 0,0428</b> <b>r = 0,9999</b>		<b>a = 0,0400</b> <b>b = 0,0400</b> <b>r = 1,0000</b>	

**Tabla 2.** Respuestas espectrofotométricas obtenidas para las distintas concentraciones (µg/ml) de meloxicam en agua destilada (Rectas de calibrado 4–6).

Para evaluar la linealidad de estas rectas, se realiza una interpretación estadística de la regresión lineal calculando el coeficiente de correlación lineal,  $r$  y el coeficiente de determinación  $r^2$ . El valor de  $r$  refleja el grado de relación o de ligazón existente entre las variables  $x$  e  $y$ , en este caso, concentración de analito y relación de valores de absorbancia. El valor máximo que puede presentar el coeficiente de correlación es 1; cuanto más cercano a la unidad sea el valor de  $r$ , mayor será la probabilidad de que exista correlación entre las dos variables. Por su parte, el coeficiente de determinación indica la proporción de la

varianza total de la respuesta ( $y$ ) que se explica por el modelo lineal de regresión.

En las tablas 1 y 2 se exponen los parámetros de las seis rectas de regresión y el valor de dicho coeficiente. Se puede afirmar que el método es lineal ya que el valor del coeficiente de correlación es mayor de 0,99 (Tabla 3).

Rectas de calibrado	Ecuación rectas (Ajuste lineal)	Coef. de correlación ( $r$ )	Coef. de determinación ( $r^2$ )
Recta 1	$y = 0,0435 x + 0,0513$	0,9994	0,99880
Recta 2	$y = 0,0434 x + 0,0451$	0,9995	0,99900
Recta 3	$y = 0,0427 x + 0,0488$	0,9998	0,99960
Recta 4	$y = 0,0434 x + 0,0389$	0,9999	0,99980
Recta 5	$y = 0,0428 x + 0,0418$	0,9999	0,99980
Recta 6	$y = 0,0400 x + 0,0400$	1,0000	1,00000

**Tabla 3.** Ecuaciones de las seis rectas de calibrado según ajuste lineal procesado en Excel 2000. Se muestran los valores de  $r$  y  $r^2$  correspondientes a cada una de ellas.

Debido a que la sensibilidad en la detección analítica del espectrofotómetro es adecuada para los valores de absorbancia 0,2 a 0,8, en el intervalo de concentraciones que se está validando se excluyen las soluciones de 20 hasta 28  $\mu\text{g/ml}$  por producir una respuesta espectrofotométrica mayor a 0,8. Por otra parte, teniendo en cuenta la

Ley de Lambert-Beer según la cual la mayor amplitud en el intervalo de concentraciones estudiado disminuye la linealidad del método, consideramos lineal el intervalo comprendido entre 4-18 µg/ml.

### **PRECISIÓN Y EXACTITUD**

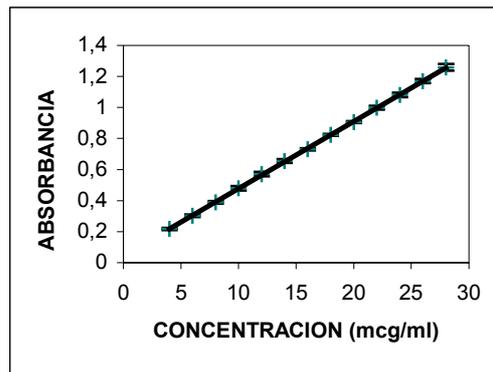
Se define **precisión** como *el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o, expresado de otra manera, la distribución de los valores analíticos alrededor de su media*. La precisión mide la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra. Matemáticamente se puede expresar por la desviación estándar ( $s_{n-1}$ ) o, preferentemente, por la desviación estándar relativa o coeficiente de variación ( $CV$ ):

$$CV = \frac{s_{n-1}}{\bar{X}} \cdot 100$$

donde  $\bar{x}$  es la media de los valores obtenidos. Se han considerado aceptables valores de CV no superiores al 5%; es decir, en el estudio que nos ocupa y teniendo en cuenta el criterio de linealidad, se considera el método preciso en el intervalo 4-18 µg/ml.

Conc. Teórica	Desv.Est.	Media	C. V. (%)
28	0,022	1,259	1,760
26	0,013	1,170	1,088
24	0,014	1,079	1,329
22	0,012	0,998	1,211
20	0,006	0,906	0,675
18	0,006	0,823	0,718
16	0,007	0,730	0,993
14	0,012	0,655	1,860
12	0,014	0,571	2,517
10	0,014	0,479	2,939
8	0,007	0,388	1,955
6	0,008	0,303	2,657
4	0,007	0,217	3,533

**Tabla 4.** Cálculo de la *media*, *desviación estándar* y *coeficiente de variación* de las respuestas espectrofotométricas –absorbancia- (Valores detallados en las tablas 1 y 2).



**Figura 1.** Representación de la media  $\pm$  desviación estándar de las seis curvas de calibrado (Absorbancia vs Concentración de meloxicam en agua destilada,  $\mu\text{g/ml}$ ).

La **exactitud** indica *la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posible al valor verdadero*. Para su determinación se ha llevado a cabo el cálculo de las concentraciones experimentales.

R1		R2		R3	
Absorbancia	ConcExp (µg/ml)	Absorbancia	ConcExp (µg/ml)	Absorbancia	ConcExp (µg/ml)
1,275	28,1407	1,246	27,6358	1,245	27,970
1,184	26,0480	1,180	26,1169	1,166	26,130
1,091	23,9092	1,102	24,3219	1,074	23,970
1,021	22,2995	0,999	21,9516	0,992	22,060
0,918	19,9307	0,906	19,8113	0,903	19,980
0,815	17,5620	0,829	18,0393	0,818	17,990
0,726	15,5153	0,743	16,0602	0,724	15,790
0,679	14,4344	0,651	13,9429	0,650	14,080
0,581	12,1807	0,590	12,5392	0,560	11,950
0,479	9,8349	0,476	9,9156	0,480	9,990
0,400	8,0182	0,383	7,7754	0,400	8,140
0,316	6,0864	0,306	6,0034	0,300	5,760
0,227	4,0397	0,214	3,8862	0,228	4,190
0,000	-1,1807	0,000	-1,0386	0,0000	-1,1407

**Tabla 5.** Valores del cálculo de concentraciones experimentales (µg/ml) correspondientes a los resultados de absorbancia (respuesta espectrofotométrica) de las rectas de calibrado 1-3.

R4		R5		R6	
Absorbancia	ConcExp (µg/ml)	Absorbancia	ConcExp (µg/ml)	Absorbancia	ConcExp (µg/ml)
1,256	28,0159	1,236	27,9042	1,300	28,7100
1,180	26,2665	1,154	25,9881	1,158	25,5600
1,072	23,7804	1,062	23,8385	1,079	23,7500
0,990	21,8929	0,988	22,1094	0,999	21,9100
0,907	19,9823	0,900	20,0531	0,906	19,7800
0,823	18,04867	0,822	18,2306	0,830	18,0300
0,729	15,8849	0,725	15,9640	0,734	15,8300
0,652	14,1124	0,644	14,0714	0,650	13,9700
0,559	11,9716	0,556	12,0154	0,580	12,2900
0,474	10,0150	0,466	9,9122	0,510	10,6200
0,385	7,9663	0,385	8,0195	0,383	7,7700
0,304	6,1018	0,294	5,8932	0,303	5,9300
0,211	3,9610	0,213	4,0005	0,213	3,8700
0,000	-0,8959	0,000	-0,9765	0,000	-1,0232

**Tabla 6.** Valores de concentraciones experimentales (µg/ml) correspondientes a los resultados de absorbancia (respuesta espectrofotométrica) de las rectas de calibrado 4-6.

Conc. Teórica	Concentraciones experimentales (µg/ml)						Media	Desv. Est.
	R1	R2	R3	R4	R5	R6		
28	28,10	27,60	27,60	28,00	27,90	28,71	28,00	0,398
26	26,00	26,10	26,10	26,30	25,99	25,56	26,02	0,242
24	23,90	24,30	24,30	23,80	23,84	23,75	23,99	0,265
22	22,30	22,00	22,00	21,90	22,11	21,91	22,02	0,157
20	19,90	19,80	19,80	20,00	20,05	19,78	19,89	0,111
18	17,60	18,00	18,00	18,00	18,23	18,03	17,99	0,224
16	15,50	16,10	16,10	15,90	15,96	15,83	15,88	0,204
14	14,40	13,90	13,90	14,10	14,07	13,97	14,08	0,188
12	12,18	12,54	12,54	11,97	12,01	12,29	12,25	0,247
10	9,83	9,91	9,91	10,01	9,91	10,61	10,03	0,290
8	8,02	7,77	7,77	7,96	8,02	7,77	7,89	0,126
6	6,08	6,01	6,01	6,10	5,89	5,93	6,00	0,082
4	4,04	3,88	3,88	3,96	4,00	3,86	3,94	0,071
0	-1,18	-1,04	-1,039	-0,89	-0,97	-1,02	0,00	0,09

Error Relativo	C. V. (%)
-0,014	1,421
-0,058	0,929
0,061	1,107
-0,085	0,714
0,531	0,560
0,052	1,245
0,724	1,283
-0,554	1,336
-2,118	2,019
-0,315	2,893
1,418	1,602
-0,050	1,368
1,512	1,803

**Tabla 7.** Representación de los valores de concentración teórica y experimental de las seis rectas de calibrado así como del análisis de la *media, desviación estándar, error relativo y coeficiente de variación* de las anteriores.

Según este estudio estadístico, el método de valoración de meloxicam en agua destilada por espectrofotometría-UV es **lineal, preciso y exacto** ya que el coeficiente de variación es menor de 5% y, el error relativo, de un orden de magnitud menor en el intervalo de concentraciones 4-18 µg/ml.

### ANEXO IV.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE VALORACIÓN DE MELOXICAM EN HPLC-UV (I). ESTUDIO ESTADÍSTICO.

El método de análisis cromatográfico (Perkin Elmer, UV-Vis Spectrophotometric Detector LC 290; integración de la señal en sistema informático TotalChrom Navigator) de valoración de meloxicam en agua destilada ha sido estudiado evaluando el **límite de detección** y **cuantificación** así como su **linealidad**, **exactitud** y **precisión** en el intervalo de concentraciones 2-30 µg/ml.

La columna empleada es de tipo Nova-Pak C<sub>18</sub> (Waters) de fase reversa, con número de serie W21061M 006, 3.9x150 mm; Part No. WAT036975. La fase móvil es una solución al 50% de acetonitrilo y 50% de ácido acético glacial al 4%. El flujo se ha establecido en 1 ml/min. La elución se ha llevado a cabo a 45°C. El volumen de inyección es de 100 µl. La longitud de onda para la detección del analito es 365 nm. El tiempo de retención en estas condiciones es de 3,05 min.

#### I. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se define **límite de cuantificación** como *la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas*. El **límite de detección** es *la menor cantidad o concentración de analito detectable con razonable certeza por el procedimiento analítico usado*.

El límite de cuantificación tiene un valor numérico superior al límite de detección y representa la menor cantidad de analito que puede ser medida con un coeficiente de variación que pueda ser aceptado. Concentraciones inmediatamente inferiores al límite de cuantificación serán detectadas pero nunca podrán ser medidas con precisión y exactitud y, por tanto, no deberán emplearse para la interpretación de resultados.

De los distintos procedimientos que se describen en la bibliografía para determinar los límites de detección y de cuantificación, en el presente trabajo se ha utilizado el que se basa en la determinación del coeficiente de variación de las respuestas cromatográficas.

Teniendo en cuenta que la solución de concentración más baja que se ha incluido en esta validación es de 2 µg/ml con un CV correspondiente de 2,84%, consideramos como límite de cuantificación cualquier valor inmediatamente inferior al de dicha concentración que, por ser tan bajo, se consideraría despreciable en el estudio que nos ocupa –acumulación y permeación de un principio activo-.

## II. LINEALIDAD

Se define **linealidad** como *la capacidad de un método analítico para obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración real del analito, dentro de un rango determinado.*

Para su determinación es necesario trazar primero una recta de calibrado que relacione la respuesta cromatográfica y la concentración de analito de modo que, si se cumple la condición de linealidad en el intervalo de concentraciones estudiadas, la recta se ajuste a la siguiente ecuación:

$$y = bx + a$$

donde  $x$  es la concentración de meloxicam en agua destilada,  $y$  el resultado cromatográfico,  $b$  el valor de la pendiente, y  $a$  el término independiente.

Para definir esta ecuación se han construido dos rectas de calibrado para el meloxicam en agua, estableciendo un intervalo de concentraciones comprendido entre 2 y 30  $\mu\text{g/ml}$  a cinco niveles de concentración. En la tabla 1 se presentan las respuestas cromatográficas obtenidas para cada concentración.

R1		R2		R3	
Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	ABC	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	ABC	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	ABC
0	238954,00	0	252317,50	0	242317,50
2	521448,00	2	504938,00	2	506738,00
4	1244724,50	4	1208514,00	4	1215614,00
10	2474493,00	10	2442498,00	10	2466498,00
20	3712709,50	20	3656971,50	20	3658771,30
30	238954,00	30	252317,50	30	242317,50
<b>a = 9070,4227</b> <b>b= 23439,0437</b> <b>r= 0,9999</b>		<b>a = 567,6632</b> <b>b= 21551,5255</b> <b>r= 0,9999</b>		<b>a = 7105,8965</b> <b>b= 122036,5048</b> <b>r= 0,9999</b>	

**Tabla 1.** Respuestas cromatográficas obtenidas para las distintas concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) de meloxicam en agua destilada (Rectas de calibrado1-3).

Para evaluar la linealidad de estas rectas, se realiza una interpretación estadística de la regresión lineal calculando el coeficiente de correlación lineal,  $r$  y el coeficiente de determinación  $r^2$ . El valor de  $r$  refleja el grado de relación o de ligazón existente entre las variables  $x$  e  $y$ , en este caso, concentración de analito y relación de valores de absorbancia. El valor máximo que puede presentar el coeficiente de correlación es 1; cuanto más cercano a la unidad sea el valor de  $r$ , mayor será la probabilidad de que exista correlación entre las dos variables. Por su parte, el coeficiente de determinación indica la proporción de la varianza total de la respuesta ( $y$ ) que se explica por el modelo lineal de regresión.

En la tabla 1 se exponen los parámetros de las tres rectas de regresión y el valor de dicho coeficiente. Se puede afirmar que el método es lineal ya que el valor del coeficiente de correlación es mayor de 0,99 (Tabla 2).

<b>Rectas de calibrado</b>	<b>Coefficiente de correlación (<math>r</math>)</b>	<b>Coefficiente de determinación (<math>r^2</math>)</b>
Recta 1	0,9999	0,9998
Recta 2	0,9999	0,9998
Recta 3	0,9999	0,9998

**Tabla 2.** Ecuaciones de las tres rectas de calibrado según ajuste lineal procesado en Excel 2000. Se muestran los valores de  $r$  y  $r^2$  correspondientes a cada una de ellas.

Consideramos lineal el intervalo comprendido entre 2-30  $\mu\text{g/ml}$ .

### III. PRECISIÓN Y EXACTITUD

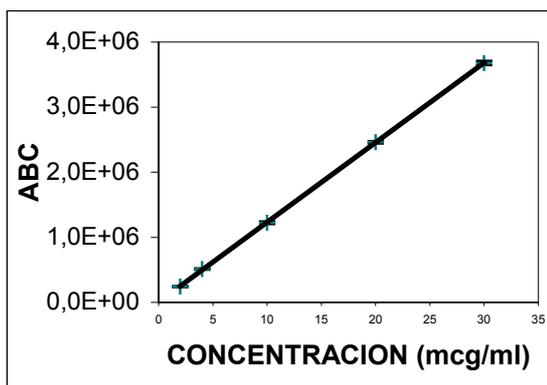
Se define **precisión** como *el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o, expresado de otra manera, la distribución de los valores analíticos alrededor de su media*. La precisión mide la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra. Matemáticamente se puede expresar por la desviación estándar ( $s_{n-1}$ ) o, preferentemente, por la desviación estándar relativa o coeficiente de variación ( $CV$ ):

$$CV = \frac{s_{n-1}}{X} \cdot 100$$

donde  $x$  es la media de los valores obtenidos. Se han considerado aceptables valores de  $CV$  no superiores al 5%; es decir, en el estudio que nos ocupa y teniendo en cuenta el criterio de linealidad, se considera el método preciso en el intervalo 2-30  $\mu\text{g/ml}$ .

Conc. Teórica	Desv.Est.	Media	C. V. (%)
2	6950,974	244464,322	2,843
4	9057,264	510988,169	1,772
10	19187,807	1222850,988	1,569
20	16651,327	2461125,374	0,677
30	31673,578	3676060,099	0,862

**Tabla 3.** Cálculo de la *media*, *desviación estándar* y *coeficiente de variación* de las respuestas cromatográficas –ABC- (Valores detallados en la tabla 1).



**Figura 1.** Representación de la media  $\pm$  desviación estándar de las seis curvas de calibrado (Absorbancia vs Concentración de meloxicam en agua destilada,  $\mu\text{g/ml}$ ).

La **exactitud** indica *la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posible al valor verdadero*. Para su determinación se ha llevado a cabo el cálculo de las concentraciones experimentales.

R1		R2		R3	
ABC	ConcExp (µg/ml)	ABC	ConcExp (µg/ml)	ABC	ConcExp (µg/ml)
238954,00	1,862	252317,50	2,005	242317,50	1,927
521448,00	4,150	504938,00	4,084	506738,00	4,094
1244724,50	10,012	1208514,00	9,872	1215614,00	9,903
2474493,00	19,972	2442498,00	20,024	2466498,00	20,153
3712709,50	30,003	3656971,50	30,015	3658771,30	29,923

**Tabla 4.** Valores del cálculo de concentraciones experimentales (µg/ml) correspondientes a los resultados de ABC (respuesta cromatográfica) de las rectas de calibrado 1-3.

Conc. Teórica	Media	Desv. Est.	Error Relativo	C. V. (%)
2	1,931	0,072	3,460	3,708
4	4,109	0,036	-2,736	0,880
10	9,928	0,073	0,718	0,731
20	20,050	0,093	-0,249	0,463
30	29,981	0,050	0,065	0,168

**Tabla 5.** Determinación de la media, desviación estándar, error relativo y coeficiente de variación del cálculo de las concentraciones experimentales.

Según este estudio estadístico, el método de valoración de meloxicam en agua destilada por HPLC-UV es **lineal**, **preciso** y **exacto** ya que el coeficiente de variación es menor de 5% y, el error relativo, de un orden de magnitud menor en el intervalo de concentraciones 2-30 µg/ml.

**ANEXO V. 1. ESTUDIO ESTADÍSTICO (ANOVA) DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE MELOXICAM EN EL ENSAYO DE SELECCIÓN DE MEMBRANA EN CELDAS DE FRANZ**

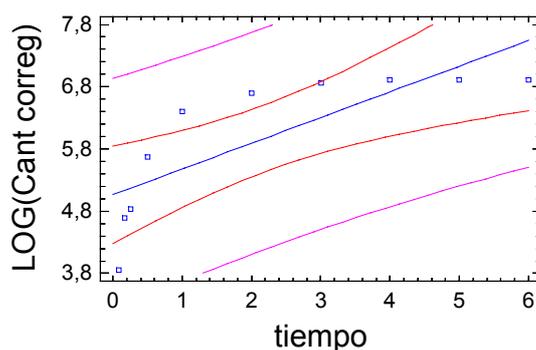
1. MEMBRANA DURAPORE (Millipore®)

1.a. REPLICA I (Celda 1)

**Tiempo Cantidades corregidas (µg)**

0	0,00
0,083	46,85
0,17	108,40
0,25	125,87
0,50	291,34
1,00	606,26
2,00	805,56
3,00	960,07
4,00	1000,00
5,00	1000,00
6,00	1000,00

Gráfico del Modelo Ajustado



La salida muestra los resultados de ajuste al modelo lineal para describir la relación entre LOG(Cant correg) y tiempo. La ecuación del modelo ajustado, mostrado como una línea continua, es

$$\text{LOG(Cant correg)} = 5,06393 + 0,413232 \cdot \text{tiempo}$$

Los límites internos muestran 95,0% límites de confianza para LOG(Cant correg) medio de muchas observaciones para los valores dados de tiempo.

Los límites exteriores muestran 95,0% límites de predicción para nuevas observaciones.

Análisis de regresión –Modelo lineal:  $y = a + b \cdot x$

Variable dependiente: Log (Cantidades corregidas)

Variable independiente: Tiempo

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	p-valor
Ordenada	5,064	0,340	14,880	0,000
Pendiente	0,413	0,112	3,367	0,006

#### Análisis de la varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Modelo	7,331	1	7,331	13,47	0,006
Residuo	4,354	8	0,544		
Total Corr	11,686	9			

Coefficiente de correlación= 0,792

R-cuadrado= 62,738

R-cuadrado (ajustado para g.l.)= 58,081 porcentaje

Error estándar de est.= 0,737

Error absoluto medio= 0,578

Estadístico de Durbin-Watson= 0,466 (p=0,0001)

Autocorrelación residual en lag 1= 0,541

La salida muestra los resultados del ajuste al modelo lineal para describir la relación entre Log (Cant. Corregidas) y tiempo. La ecuación del modelo ajustado es:

$\text{Log (Cant. Corr.)} = 5,064 + 0,413 \cdot \text{tiempo}$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,01 existe relación estadísticamente significativa entre el Log (Cant. Corr.) y tiempo para un nivel de confianza del 99%.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 62,74% de la variabilidad en Log (Cant. Corr.). El coeficiente de correlación es igual a 0,79 indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la relación típica de los residuos que es 0,74. Este valor puede usarse para construir límites de la

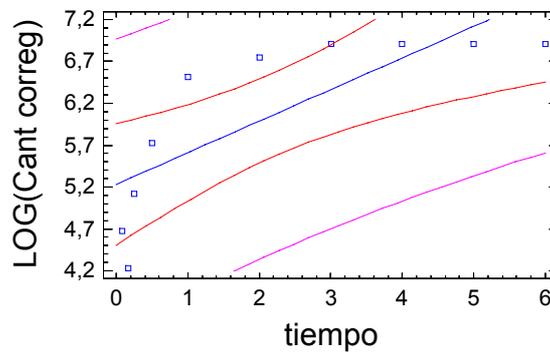
predicción para las nuevas observaciones seleccionando la opción Predicciones del menú del texto.

El error absoluto medio (MAE) de 0,578 es el valor medio de los residuos. El estadístico Durbin-Watson examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se han introducido los datos en el fichero. Dado que el p-valor es inferior a 0,05, hay indicio de una posible correlación serial.

#### 1.b. REPLICIA II (Celda 2)

Tiempo	Cantidades corregidas ( $\mu\text{g}$ )
0	0,00
0,083	107,02
0,17	68,62
0,25	166,54
0,50	305,96
1,00	675,71
2,00	845,47
3,00	996,73
4,00	1000,00
5,00	1000,00
6,00	1000,00

Gráfico del Modelo Ajustado



La salida muestra los resultados de ajuste al modelo lineal para describir la relación entre LOG(Cant correg) y tiempo. La ecuación del modelo ajustado, mostrado como una línea continua, es

$$\text{LOG}(\text{Cant correg}) = 5,23307 + 0,376901 \cdot \text{tiempo}$$

Los límites internos muestran 95,0% límites de confianza para LOG(Cant correg) medio de muchas observaciones para los valores dados de tiempo. Los límites exteriores muestran 95,0% límites de predicción para nuevas observaciones.

Análisis de regresión –Modelo lineal:  $y = a + b \cdot x$   
 Variable dependiente: Log (Cantidades corregidas)  
 Variable independiente: Tiempo

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	p-valor
Ordenada	5,233	0,315	16,629	0,000
Pendiente	0,377	0,104	3,619	0,006

#### Análisis de la varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Modelo	6,099	1	6,099	13,10	0,006
Residuo	3,723	8	0,465		
Total Corr	9,822	9			

Coefficiente de correlación= 0,788  
 R-cuadrado= 62,091  
 R-cuadrado (ajustado para g.l.)= 57,352 porcentaje  
 Error estándar de est.= 0,682  
 Error absoluto medio= 0,533  
 Estadístico de Durbin-Watson= 0,559 (p=0,0001)  
 Autocorrelación residual en lag 1= 0,627

La salida muestra los resultados del ajuste al modelo lineal para describir la relación entre Log (Cant. Corregidas) y tiempo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Log (Cant. Corr.)} = 5,233 + 0,377 \cdot \text{tiempo}$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,01 existe relación estadísticamente significativa entre el Log (Cant. Corr.) y tiempo para un nivel de confianza del 99%.

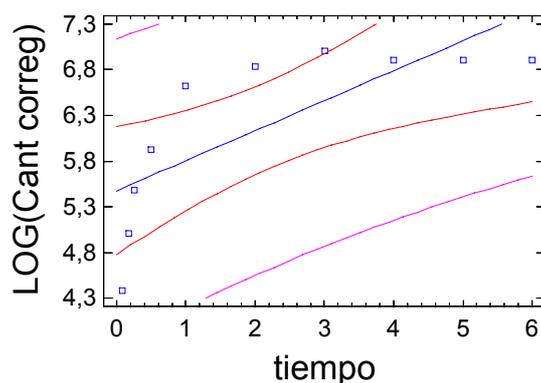
El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 62,091% de la variabilidad en Log (Cant. Corr.). El coeficiente de correlación es igual a 0,788 indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la relación típica de los residuos que es 0,682. Este valor puede usarse para construir límites de la predicción para las nuevas observaciones seleccionando la opción Predicciones del menú del texto.

El error absoluto medio (MAE) de 0,533 es el valor medio de los residuos. El estadístico Durbin-Watson examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se han introducido los datos en el fichero. Dado que el p-valor es inferior a 0,05, hay indicio de una posible correlación serial.

#### 1.c. REPLICA III (Celda 3)

<b>Tiempo</b>	<b>Cantidades corregidas (µg)</b>
0	0,00
0,083	79,80
0,17	149,48
0,25	241,20
0,50	375,61
1,00	754,46
2,00	924,94
3,00	1102,67
4,00	1000,00
5,00	1000,00
6,00	1000,00

Gráfico del Modelo Ajustado



La salida muestra los resultados de ajuste al modelo lineal para describir la relación entre LOG(Cant correg) y tiempo. La ecuación del modelo ajustado, mostrado como una línea continua, es

$$\text{LOG(Cant correg)} = 5,47686 + 0,32799 \cdot \text{tiempo}$$

Los límites internos muestran 95,0% límites de confianza para LOG(Cant correg) medio de muchas observaciones para los valores dados de tiempo. Los límites exteriores muestran 95,0% límites de predicción para nuevas observaciones.

Análisis de regresión –Modelo lineal:  $y = a + b \cdot x$   
 Variable dependiente: Log (Cantidades corregidas)  
 Variable independiente: Tiempo

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	p-valor
Ordenada	5,476	0,302	18,129	0,000
Pendiente	0,327	0,099	3,281	0,011

### Análisis de la varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Modelo	4,618	1	4,618	10,77	0,011
Residuo	3,431	8	0,428		
Total Corr	8,050	9			

Coefficiente de correlación= 0,757

R-cuadrado= 57,373

R-cuadrado (ajustado para g.l.)= 52,044 porcentaje

Error estándar de est.= 0,654

Error absoluto medio= 0,493

Estadístico de Durbin-Watson= 0,411 (p=0,0001)

Autocorrelación residual en lag 1= 0,567

La salida muestra los resultados del ajuste al modelo lineal para describir la relación entre Log (Cant. Corregidas) y tiempo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Log (Cant. Corr.)} = 5,476 + 0,328 \cdot \text{tiempo}$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,05 existe relación estadísticamente significativa entre el Log (Cant. Corr.) y tiempo para un nivel de confianza del 95%.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 57,373% de la variabilidad en Log (Cant. Corr.). El coeficiente de correlación es igual a 0,757 indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la relación típica de los residuos que es 0,654. Este valor puede usarse para construir límites de la predicción para las nuevas observaciones seleccionando la opción Predicciones del menú del texto.

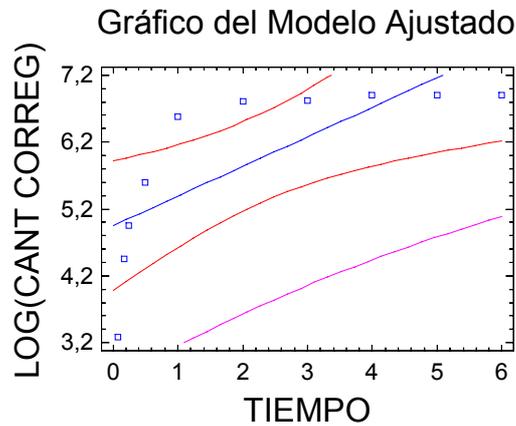
El error absoluto medio (MAE) de 0,493 es el valor medio de los residuos. El estadístico Durbin-Watson examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en

que se han introducido los datos en el fichero. Dado que el p-valor es inferior a 0,05, hay indicio de una posible correlación serial.

2. MEMBRANA ESTER DE CELULOSA (Millipore®)

2.a. REPLICA I (Celda 1)

Tiempo	Cantidades corregidas (µg)
0	0,00
0,083	26,79
0,17	86,32
0,25	140,41
0,50	270,52
1,00	723,83
2,00	906,57
3,00	923,58
4,00	1000,00
5,00	1000,00
6,00	1000,00



La salida muestra los resultados de ajuste al modelo lineal para describir la relación entre LOG(Cant correg) y Tiempo. La ecuación del modelo ajustado, mostrado como una línea continua, es

$$\text{LOG(Cant correg)} = 4,94826 + 0,443308 * \text{Tiempo}$$

Los límites internos muestran 95,0% límites de confianza para LOG(Cant correg) medio de muchas observaciones para los valores

datos de Tiempo. Los límites exteriores muestran 95,0% límites de predicción para nuevas observaciones.

Análisis de regresión –Modelo lineal:  $y = a + b \cdot x$   
 Variable dependiente: Log (Cantidades corregidas)  
 Variable independiente: Tiempo

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	p-valor
Ordenada	4,948	0,421	11,753	0,000
Pendiente	0,443	0,139	3,182	0,013

#### Análisis de la varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Modelo	8,437	1	8,437	10,13	0,013
Residuo	6,665	8	0,833		
Total Corr	15,103	9			

Coefficiente de correlación= 0,747  
 R-cuadrado= 55,867  
 R-cuadrado (ajustado para g.l.)= 50,351 porcentaje  
 Error estándar de est.= 0,912  
 Error absoluto medio= 0,666  
 Estadístico de Durbin-Watson= 0,467 (p=0,0001)  
 Autocorrelación residual en lag 1= 0,513

La salida muestra los resultados del ajuste al modelo lineal para describir la relación entre Log (Cant. Corregidas) y tiempo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Log (Cant. Corr.)} = 4,948 + 0,443 \cdot \text{tiempo}$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,05 existe relación estadísticamente significativa entre el Log (Cant. Corr.) y tiempo para un nivel de confianza del 95%.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 55,87% de la variabilidad en Log (Cant. Corr.). El coeficiente de correlación es igual a

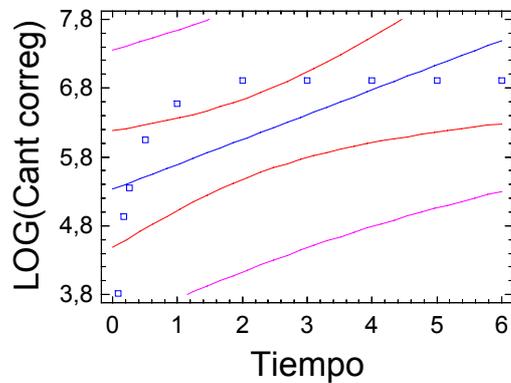
0,747 indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la relación típica de los residuos que es 0,913. Este valor puede usarse para construir límites de la predicción para las nuevas observaciones seleccionando la opción Predicciones del menú del texto.

El error absoluto medio (MAE) de 0,666 es el valor medio de los residuos. El estadístico Durbin-Watson examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se han introducido los datos en el fichero. Dado que el p-valor es inferior a 0,05, hay indicio de una posible correlación serial.

#### 2.b. REPLICA II (Celda 2)

Tiempo	Cantidades corregidas ( $\mu\text{g}$ )
0	0,00
0,083	45,41
0,17	138,44
0,25	209,81
0,50	423,57
1,00	715,06
2,00	1000,00
3,00	1000,00
4,00	1000,00
5,00	1000,00
6,00	1000,00

Gráfico del Modelo Ajustado



La salida muestra los resultados de ajuste al modelo lineal para describir la relación entre LOG(Cant correg) y Tiempo. La ecuación del modelo ajustado, mostrado como una línea continua, es

$$\text{LOG(Cant correg)} = 5,33243 + 0,360311 \cdot \text{Tiempo}$$

Los límites internos muestran 95,0% límites de confianza para LOG(Cant correg) medio de muchas observaciones para los valores dados de Tiempo. Los límites exteriores muestran 95,0% límites de predicción para nuevas observaciones.

Análisis de regresión –Modelo lineal:  $y = a + b \cdot x$   
 Variable dependiente: Log (Cantidades corregidas)  
 Variable independiente: Tiempo

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	p-valor
Ordenada	5,332	0,367	14,533	0,000
Pendiente	0,360	0,121	2,968	0,017

#### Análisis de la varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Modelo	5,574	1	5,574	8,81	0,017
Residuo	5,061	8	0,632		
Total Corr	10,635	9			

Coefficiente de correlación= 0,724  
 R-cuadrado= 52,408  
 R-cuadrado (ajustado para g.l.)= 46,459 porcentaje  
 Error estándar de est.= 0,795  
 Error absoluto medio= 0,579  
 Estadístico de Durbin-Watson= 0,461 (p=0,0001)  
 Autocorrelación residual en lag 1= 0,498

La salida muestra los resultados del ajuste al modelo lineal para describir la relación entre Log (Cant. Corregidas) y tiempo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Log (Cant. Corr.)} = 5,332 + 0,360 \cdot \text{tiempo}$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,05 existe relación estadísticamente significativa entre el Log (Cant. Corr.) y tiempo para un nivel de confianza del 95%.

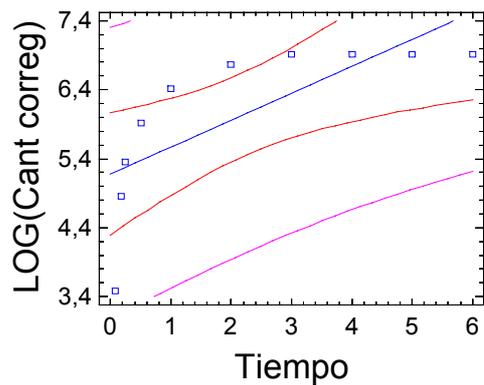
El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 52,41% de la variabilidad en Log (Cant. Corr.). El coeficiente de correlación es igual a 0,724 indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la relación típica de los residuos que es 0,795. Este valor puede usarse para construir límites de la predicción para las nuevas observaciones seleccionando la opción Predicciones del menú del texto.

El error absoluto medio (MAE) de 0,579 es el valor medio de los residuos. El estadístico Durbin-Watson examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se han introducido los datos en el fichero. Dado que el p-valor es inferior a 0,05, hay indicio de una posible correlación serial.

#### 2.c. REPLICA III (Celda 3)

<b>Tiempo</b>	<b>Cantidades corregidas (µg)</b>
0	0,00
0,083	32,52
0,17	128,03
0,25	210,57
0,50	372,79
1,00	609,80
2,00	864,94
3,00	1000,00
4,00	1000,00
5,00	1000,00
6,00	1000,00

### Gráfico del Modelo Ajustado



La salida muestra los resultados de ajuste al modelo lineal para describir la relación entre LOG(Cant correg) y Tiempo. La ecuación del modelo ajustado, mostrado como una línea continua, es

$$\text{LOG(Cant correg)} = 5,18197 + 0,390494 * \text{Tiempo}$$

Los límites internos muestran 95,0% límites de confianza para LOG(Cant correg) medio de muchas observaciones para los valores dados de Tiempo. Los límites exteriores muestran 95,0% límites de predicción para nuevas observaciones.

Análisis de regresión –Modelo lineal:  $y = a + b \cdot x$   
 Variable dependiente: Log (Cantidades corregidas)  
 Variable independiente: Tiempo

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	p-valor
Ordenada	5,182	0,385	13,461	0,000
Pendiente	0,390	0,127	3,066	0,015

### Análisis de la varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Modelo	6,547	1	6,547	9,40	0,015
Residuo	5,572	8	0,696		
Total Corr	12,118	9			

Coefficiente de correlación= 0,735

R-cuadrado= 54,023

R-cuadrado (ajustado para g.l.)= 48,276 porcentaje

Error estándar de est.= 0,834

Error absoluto medio= 0,594

Estadístico de Durbin-Watson= 0,508 (p=0,0002)

Autocorrelación residual en lag 1= 0,442

La salida muestra los resultados del ajuste al modelo lineal para describir la relación entre Log (Cant. Corregidas) y tiempo. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Log (Cant. Corr.)} = 5,182 + 0,390 \cdot \text{tiempo}$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,05 existe relación estadísticamente significativa entre el Log (Cant. Corr.) y tiempo para un nivel de confianza del 95%.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 54,023% de la variabilidad en Log (Cant. Corr.). El coeficiente de correlación es igual a 0,735 indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la relación típica de los residuos que es 0,834. Este valor puede usarse para construir límites de la predicción para las nuevas observaciones seleccionando la opción Predicciones del menú del texto.

El error absoluto medio (MAE) de 0,594 es el valor medio de los residuos. El estadístico Durbin-Watson examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en que se han introducido los datos en el fichero. Dado que el p-valor es inferior a 0,05, hay indicio de una posible correlación serial.

## ANEXO V.2. COMPARACIÓN DE MUESTRAS: EMPLEO DE MEMBRANA DURAPORE Y ÉSTER DE CELULOSA

### Resumen del procedimiento:

**Muestra 1:** Media cantidades corregidas de meloxicam cedido (Durapore)

**Muestra 2:** Media cantidades corregidas de meloxicam cedido (Éster de celulosa)

**Muestra 1:** 11 valores 0,0 hasta 1018,06

**Muestra 2:** 11 valores 0,0 hasta 1000

Este procedimiento compara los datos en dos columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en la Tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los tests de rangos múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras.

### Tabla ANOVA:

#### Análisis de la varianza

Fuente	Sumas de cuad	Gl	Cuadrado medio	Cociente F
Entre grupos	61,608	1	61,608	0,00
Intra grupos	3,728	20	186,431	
Total (Corr)	3,728	21		

La Tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio que en este caso es igual a 0,00033, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un 95,0%.

**ANEXO VI.1. COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DEL PARÁMETRO DE PARTICIÓN (KH) OBTENIDO A PARTIR DE LA ECUACIÓN DE PERMEACIÓN APLICADA AL ENSAYO DE LOS LIPOGELES 1 Y 2.**

**Resumen del Procedimiento:**

**Muestra 1:** KH Lipogel 1

**Muestra 2:** KH Lipogel 2

**Muestra 1:** 4 valores 0,032702 hasta 0,045346

**Muestra 2:** 4 valores 0,016554 hasta 0,075365

Este procedimiento compara los datos en dos columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en l Tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los tests de rangos múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras.

**Tabla ANOVA:**

**Análisis de la varianza**

<b>Fuente</b>	<b>Sumas de cuad</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Cociente F</b>	<b>p-valor</b>
Entre grupos	0,000265	1	0,000265	0,85	0,393
Intra grupos	0,00188	6	0,000313		
Total (Corr)	0,00214	7			

La Tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio que en este caso es igual a 0,84649, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un 95,0%.

**ANEXO VI.2. COMPARACIÓN ESTADÍSTICA DEL PARÁMETRO DE DIFUSIÓN ( $D/H^2$ ) OBTENIDO A PARTIR DE LA ECUACIÓN DE PERMEACIÓN APLICADA AL ENSAYO DE LOS LIPOGELES 1 Y 2**

**Resumen del Procedimiento:**

**Muestra 1:** Difusión Lipogel 1

**Muestra 2:** Difusión Lipogel 2

**Muestra 1:** 4 valores 0,0579 hasta 0,1125

**Muestra 2:** 4 valores 0,0777 hasta 0,0894

Este procedimiento compara los datos en dos columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en l Tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los tests de rangos múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras.

**Tabla ANOVA:**

**Análisis de la varianza**

<b>Fuente</b>	<b>Sumas de cuad</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Cociente F</b>	<b>p-valor</b>
Entre grupos	0,000082	1	0,000080	0,24	0,639
Intra grupos	0,00198	6	0,00033		
Total (Corr)	0,00206	7			

La Tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio que en este caso es igual a 0,242629, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un 95,0%.

### ANEXO VI.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE COMPARACIÓN DEL FLUJO DE PERMEACION DE MELOXICAM DESDE HIDROGEL (SIN APLICACIÓN DE IONTOFORESIS) Y LIPOGEL 2

#### Resumen del Procedimiento:

**Muestra 1:** *J* Hidrogel sin iontoforesis

**Muestra 2:** *J* Lipogel 2

**Muestra 1:** 4 valores 0,38 hasta 0,55

**Muestra 2:** 4 valores 10,133 hasta 18,457

Este procedimiento compara los datos en dos columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en l Tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los tests de rangos múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras.

#### Tabla ANOVA:

##### Análisis de la varianza

Fuente	Sumas de cuad	Gl	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	450,51	1	450,51	62,91	0,0002
Intra grupos	42,9661	6	7,16102		
Total (Corr)	493,476	7			

La Tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio que en este caso es igual a 62,9115, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un nivel de confianza del 95,0%.

**ANEXO VI.4. ESTUDIO ESTADÍSTICO (ANOVA) DE COMPARACIÓN DE LOS FLUJOS DE DIFUSIÓN DE MELOXICAM EN ENSAYO DE PERMEACIÓN (SIN IONTOFORESIS): LIPOGELES 1 y 2.**

**Resumen del Procedimiento:**

**Muestra 1:** Flujo ( $J$ ) de permeación de Lipogel 2

**Muestra 2:** Flujo ( $J$ ) de permeación de Lipogel 1

**Muestra 1:** 3 valores 13,72 hasta 17,58

**Muestra 2:** 3 valores 5,92 hasta 7,42

Este procedimiento compara los datos en dos columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en l Tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los tests de rangos múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras

**Tabla ANOVA:**

**Análisis de la varianza**

Fuente	Sumas de cuad	Gl	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	103,418	1	103,418	40,64	0,0031
Intra grupos	10,1781	4	2,54452		
Total (Corr)	113,596	5			

La Tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio que en este caso es igual a 40,6435, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un nivel de confianza del 95,0%.

## ANEXO VI.5. ESTUDIO ESTADÍSTICO (ANOVA) DE COMPARACIÓN DEL FLUJO DE DIFUSIÓN DE MX EN ENSAYO DE PERMEACIÓN (CON Y SIN IONTOFORESIS): HIDROGEL (pH 4)

### Resumen del Procedimiento:

**Muestra 1:** Hidrogel con iontoforesis

**Muestra 2:** Hidrogel sin iontoforesis

**Muestra 1:** 3 valores 0,432 hasta 0,776

**Muestra 2:** 4 valores 0,38 hasta 0,55

Este procedimiento compara los datos en dos columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en l Tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los tests de rangos múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras

### Tabla ANOVA:

#### Análisis de la varianza

Fuente	Sumas de cuad	Gl	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0,05513	1	0,05513	3,37	0,1257
Intra grupos	0,08175	5	0,01634		
Total (Corr)	0,13688	6			

La Tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio que en este caso es igual a 3,37205, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un 95,0%.

**ANEXO VI.6. ESTUDIO ESTADÍSTICO (ANOVA) DE COMPARACIÓN DE LOS FLUJOS DE DIFUSIÓN DE MELOXICAM EN ENSAYO DE PERMEACIÓN (CON IONTOFORESIS): HIDROGEL (pH 4 Y 7)**

**Resumen del Procedimiento:**

**Muestra 1:** Flujo (*J*) Hidrogel de meloxicam pH=4 (con iontoforesis)

**Muestra 2:** Flujo (*J*) Hidrogel de meloxicam pH=7 (con iontoforesis)

**Muestra 1:** 3 valores 0,27 hasta 0,49

**Muestra 2:** 3 valores 0,78 hasta 1,55

Este procedimiento compara los datos en dos columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en la Tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los tests de rangos múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras

**Tabla ANOVA:**

**Análisis de la varianza**

Fuente	Sumas de cuad	Gl	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0,9126	1	0,9126	11,36	0,028
Intra grupos	0,3214	4	0,0803		
Total (Corr)	1,234	5			

La Tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio que en este caso es igual a 11,3578, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un nivel de confianza del 95,0%.

## ANEXO VII.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE VALORACIÓN DE ACETATO DE $\alpha$ -TOCOFEROL POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV (I). ESTUDIO ESTADÍSTICO.

El método de análisis espectrofotométrico (Perkin Elmer, lambda 40) de valoración de acetato de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) en etanol ha sido validado evaluando su **límite de detección** y **cuantificación** así como su **linealidad**, **exactitud** y **precisión** en el intervalo de concentraciones 1,25-60  $\mu\text{g/ml}$ .

La bibliografía consultada (Lampen, 2001) nos ha llevado a establecer la longitud de onda de máxima absorción del acetato de  $\alpha$ -tocoferol en espectrofotometría-UV en 284 nm.

### LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACION

Se define **límite de cuantificación** como *la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas*. El **límite de detección** es *la menor cantidad o concentración de analito detectable con razonable certeza por el procedimiento analítico usado*.

El límite de cuantificación tiene un valor numérico superior al límite de detección y representa la menor cantidad de analito que puede ser medida con un coeficiente de variación que pueda ser aceptado. Concentraciones inmediatamente inferiores al límite de cuantificación serán detectadas pero nunca podrán ser medidas con precisión y

exactitud y, por tanto, no deberán emplearse para la interpretación de resultados.

La solución de concentración más baja que se ha incluido en esta validación es de 1,25 µg/ml con un CV correspondiente de 9,45%. El siguiente nivel de concentración corresponde a 2,5 µg/ml con un CV de 5,80% que consideramos el límite de cuantificación. Cualquier valor inmediatamente inferior al de dicha concentración –en este estudio, 1,25 µg/ml- se encontraría fuera del intervalo validado –lineal, preciso y exacto-.

### **LINEALIDAD**

Se define **linealidad** como *la capacidad de un método analítico para obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración real del analito, dentro de un intervalo determinado.*

Para su determinación es necesario trazar primero una recta de calibrado que relacione la respuesta espectrofotométrica y la concentración de analito de modo que, si se cumple la condición de linealidad en el intervalo de concentraciones estudiadas, la recta se ajuste a la siguiente ecuación:

$$y = bx + a$$

donde **x** es la concentración de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en etanol, **y** es el resultado espectrofotométrico, **b** es el valor de la pendiente, y **a** es el término independiente.

Para definir esta ecuación se han construido seis rectas de calibrado estableciendo un intervalo de concentraciones comprendido entre 1,25 y 60  $\mu\text{g/ml}$  con siete niveles de concentración. En las tablas 1 y 2 se presentan las respuestas espectrofotométricas obtenidas para cada concentración.

R1		R2		R3	
Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia
0	0,000	0	0,000	0	0,00
1,25	0,040	1,25	0,045	1,25	0,045
2,5	0,060	2,5	0,066	2,5	0,067
5	0,081	5	0,076	5	0,081
10	0,103	10	0,098	10	0,100
20	0,155	20	0,150	20	0,148
40	0,270	40	0,270	40	0,270
60	0,370	60	0,360	60	0,370
a = 0,035 b = 0,005 r = 0,991		a = 0,036 b = 0,005 r = 0,990		a = 0,036 b = 0,005 r = 0,990	

**Tabla 1.** Respuestas espectrofotométricas obtenidas para las distintas concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en etanol (Rectas de calibrado 1-3).

R4		R5		R6	
Conc. (µg/ml)	Absorbancia	Conc. (µg/ml)	Absorbancia	Conc. (µg/ml)	Absorbancia
0	0,000	0	0,000	0	0,000
1,25	0,040	1,25	0,040	1,25	0,050
2,5	0,060	2,5	0,060	2,5	0,067
5	0,078	5	0,079	5	0,080
10	0,102	10	0,105	10	0,100
20	0,147	20	0,140	20	0,140
40	0,245	40	0,260	40	0,240
60	0,370	60	0,390	60	0,330
a = 0,034 b = 0,005 r = 0,991		a = 0,032 b = 0,006 r = 0,992		a = 0,040 b = 0,000 r = 0,990	

**Tabla 2.** Respuestas espectrofotométricas obtenidas para las distintas concentraciones (µg/ml) de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en etanol (Rectas de calibrado 4–6).

Para evaluar la linealidad de estas rectas, se realiza una interpretación estadística de la regresión lineal calculando el coeficiente de correlación lineal,  $r$  y el coeficiente de determinación  $r^2$ . En las tablas 1 y 2 se exponen los parámetros de las seis rectas de regresión y el valor de dichos coeficientes. Se puede afirmar que el método es lineal ya que el valor del coeficiente de correlación es mayor de 0,99 (Tabla 3).

Rectas de calibrado	Ecuación rectas (Ajuste lineal)	Coef. de correlación ( <i>r</i> )	Coef. de determinación ( <i>r</i> <sup>2</sup> )
Recta 1	y = 0,005 x + 0,035	0,991	0,991
Recta 2	y = 0,005 x + 0,036	0,990	0,990
Recta 3	y = 0,005 x + 0,036	0,990	0,990
Recta 4	y = 0,005 x + 0,034	0,991	0,991
Recta 5	y = 0,006 x + 0,032	0,992	0,992
Recta 6	y = 0,000 x + 0,040	0,990	0,990

**Tabla 3.** Ecuaciones de las seis rectas de calibrado según ajuste lineal procesado en Excel 2000. Se muestran los valores de *r* y *r*<sup>2</sup> correspondientes a cada una de ellas.

### PRECISIÓN Y EXACTITUD

Se define **precisión** como *el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o, expresado de otra manera, la distribución de los valores analíticos alrededor de su media*. La precisión mide la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra. Matemáticamente se puede expresar por la desviación estándar (*s<sub>n-1</sub>*) o, preferentemente, por la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (*CV*):

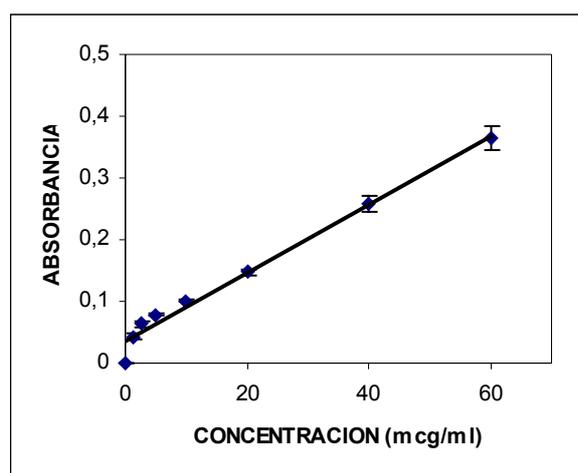
$$CV = \frac{s_{n-1}}{\bar{X}} \cdot 100$$

donde *x* es la media de los valores obtenidos. Se han considerado aceptables valores de CV iguales o no superiores al 5%; es decir, en el

estudio que nos ocupa y teniendo en cuenta el criterio de linealidad, se considera el método preciso en el intervalo 2,5-60  $\mu\text{g/ml}$ .

Teórica	Absorbancia						Desv.Est.	Media	C. V. (%)
	R1	R2	R3	R4	R5	R6			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,25	0,04	0,045	0,045	0,04	0,04	0,05	0,004	0,043	9,455
2,5	0,06	0,066	0,067	0,06	0,06	0,067	0,003	0,063	5,802
5	0,081	0,076	0,081	0,078	0,079	0,08	0,002	0,078	2,878
10	0,103	0,098	0,1	0,102	0,105	0,10	0,002	0,101	2,471
20	0,155	0,15	0,148	0,147	0,14	0,14	0,005	0,147	3,703
40	0,27	0,27	0,27	0,245	0,26	0,24	0,013	0,259	5,242
60	0,37	0,36	0,37	0,37	0,39	0,33	0,020	0,364	5,618

**Tabla 4.** Cálculo de la *media*, *desviación estándar* y *coeficiente de variación*(C.V.) de las respuestas espectrofotométricas (absorbancias).



**Figura 1.** Representación de la  $\pm$  desviación estándar de las seis curvas de calibrado (Absorbancia vs Concentración de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en etanol,  $\mu\text{g/ml}$ ).

Aceptando como válido un coeficiente de variación (C.V.) menor del 5%, el método se considera preciso en el intervalo de concentraciones 2,5-60  $\mu\text{g/ml}$ .

La **exactitud** indica *la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posible al valor verdadero*. Para su determinación se ha llevado a cabo el cálculo de las concentraciones experimentales.

Conc. Teórica	Conc. Experimentales ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1,25	0,752	1,507	1,507	1,096	1,362	1,990
2,5	4,249	5,281	5,460	4,697	4,754	5,460
5	7,922	7,078	7,976	7,937	7,975	7,290
10	11,769	11,031	11,391	12,258	12,384	12,180
20	20,863	20,376	20,016	20,359	18,318	20,730
40	40,974	41,940	41,940	38,000	38,665	40,690
60	58,461	58,114	59,911	60,503	60,708	58,610

**Tabla 5.** Valores del cálculo de concentraciones experimentales ( $\mu\text{g/ml}$ ) correspondientes a los resultados de absorbancia (respuesta espectrofotométrica) de las rectas de calibrado

Conc. Teór. (µg/ml)	Conc. Experimentales (µg/ml)						Media	Desv Est.	Error Relat.	CV (%)
	R1	R2	R3	R4	R5	R6				
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00	0,00!
1,25	0,75	1,51	1,51	1,09	1,36	1,99	1,31	0,42	-4,94	32,04
2,5	4,24	5,28	5,46	4,68	4,75	5,46	4,96	0,49	-98,49	9,92
5	7,92	7,08	7,97	7,94	7,98	7,29	7,69	0,40	-53,74	5,25
10	11,76	11,03	11,39	12,26	12,38	12,18	11,82	0,54	-18,24	4,54
20	20,86	20,37	20,02	20,36	18,32	20,73	20,09	0,93	-0,46	4,62
40	40,97	41,94	41,94	38,00	38,67	40,69	40,34	1,67	-0,84	4,13
60	58,46	58,11	59,91	60,50	60,71	58,61	59,38	1,13	1,04	1,89

**Tabla 6.** Parámetros estadísticos: *media, desviación estándar, error relativo y coeficiente de variación (%)* en la determinación de las concentraciones experimentales respecto de las teóricas.

Admitiendo por válido un C.V. de las concentraciones experimentales respecto de las teóricas menor del 5% y teniendo en cuenta los criterios anteriormente estudiados para la validación del análisis espectrofotométrico de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en etanol, se considera el método **lineal, preciso y exacto** en el intervalo de concentraciones 2,5-60 µg/ml.

## ANEXO VII.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE VALORACIÓN DE ACETATO DE $\alpha$ -TOCOFEROL POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV (II). ESTUDIO ESTADÍSTICO.

El método de análisis espectrofotométrico-UV de valoración de acetato de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) en mezcla hidroalcohólica 1:3; etanol: tampón cítrico-citrato pH 5,5 con Tween 80 (1%) ha sido validado evaluando su **límite de detección** y **cuantificación** así como su **linealidad**, **exactitud** y **precisión** en el intervalo de concentraciones 25-250  $\mu\text{g/ml}$ .

Las determinaciones espectrofotométricas se han llevado a cabo aplicando un barrido de longitudes de onda a cada muestra.

### LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACION

Se define **límite de cuantificación** como *la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas*. El **límite de detección** es *la menor cantidad o concentración de analito detectable con razonable certeza por el procedimiento analítico usado*.

El límite de cuantificación tiene un valor numérico superior al límite de detección y representa la menor cantidad de analito que puede ser medida con un coeficiente de variación que pueda ser aceptado.

Concentraciones inmediatamente inferiores al límite de cuantificación serán detectadas pero nunca podrán ser medidas con precisión y exactitud y, por tanto, no deberán emplearse para la interpretación de resultados.

La solución de concentración más baja que se ha incluido en esta validación es de 25 µg/ml la cual no ha podido ser leída por el espectrofotómetro para dar la señal analítica correspondiente ni, por tanto, permitir al cálculo del CV. El siguiente nivel de concentración estudiado, 50 µg/ml, ha sido detectado, en cambio, con un CV de 5,64%, que consideramos límite de cuantificación. Cualquier valor inmediatamente inferior al de dicha concentración –en este estudio, 25 µg/ml- se considera el límite de detección.

## **LINEALIDAD**

Se define **linealidad** como la *capacidad de un método analítico para obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración real del analito, dentro de un intervalo determinado.*

Para su determinación es necesario trazar primero una recta de calibrado que relacione la respuesta espectrofotométrica y la concentración de analito de modo que, si se cumple la condición de linealidad en el intervalo de concentraciones estudiadas, la recta se ajuste a la siguiente ecuación:

$$y = bx + a$$

donde  $x$  es la concentración de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en etanol,  $y$  es el resultado espectrofotométrico,  $b$  es el valor de la pendiente, y  $a$  es el término independiente.

Para definir esta ecuación se han construido seis rectas de calibrado estableciendo un intervalo de concentraciones comprendido entre 25-250  $\mu\text{g/mL}$  con seis niveles de concentración. En las tablas 1 y 2 se presentan las respuestas espectrofotométricas obtenidas para cada concentración.

R1		R2		R3	
Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia
0	0	0	0	0	0
25	No detección	25	No detección	25	0,118
50	0,229	50	0,235	50	0,232
100	0,488	100	0,46	100	0,448
150	0,685	150	0,695	150	0,679
200	0,906	200	0,975	200	0,935
250	1,149	250	1,121	250	1,129
$a = 0,0067$ $b = 0,0046$ $r = 0,9995$		$a = 0,0053$ $b = 0,0046$ $r = 0,9980$		$a = 0,0014$ $b = 0,0046$ $r = 0,9996$	

**Tabla 1.** Respuestas espectrofotométricas obtenidas para las distintas concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en la mezcla hidroalcohólica (Rectas de calibrado1-3).

R4		R5		R6	
Conc. (µg/ml)	Absorbancia	Conc. (µg/ml)	Absorbancia	Conc. (µg/ml)	Absorbancia
0	0	0	0	0	0,000
25	0,111	25	0,113	25	0,117
50	0,255	50	0,217	50	0,223
100	0,477	100	0,456	100	0,451
150	0,681	150	0,679	150	0,687
200	0,929	200	0,89	200	0,907
250	1,127	250	1,121	250	1,123
a = 0,0108 b = 0,0045 r = 0,9994		a = 0,0003 b = 0,0045 r = 0,9999		a = 0,0018 b = 0,0045 r = 0,9999	

**Tabla 2.** Respuestas espectrofotométricas obtenidas para las distintas concentraciones (µg/ml) de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en mezcla hidroalcohólica (Rectas de calibrado 4–6).

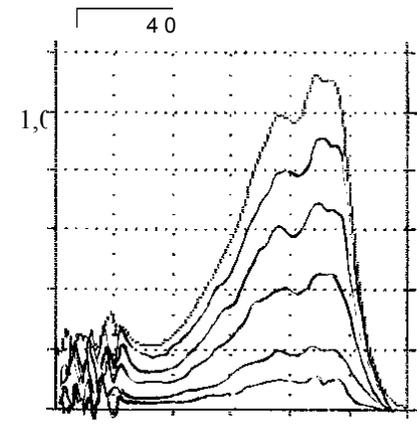
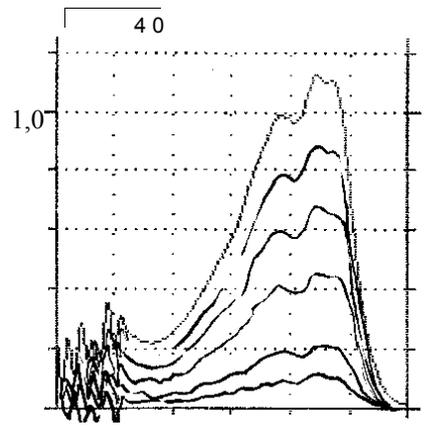
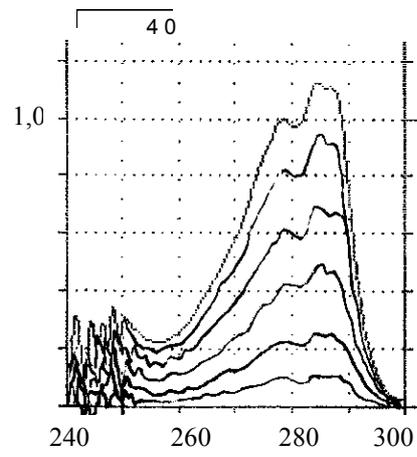
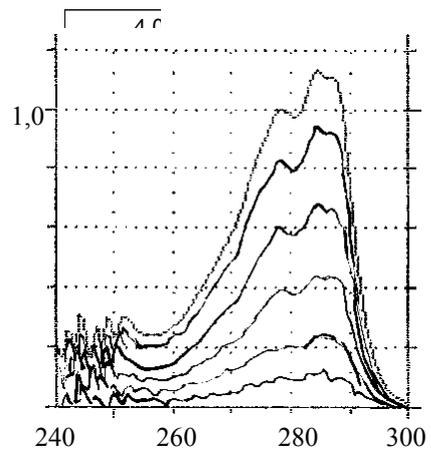
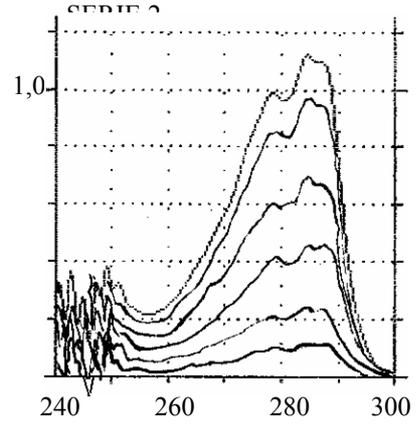
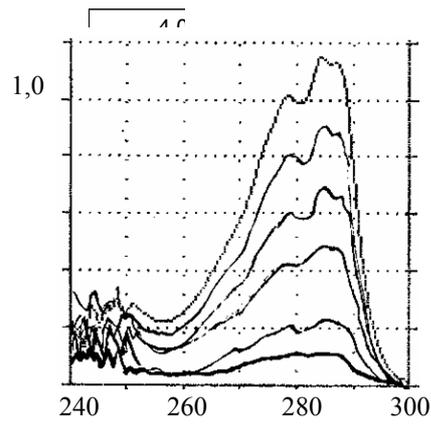
Para evaluar la linealidad de estas rectas, se realiza una interpretación estadística de la regresión lineal calculando el coeficiente de correlación lineal,  $r$  y el coeficiente de determinación  $r^2$ . El valor de  $r$  refleja el grado de relación o de ligazón existente entre las variables  $x$  e  $y$ , en este caso, concentración de analito y relación de valores de absorbancia. El valor máximo que puede presentar el coeficiente de correlación es 1; cuanto más cercano a la unidad sea el valor de  $r$ , mayor será la probabilidad de que exista correlación entre las dos variables. Por su parte, el coeficiente de determinación indica la proporción de la varianza total de la respuesta ( $y$ ) que se explica por el modelo lineal de regresión.

En las tablas 1 y 2 se exponen los parámetros de las seis rectas de regresión y el valor de dichos coeficientes. Se puede afirmar que el método es lineal ya que el valor del coeficiente de correlación es mayor de 0,99 (Tabla 3).

Rectas de calibrado	Ecuación rectas (Ajuste lineal)	Coef. de correlación ( $r$ )	Coef. de determinación ( $r^2$ )
Recta 1	$y = 0,0046 x + 0,0067$	0,9995	0,9990
Recta 2	$y = 0,0046 x + 0,0053$	0,9980	0,9960
Recta 3	$y = 0,0046 x + 0,0014$	0,9996	0,9992
Recta 4	$y = 0,0045 x + 0,0108$	0,9994	0,9988
Recta 5	$y = 0,0045 x + 0,0003$	0,9999	0,9998
Recta 6	$y = 0,0045 x + 0,0018$	0,9999	0,9998

**Tabla 3.** Ecuaciones de las seis rectas de calibrado según ajuste lineal procesado en Excel 2000. Se muestran los valores de  $r$  y  $r^2$  correspondientes a cada una de ellas.

Se muestran a continuación los espectros de absorción de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en mezcla hidroalcohólica de las seis curvas de calibrado que se han realizado para esta validación.



Dado que la sensibilidad de detección del espectrofotómetro es adecuada en el intervalo de lecturas de absorbancia 0,2-0,8 ó 0,9, el intervalo de concentraciones que se considerará a partir de este criterio para su validación es 50-200 µg/ml

### **PRECISIÓN Y EXACTITUD**

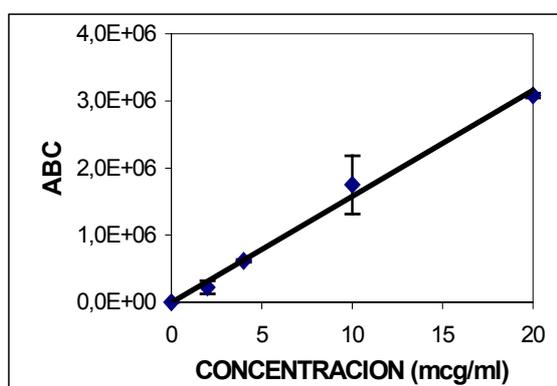
Se define **precisión** como *el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o, expresado de otra manera, la distribución de los valores analíticos alrededor de su media*. La precisión mide la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra. Matemáticamente se puede expresar por la desviación estándar ( $s_{n-1}$ ) o, preferentemente, por la desviación estándar relativa o coeficiente de variación ( $CV$ ):

$$CV = \frac{s_{n-1}}{X} \cdot 100$$

donde  $x$  es la media de los valores obtenidos. Se han considerado aceptables valores de  $CV$  iguales o no superiores al 5%; es decir, en el estudio que nos ocupa y teniendo en cuenta el criterio de linealidad, se considera el método preciso en el intervalo 50-250 µg/ml.

Conc. Teórica	Absorbancia						Desv.Est	C. V. (%)
	R2	R4	R5					
0	0	0	0	0	0	0	0	-
25	0,000	0,000	0,118	0,111	0,113	0,117	0,059	0,076
50	0,229	0,235	0,232	0,255	0,217	0,223	0,013	0,231
100	0,488	0,460	0,448	0,477	0,456	0,451	0,016	0,463
150	0,685	0,695	0,679	0,681	0,679	0,687	0,006	0,684
200	0,906	0,975	0,935	0,929	0,890	0,907	0,030	0,923
250	1,149	1,121	1,129	1,127	1,121	1,123	0,011	1,128

**Tabla 4.** Cálculo de la *media*, *desviación estándar* y *coeficiente de variación (C.V.)* de las respuestas espectrofotométricas (absorbancias).



**Figura 1.** Representación de la *media ± desviación estándar* de las seis curvas de calibrado (Absorbancia vs Concentración de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en mezcla hidroalcohólica,  $\mu\text{g/ml}$ ).

La **exactitud** indica *la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posible al valor verdadero*. Para su determinación se ha llevado a cabo el cálculo de las concentraciones experimentales.

Aceptando como válido un coeficiente de variación (C.V.) menor o igual al 5%, el método se considera preciso en el intervalo de concentraciones 50-200 µg/ml.

Conc. Teór.	Conc. Experimentales (µg/ml)						Media	Est.	Error Relat.	C. V. (%)
	R1	R2	R3	R4	R5	R6				
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25	0,00	0,00	24,47	22,15	25,14	25,55	16,23	12,62	35,08	77,74
50	48,80	49,88	49,22	54,00	48,35	49,05	49,85	2,08	0,30	4,17
100	105,65	98,73	96,12	103,10	101,66	99,60	100,76	3,38	-0,76	3,35
150	148,89	149,75	146,28	148,22	151,41	151,92	149,40	2,09	0,40	1,40
200	197,40	210,55	201,86	203,07	198,48	200,70	201,96	4,68	-0,98	2,32
250	250,73	242,25	243,98	246,86	250,02	248,59	247,05	3,38	1,18	1,37

**Tabla 5.** Cálculo de concentraciones experimentales (µg/ml) correspondientes a los resultados de absorbancia (respuesta espectrofotométrica) de las rectas de calibrado. Parámetros estadísticos: *media, desviación estándar, error relativo y coeficiente de variación (%)* en la determinación de las concentraciones experimentales respecto de las teóricas.

Admitiendo por válido un C.V. de las concentraciones experimentales respecto de las teóricas menor del 5% y teniendo en cuenta los criterios anteriormente estudiados para la validación del análisis espectrofotométrico de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en mezcla hidroalcohólica, se considera el método **lineal, preciso y exacto** en el intervalo de concentraciones 50-200 µg/ml.

### ANEXO VII.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE VALORACIÓN DE ACETATO DE $\alpha$ -TOCOFEROL POR HPLC-UV (I). ESTUDIO ESTADÍSTICO.

El método de análisis cromatográfico de valoración de acetato de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) en tampón fosfato con DM $\beta$ CD al 5% ha sido validado evaluando su **límite de detección** y **cuantificación** así como su **linealidad**, **exactitud** y **precisión** en el intervalo de concentraciones 2-20  $\mu$ g/ml.

La bibliografía consultada (Ostacolo C. et al, 2004) nos ha ayudado a establecer las condiciones del análisis. Se empleó una columna de fase reversa (Waters, NovaPak C8-3,9x150 mm, Millipore, Milford, MA, USA) y un cromatógrafo Gilson, Model 231. La fase móvil ha sido una mezcla de acetonitrilo y agua destilada (95:5, V/V): El flujo se estableció en 1,5 ml/min y la longitud de onda de máxima absorción del acetato de  $\alpha$ -tocoferol fue de 215 nm. El tiempo de retención al que eluye el analito es 5,53 min.

#### LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACION

Se define **límite de cuantificación** como *la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas*. El **límite de detección** es *la menor cantidad o concentración de analito detectable con razonable certeza por el procedimiento analítico usado*.

El límite de cuantificación tiene un valor numérico superior al límite de detección y representa la menor cantidad de analito que puede ser medida con un coeficiente de variación que pueda ser aceptado. Concentraciones inmediatamente inferiores al límite de cuantificación serán detectadas pero nunca podrán ser medidas con precisión y exactitud y, por tanto, no deberán emplearse para la interpretación de resultados.

La solución de concentración más baja que se ha incluido en esta validación es de 2 µg/ml con un CV correspondiente de 43,8%. El siguiente nivel de concentración corresponde a 4 µg/ml con un CV de 3,4% que consideramos el límite de cuantificación. Cualquier valor inmediatamente inferior al de dicha concentración –en este estudio, 2 µg/ml- se encontraría fuera del intervalo validado –lineal, preciso y exacto-.

## **LINEALIDAD**

Se define **linealidad** como *la capacidad de un método analítico para obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración real del analito, dentro de un intervalo determinado.*

Para su determinación es necesario trazar primero una recta de calibrado que relacione la respuesta cromatográfica y la concentración de analito de modo que, si se cumple la condición de linealidad en el intervalo de concentraciones estudiadas, la recta se ajuste a la siguiente ecuación:

$$y = bx + a$$

donde  $x$  es la concentración de acetato de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en tampón de fosfatos con CD (5%),  $y$  es la señal cromatográfica,  $b$  es el valor de la pendiente, y  $a$  es el término independiente.

Para definir esta ecuación se han construido cinco rectas de calibrado estableciendo un intervalo de concentraciones comprendido entre 2 y 20  $\mu\text{g/ml}$  con cuatro niveles de concentración. En las tablas 1 y 2 se presentan las respuestas cromatográficas obtenidas para cada concentración.

R1		R2		R3	
Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	ABC	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	ABC	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	ABC
0	0,000	0	0,000	0	0,00
2	136983,96	2	580881,00	2	164658,55
4	613254,00	4	642040,50	4	584776,00
10	1435761,17	10	2343532,00	10	1499486,48
20	3070753,70	20	3089654,48	20	3057047,50
a = 0917,66466 b=155870,5876 r= 0,99820643		a = 22806,9417 b= 47789,8687 r= 0,98797042		a= -59700,04356 b= 155679,6874 r= 0,999081898	

**Tabla 1.** Respuestas cromatográficas obtenidas para las distintas concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en tampón fosfato con CD (5%) (Rectas de calibrado 1-3).

R4		R5	
Conc. (µg/ml)	ABC	Conc. (µg /ml)	ABC
0	0,00	0	0,00
2	215708,72	2	377062,31
4	621755,00	4	627600,12
10	1177453,17	10	1493346,44
20	3138037,81	20	3049741,00
a= 88955,2671 b= 45492,5288 r= 0,98805105		a= 25988,3362 b= 150494,6719 r= 0,999594865	

**Tabla 2.** Respuestas cromatográficas obtenidas para las distintas concentraciones (µg/ml) de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en tampón fosfato con CD (5%) (Rectas de calibrado 4–5).

Para evaluar la linealidad de estas rectas, se realiza una interpretación estadística de la regresión lineal calculando el coeficiente de correlación lineal ,  $r$  y el coeficiente de determinación  $r^2$ . En las tablas 1 y 2 se exponen los parámetros de las cinco rectas de regresión y el valor de dichos coeficientes. Se puede afirmar que el método es lineal ya que el valor del coeficiente de correlación es mayor de 0,9 –y mayor de 0,99 en tres de ellas- (Tabla 3).

Rectas de calibrado	Coeff. de correlación ( $r$ )	Coeff. de determinación ( $r^2$ )
Recta 1	0,998	0,996
Recta 2	0,987	0,974
Recta 3	0,999	0,998
Recta 4	0,988	0,976
Recta 5	0,999	0,998

**Tabla 3.** Cálculo de los valores de  $r$  y  $r^2$  correspondientes a cada una de las rectas de calibración..

### PRECISIÓN Y EXACTITUD

Se define **precisión** como *el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o, expresado de otra manera, la distribución de los valores analíticos alrededor de su media*. La precisión mide la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra. Matemáticamente se puede expresar por la desviación estándar ( $s_{n-1}$ ) o, preferentemente, por la desviación estándar relativa o coeficiente de variación ( $CV$ ):

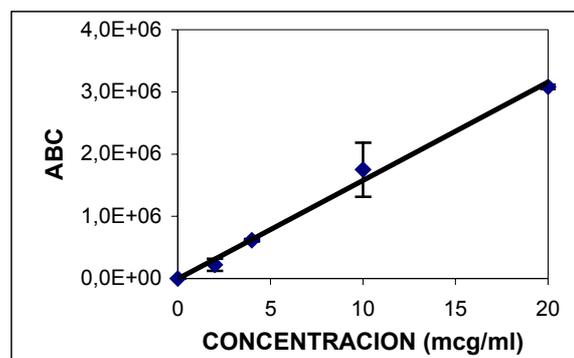
$$CV = \frac{s_{n-1}}{X} \cdot 100$$

donde  $x$  es la media de los valores obtenidos. Se han considerado aceptables valores de  $CV$  iguales o no superiores al 5%; es decir, en el estudio que nos ocupa y teniendo en cuenta el criterio de linealidad, se considera el método preciso en el intervalo 4-20  $\mu\text{g/ml}$ .

Conc. Teórica	Respuesta cromatográfica (ABC)				
	R1	R2	R3	R4	R5
0	0,000	0,000	0,00	0,00	0,00
2	136983,96	580881,00	164658,55	215708,72	377062,31
4	613254,00	642040,50	584776,00	621755,00	627600,12
10	1435761,17	2343532,00	1499486,48	1177453,17	1493346,44
20	3070753,70	3089654,48	3057047,50	3138037,81	3049741,00

Desv.Est.	Media	C. V. (%)
0	0	0
96454,60	219994,30	43,84
21274,98	617588,12	3,44
433631,60	1749380,70	24,78
35298,84	3080886,10	1,14

**Tabla 4.** Cálculo de la *media*, *desviación estándar* y *coeficiente de variación*(C.V.) de las respuestas cromatográficas (ABC).



**Figura 1.** Representación de la media  $\pm$  desviación estándar de las cinco curvas de calibrado (ABC vs Concentración de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en tampón fosfato con CD (5%),  $\mu\text{g/ml}$ ).

Considerando que se ha trabajado con concentraciones muy bajas y dada la sensibilidad del cromatógrafo, se aceptan como válidos y precisos los coeficientes de variación obtenidos a partir de 4 µg/ml.

La **exactitud** indica *la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posible al valor verdadero*. Para su determinación se ha llevado a cabo el cálculo de las concentraciones experimentales.

Conc. Teórica	Conc. Experimentales (µg/ml)				
	R1	R2	R3	R4	R5
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
2	1,3	1,4	1,3	2,8	2,33
4	4,4	6,8	3,1	5,6	4,00
10	9,7	12,0	7,3	8,0	9,75
20	20,2	18,0	17,8	22,9	20,09

**Tabla 5.** Valores del cálculo de concentraciones experimentales (µg/ml) correspondientes a los resultados de ABC de las rectas de calibrado.

Conc. Teórica (µg/ml)	Media	Desv. Est.	Error Relativo	CV (%)
0	0,00	0	0	0
2	1,74	0,68	13,08	39,22
4	4,59	1,42	-14,84	30,96
10	9,20	1,83	7,99	19,87
20	19,72	2,04	1,42	10,34

**Tabla 6.** Parámetros estadísticos: *media, desviación estándar, error relativo y coeficiente de variación (%)* en la determinación de las concentraciones experimentales respecto de las teóricas.

Teniendo en cuenta los criterios anteriormente estudiados para la validación del análisis cromatográfico de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en tampón fosfato con CD (5%), se considera el método **lineal, preciso y exacto** en el intervalo de concentraciones 4-20  $\mu\text{g/ml}$ .

#### ANEXO VII.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE VALORACIÓN DE $\alpha$ -TOCOFEROL POR HPLC-UV (II). ESTUDIO ESTADÍSTICO.

El método de análisis cromatográfico (Gilson, 117 UV Detector) de valoración de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) en tampón fosfato con DM $\beta$ CD al 5% ha sido validado evaluando su **límite de detección** y **cuantificación** así como su **linealidad**, **exactitud** y **precisión** en el intervalo de concentraciones 2-20  $\mu$ g/ml.

La bibliografía consultada (Ostacolo C, 2004) nos ha orientado para establecer las condiciones del análisis. Se empleó una columna de fase reversa (Waters, NovaPak C8-3,9x150 mm, Millipore, Milford, MA, USA) y un cromatógrafo Gilson, Model 231. La fase móvil ha sido una mezcla de acetonitrilo y agua destilada (95:5, V/V): El flujo se estableció en 1,5 ml/min y la longitud de onda seleccionada fue de 215 nm. El tiempo de retención al que eluye el analito es 4,2 min, aproximadamente.

#### LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACION

Se define **límite de cuantificación** como *la menor concentración o cantidad de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas*. El **límite de detección** es *la menor cantidad o concentración de analito detectable con razonable certeza por el procedimiento analítico usado*.

El límite de cuantificación tiene un valor numérico superior al límite de detección y representa la menor cantidad de analito que puede ser medida con un coeficiente de variación que pueda ser aceptado. Concentraciones inmediatamente inferiores al límite de cuantificación serán detectadas pero nunca podrán ser medidas con precisión y exactitud y, por tanto, no deberán emplearse para la interpretación de resultados.

La solución de concentración más baja que se ha incluido en esta validación es de 2 µg/ml con un CV correspondiente de 92,74%. El siguiente nivel de concentración corresponde a 4 µg/ml con un CV de 10,4% que consideramos el límite de cuantificación. Cualquier valor inmediatamente inferior al de dicha concentración –en este estudio, 2 µg/ml- se encontraría fuera del intervalo validado –lineal, preciso y exacto-.

## **LINEALIDAD**

Se define **linealidad** como *la capacidad de un método analítico para obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración real del analito, dentro de un intervalo determinado.*

Para su determinación es necesario trazar primero una recta de calibrado que relacione la respuesta cromatográfica y la concentración de analito de modo que, si se cumple la condición de linealidad en el intervalo de concentraciones estudiadas, la recta se ajuste a la siguiente ecuación:

$$y = bx + a$$

donde  $x$  es la concentración de acetato de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en tampón de fosfatos con CD (5%),  $y$  es la señal cromatográfica,  $b$  es el valor de la pendiente, y  $a$  es el término independiente.

Para definir esta ecuación se han construido cuatro rectas de calibrado estableciendo un intervalo de concentraciones comprendido entre 2 y 20  $\mu\text{g/ml}$  con cuatro niveles de concentración. En las tablas 1 y 2 se presentan las respuestas cromatográficas obtenidas para cada concentración.

R1		R2		R3		R4	
Conc ( $\mu\text{g/ml}$ )	ABC						
0	0	0	0	0	0	0	0
2	501217,8	2	508057,78	2	101758,18	2	131914
4	513289	4	578959,8	4	594577,78	4	474150,14
10	1165204,51	10	1095587,43	10	1139028,97	10	1181844,45
20	2987753	20	2699840,03	20	2880748,48	20	2876627

**Tabla 1.** Respuestas cromatográficas obtenidas para las distintas concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) de  $\alpha$ -tocoferol en tampón fosfato con CD (5%) (Rectas de calibrado 1-4).

Para evaluar la linealidad de estas rectas, se realiza una interpretación estadística de la regresión lineal calculando el coeficiente de correlación lineal,  $r$  y el coeficiente de determinación  $r^2$ . En las tablas 1 y 2 se exponen los parámetros de las cuatro rectas de regresión y el valor de dichos coeficientes. Se puede afirmar que el método es lineal

ya que el valor del coeficiente de correlación es mayor de 0,9 –y mayor de 0,99 en dos de ellas- (Tabla 2).

Rectas de calibrado	Coeff. de correlación ( $r$ )	Coeff. de determinación ( $r^2$ )
Recta 1	0,987	0,974
Recta 2	0,992	0,984
Recta 3	0,995	0,990
Recta 4	0,987	0,974

**Tabla 2.** Cálculo de los valores de  $r$  y  $r^2$  correspondientes a cada una de las rectas de calibración..

## PRECISIÓN Y EXACTITUD

Se define **precisión** como *el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o, expresado de otra manera, la distribución de los valores analíticos alrededor de su media*. La precisión mide la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra. Matemáticamente se puede expresar por la desviación estándar ( $s_{n-1}$ ) o, preferentemente, por la desviación estándar relativa o coeficiente de variación ( $CV$ ):

$$CV = \frac{s_{n-1}}{\bar{X}} \cdot 100$$

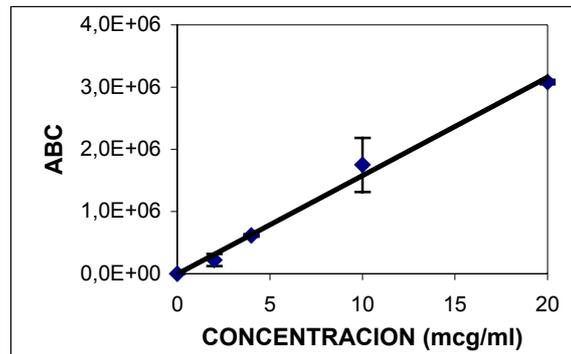
donde  $\bar{x}$  es la media de los valores obtenidos. Se han considerado aceptables valores de CV iguales o no superiores al 5%; es decir, en el

estudio que nos ocupa y teniendo en cuenta el criterio de linealidad, se considera el método preciso en el intervalo 4-20  $\mu\text{g/ml}$ .

Conc. Teórica	Respuesta cromatográfica (ABC)			
	R1	R2	R3	R4
0	0	0	0	0
2	501217,8	101758,18	131914	508057,78
4	513289	594577,78	474150,14	578959,8
10	1165204,51	1139028,97	1181844,45	1095587,43
20	2987753	2880748,48	2876627	2699840,03

Desv.Est.	Media	C. V. (%)
0	0	0
224253,01	241796,46	92,74
56409,34	538001,80	10,48
37604,51	1144948,81	3,28
119265,57	2859353,85	4,17

**Tabla 3.** Cálculo de la *media*, *desviación estándar* y *coeficiente de variación*(C.V.) de las respuestas cromatográficas (ABC).



**Figura 1.** Representación de la  $\pm$  desviación estándar de las cuatro curvas de calibrado (ABC vs Concentración de  $\alpha$ -tocoferol en tampón fosfato con CD (5%),  $\mu\text{g/ml}$ ).

Considerando que se ha trabajado con concentraciones muy bajas y dada la sensibilidad del cromatógrafo, se aceptan como válidos y precisos los coeficientes de variación obtenidos a partir de 4 µg/ml.

La **exactitud** indica *la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posible al valor verdadero*. Para su determinación se ha llevado a cabo el cálculo de las concentraciones experimentales.

Conc. Teórica	Conc. Experimentales (µg/ml)			
	R1	R2	R3	R4
0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,9	1,4	1,6	1,5
4	3,5	4,8	3,9	4,6
10	17,1	8,6	8,9	8,5
20	16,6	20,6	20,6	20,6

**Tabla 4.** Valores del cálculo de concentraciones experimentales (µg/ml) correspondientes a los resultados de ABC de las rectas de calibrado

Conc. Teórica (µg/ml)	Media	Desv. Est.	Error Relativo	CV (%)
0	0,00	0	0	0
2	1,32	0,28	34,07	21,79
4	4,19	0,58	-4,76	13,89
10	10,25	4,24	-2,52	41,40
20	19,54	1,98	2,30	10,18

**Tabla 5.** Parámetros estadísticos: *media, desviación estándar, error relativo y coeficiente de variación (%)* en la determinación de las concentraciones experimentales respecto de las teóricas.

Teniendo en cuenta los criterios anteriormente estudiados para la validación del análisis cromatográfico de acetato de  $\alpha$ -tocoferol en tampón fosfato con CD (5%), se considera el método **lineal, preciso y exacto** en el intervalo de concentraciones 4-20  $\mu\text{g/ml}$ .

**ANEXO VIII.1. COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE LIBERACIÓN DE AcVE DESDE HIDROGELES EN EL ENSAYO DE DIFUSIÓN SIN MEMBRANA (STATGRAPHICS V. 5.1.).**

**Resumen del Procedimiento:**

**Muestra 1:** Perfil cinético de liberación de AcVE (Cantidades acumuladas corregidas): Fórmula 1

**Muestra 2:** Perfil cinético de liberación de AcVE (Cantidades acumuladas corregidas): Fórmula 2

**Muestra 1:** 13 valores 0,0 hasta 55,0726

**Muestra 2:** 13 valores 0,0 hasta 53,5552

Este procedimiento compara los datos en dos columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en 1 Tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los tests de rangos múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras.

**Tabla ANOVA:**

**Análisis de la varianza**

<b>Fuente</b>	<b>Sumas de cuad</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Cociente F</b>	<b>p-valor</b>
Entre grupos	16,5651	1	16,5651	0,06	0,8024
Intra grupos	6209,67	24	258,736		
Total (Corr)	6226,23	25			

La Tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio que en este caso es igual a 0,064023, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un 95,0%.

**Resumen del Procedimiento:**

**Muestra 1:** Perfil cinético de liberación de AcVE (Cantidades acumuladas corregidas): Fórmula 3

**Muestra 2:** Perfil cinético de liberación de AcVE (Cantidades acumuladas corregidas): Fórmula 4

**Muestra 1:** 13 valores 0,0 hasta 37,5676

**Muestra 2:** 13 valores 0,0 hasta 38,2492

Este procedimiento compara los datos en dos columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en l Tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los tests de rangos múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras

**Tabla ANOVA:****Análisis de la varianza**

Fuente	Sumas de cuad	Gl	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	0,363143	1	0,363143	0,00	0,9543
Intra grupos	2598,98	24	108,291		
Total (Corr)	2599,34	25			

La Tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio que en este caso es igual a 0,003353, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un 95,0%.

**Resumen del Procedimiento:**

**Muestra 1:** Perfil cinético de liberación de AcVE (Cantidades acumuladas corregidas): Fórmula 5

**Muestra 2:** Perfil cinético de liberación de AcVE (Cantidades acumuladas corregidas): Fórmula 6

**Muestra 1:** 13 valores 0,0 hasta 28,8779

**Muestra 2:** 13 valores 0,0 hasta 29,3384

Este procedimiento compara los datos en dos columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en l Tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los tests de rangos múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras.

**Tabla ANOVA:****Análisis de la varianza**

<b>Fuente</b>	<b>Sumas de cuad</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Cociente F</b>	<b>p-valor</b>
Entre grupos	2,14214	1	2,14214	0,04	0,8377
Intra grupos	1198,48	24	49,9366		
Total (Corr)	1200,62	25			

La Tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio que en este caso es igual a 0,04289, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un 95,0%.

## ANEXO VIII.2. COMPARACIÓN DE LOS PERFILES DE LIBERACIÓN DE AcVE DESDE LIPOGELES EN EL ENSAYO DE LIBERACIÓN

### Resumen del Procedimiento:

**Muestra 1:** Perfil cinético de liberación de AcVE (Cantidades acumuladas corregidas): Fórmula 1A

**Muestra 2:** Perfil cinético de liberación de AcVE (Cantidades acumuladas corregidas): Fórmula 2A

**Muestra 1:** 13 valores 0,0 hasta 25756,5

**Muestra 2:** 13 valores 0,0 hasta 24853,3

Este procedimiento compara los datos en dos columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en l Tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los tests de rangos múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras

### Tabla ANOVA:

#### Análisis de la varianza

Fuente	Sumas de cuad	Gl	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	1,3387E6	1	1,3387E6	0,03	0,8558
Intra grupos	9,5269E8	24	3,9695E7		
Total (Corr)	9,5403E8	25			

La Tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio que en este caso es igual a 0,03372, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un 95,0%.

**Resumen del Procedimiento:**

**Muestra 1:** Perfil cinético de liberación de AcVE (Cantidades acumuladas corregidas): Fórmula 1B

**Muestra 2:** Perfil cinético de liberación de AcVE (Cantidades acumuladas corregidas): Fórmula 2B

**Muestra 1:** 13 valores 0,0 hasta 17948,4

**Muestra 2:** 13 valores 0,0 hasta 16737,0

Este procedimiento compara los datos en dos columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en la Tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los tests de rangos múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras.

**Tabla ANOVA:****Análisis de la varianza**

<b>Fuente</b>	<b>Sumas de cuad</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Cociente F</b>	<b>p-valor</b>
Entre grupos	2,1106E6	1	2,1106E6	0,12	0,7351
Intra grupos	4,3222E8	24	1,8009E7		
Total (Corr)	4,3433E8	25			

La Tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio que en este caso es igual a 0,117194, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un 95,0%.

**Resumen del Procedimiento:**

**Muestra 1:** Perfil cinético de liberación de AcVE (Cantidades acumuladas corregidas): Fórmula 1A

**Muestra 2:** Perfil cinético de liberación de AcVE (Cantidades acumuladas corregidas): Fórmula 1B

**Muestra 1:** 13 valores 0,0 hasta 25756,5

**Muestra 2:** 13 valores 0,0 hasta 17948,4

Este procedimiento compara los datos en dos columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en la Tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los tests de rangos múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras

**Tabla ANOVA:****Análisis de la varianza**

Fuente	Sumas de cuad	Gl	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	2,4305E8	1	2,4305E8	8,10	0,0089
Intra grupos	7,2001E8	24	3,0000E7		
Total (Corr)	9,6306E8	25			

La Tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio que en este caso es igual a 8,10169, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un 95,0%.

**Resumen del Procedimiento:**

**Muestra 1:** Perfil cinético de liberación de AcVE (Cantidades acumuladas corregidas): Fórmula 2A

**Muestra 2:** Perfil cinético de liberación de AcVE (Cantidades acumuladas corregidas): Fórmula 2B

**Muestra 1:** 13 valores 0,0 hasta 24853,3

**Muestra 2:** 13 valores 0,0 hasta 16737,0

Este procedimiento compara los datos en dos columnas del actual fichero de datos. Realiza varios tests estadísticos y gráficos para comparar las muestras. El F-test en la Tabla de ANOVA comprobará si hay alguna diferencia significativa entre las medias. Si hay, los tests de rangos múltiples le indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras.

**Tabla ANOVA:****Análisis de la varianza**

Fuente	Sumas de cuad	Gl	Cuadrado medio	Cociente F	p-valor
Entre grupos	2,5236E8	1	2,5236E8	9,11	0,0059
Intra grupos	6,6491E8	24	2,7704E7		
Total (Corr)	9,1727E8	25			

La Tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio que en este caso es igual a 9,10906, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos variables a un 95,0%.

*PUBLICACIÓN DE LOS RESULTADOS*

*COMUNICACIONES Y PUBLICACIÓN  
DE LOS RESULTADOS*

**CONGRESOS NACIONALES (ESPAÑA)**

- **V Congreso de la SEFIG (Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica) y 2ª Jornadas de Tecnología Farmacéutica**  
“Estudio del comportamiento reológico de lipogeles de aceite de oliva”  
Muñoz M, Ruiz MA, Gallardo V  
Acta del “V Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica”: 95-96.  
Valencia, 4-6 de Febrero de 2001
- **X Symposium Científico-Técnico de EXPOLIVA 2001. International Fair of Olive oil and Allied Industries**  
Foro de la Cultura del Aceite de Oliva y la Salud.  
“El aceite de oliva en formulaciones farmacéuticas y cosméticas”  
Muñoz M, Ruiz MA, Gallardo V  
Acta de la “Feria Internacional del Aceite de Oliva e Industrias Afines-Expoliva”: 1-1.  
Jaén, 24-26 de Mayo de 2001
- **VI Congreso de la SEFIG (Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica) y 3ª Jornadas de Tecnología Farmacéutica**  
“Puesta a punto de un método de valoración de meloxicam en HPLC-UV”: 295-298 del Acta del Congreso.  
Muñoz M, Gallardo V, Ruiz MA, Blanco MJ  
“Puesta a punto de un método de valoración de meloxicam en espectrofotometría-UV”: 291-293 del Acta del Congreso.  
Muñoz M, Ruiz MA, Gallardo V  
Acta del “VI Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica”.  
Granada, 9-11 de Febrero de 2003
- **XI Symposium Científico-Técnico de EXPOLIVA 2003. International Fair of Olive oil and Allied Industries**  
Foro de la Salud y el Aceite de Oliva  
“Estudio de formulaciones de hidro y lipogeles elaborados a base de aceite de oliva con vitamina E de aplicación cosmética fotoprotectora”  
Muñoz M, Ruiz MA, Gallardo V

“Beneficios del aceite de oliva y del aloe vera en cosmética hidratante”  
Pleguezuelos M, Muñoz M, Ruiz MA, Gallardo V  
Acta de la “Feria Internacional del Aceite de Oliva e Industrias Afines-  
Expoliva”.  
Jaén, 14-16 de Mayo de 2003

- **II Congreso de Fitoterapia. XXIII Reunión de la AEMN (Asociación Española de Médicos Naturistas). II Reunión de la SEFIT (Sociedad Española de Fitoterapia)**  
“Nuevas formulaciones con aceite de oliva y vitamina E”  
Pérez C, Muñoz M, Ruiz MA, Gallardo V  
Facultad de Farmacia de Granada, 21-23 de Noviembre de 2003
- **V Jornadas del Olivar Ecológico: ECOLIVA 2004**  
“Formulaciones de aceite de oliva como vehículos de hipocolesteremiantes y activos cosméticos”  
Muñoz M, Ruiz MA, Gallardo V  
Jaén, 2004
- **VII Congreso de la SEFIG (Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica) y 4ª Jornadas de Tecnología Farmacéutica**  
“Estudio de permeación y metabolismo de acetato de  $\alpha$ -tocoferol a partir de geles cosméticos”  
Muñoz M, Ruiz MA, Gallardo V, Santi P, Nicoli S  
Salamanca, 2005
- **II Jornadas Científicas en Ciencias de la Salud**  
“Celulitis: un problema con solución”  
Cuevas C, García B, Muñoz M, Gallardo V  
Granada, 2005

### **CONGRESOS NACIONALES (ARGENTINA)**

- **XXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario**  
“Relación entre la liberación de  $\alpha$ -tocoferol en sistemas de aplicación dérmica con sus perfiles reológicos”  
Gallardo V, Ruiz MA, Muñoz M, Lavaselli S, Calafato R  
Rosario, 2003

## **CONGRESOS INTERNACIONALES**

- **Congreso Internacional Eurorheo 2002. Joint Meeting of British, Italian, Portuguese and Spanish Rheologists**  
“The influence of olive oil-derived surfactants on the rheological characteristics of lipogels”: 489-491  
Muñoz M, Morales ME, Ruiz MA  
“Influence of the concentration and temperature of a gelling agent on the viscosity of a preparation for topical use”: 379-380  
Muñoz M, López-Viota J, Ruiz MA  
“Viscous properties of an ethylcellulose latex”, pages 275-277  
Morales ME, Muñoz M, Gallardo V  
Acta “Progress in Rheology-Theory and Applications”  
Torremolinos (Málaga), April 24 to 26, 2002
- **European Conference on Drug Delivery and Pharmaceutical Technology**  
“Meloxicam release study in Franz-type diffusion cells”  
Muñoz M, Ruiz MA, Gallardo V  
Acta del Congreso “Programme and Abstracts”: 85  
Sevilla, 10-12 de Mayo de 2004
- **I Congreso Internacional de Formulación Magistral y IX Congreso Científico de la Asociación Española de Farmacéuticos Formulistas**  
“Soluciones en pediatría para administración de Omeprazol: ¿Fórmulas a medida?”  
Ruiz MA, Sierra J, Muñoz M, Gallardo V  
Ciudad Real, 10-13 de Noviembre de 2004

## **PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS**

- Influence of the concentration of a gelling agent and the type of surfactant on the rheological characteristics of oleogels.  
Ruiz MA, Muñoz M, Morales ME, Gallardo V  
*Il Farmaco*, 58: 1289-1294 (2003)
- Moisturizing capacity of Aloe vera gel in skin creams made with silicone-based and olive oil-based latex preparations.  
Ruiz MA, Pleguezuelos M, Muñoz M, Gallardo V  
*J Appl Cosmetol*, 22: 25-33 (2004)
- Nuevas formulaciones con aceite de oliva y vitamina E  
Muñoz M, López-Viota M, Ruiz MA  
*Revista de Fitoterapia*, 4 (2): 173-174 (2004)

- Formulations of hydrogels and lipogels with vitamin E  
Gallardo V, Muñoz M, Ruíz MA  
*J Cosmet Dermatol*. Accepted in Press (2004)
- Rheological behaviour of gels and meloxicam release  
Ruiz MA, Muñoz M, García JD, Gallardo V  
*Rheol Acta*. Received in Press (2004)