

**Estandarización de una metodología para la evaluación de los perfiles
cinéticos de permeación de fármacos utilizando celdas de Franz a
condiciones fisiológicas**

EDGAR EDUARDO ENCISO PEÑA

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2013**

**Estandarización de una metodología para la evaluación de los perfiles
cinéticos de permeación de fármacos utilizando celdas de Franz a
condiciones fisiológicas**

EDGAR EDUARDO ENCISO PEÑA

Trabajo de grado para optar por el título de Químico Farmacéutico

**TUTOR
CONSTAIN HUGO SALAMANCA MEJÍA, Ph.D**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2013**

Tabla de contenido

Resumen	1
Abstract.....	2
1. Introducción	3
2. Descripción del trabajo	5
2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia.....	5
2.2 Marco teórico y estado del arte	7
2.3 Aporte intelectual del investigador	13
2.4 Objetivos	14
2.4.1 Objetivo general	14
2.4.2 Objetivos específicos	14
2.5 Materiales y métodos.....	15
2.5.1 Materiales.....	15
2.5.2 Obtención de curva de calibración de Azul de metileno.....	15
2.5.3 Preparación del montaje	15
2.5.4 Obtención del perfil de permeabilidad	16
2.5.5 Recopilación de datos para estandarización	16
2.6 Resultados	17
2.7 Discusión	24
2.7 Impacto ambiental.....	35
2.9 Conclusiones	36
2.10 Recomendaciones	37
3. Referencias.....	38
Anexo 1. Obtención de los parámetros de validación linealidad, repetibilidad y precisión intermedia para la metodología de cuantificación de Azul de Metileno mediante espectrofotometría UV-VIS	40
Anexo 2. Método de los trapecios y muestra de cálculo del AUC	44

Listado de Tablas

Tabla 1. Datos de área bajo la curva del perfil de permeabilidad de Azul de Metileno a diferentes temperaturas, ceteris paribus, tras 30 horas.....	21
Tabla 2. Datos de área bajo la curva del perfil de permeabilidad de Azul de Metileno con diferentes tipos de membrana, ceteris paribus, tras 30 horas.....	21
Tabla 3. Datos de área bajo la curva del perfil de permeabilidad de Azul de Metileno a diferentes velocidades de agitación, ceteris paribus, tras 26 horas.....	22
Tabla 4. Datos de área bajo la curva del perfil de permeabilidad de Azul de Metileno con membranas de Celulosa regenerada de diferentes tamaños de poro, ceteris paribus, tras 30 horas.....	22
Tabla 5. Datos de correlación de los resultados obtenidos con el modelo de Korsmeyer-Peppas para los sistemas de azul de metileno a diferentes temperaturas, ceteris paribus.....	23
Tabla 6. Datos de correlación de los resultados obtenidos con el modelo de Korsmeyer-Peppas para los sistemas de azul de metileno con diferentes tipos de membrana, ceteris Paribus	23
Tabla 7. Datos de correlación de los resultados obtenidos con el modelo de Korsmeyer-Peppas para los sistemas de azul de metileno a diferentes velocidades de agitación, ceteris paribus.....	24
Tabla 8. Datos de correlación de los resultados obtenidos con el modelo de Korsmeyer-Peppas para los sistemas de azul de metileno con membranas de Celulosa regenerada de diferentes tamaños de poro, ceteris paribus.....	25

Listado de Figuras

Figura 1. Diagrama general de una celda de Franz	10
Figura 2. Perfiles de permeabilidad para Azul de Metileno a diferentes temperaturas, Ceteris Paribus (temperatura 37°C, velocidad de agitación 820 rpm y membrana de celulosa regenerada de 5 kDa)	17
Figura 3. Datos de área bajo la curva del perfil de permeabilidad de Azul de Metileno a diferentes velocidades de agitación, ceteris paribus, tras 26 horas	18
Figura 3. Perfiles de permeabilidad de Azul de Metileno con diferentes tipos de membrana, Ceteris Paribus (temperatura 37°C, velocidad de agitación 820 rpm y membranas de 5 kDa)	18
Figura 4. Perfiles de permeabilidad de Azul de Metileno a diferentes velocidades de agitación, Ceteris Paribus (temperatura 37°C y membrana de celulosa regenerada de 5 kDa)	18
Figura 5. Perfiles de permeabilidad de Azul de Metileno con membranas de Celulosa regenerada de diferentes tamaños de poro, Ceteris Paribus (temperatura 37°C y velocidad de agitación 820 rpm)	19
Figura 6. Gráfico logarítmico de la fracción de Azul de Metileno liberado al compartimento 2 en función del tiempo a diferentes temperaturas, Ceteris Paribus (velocidad de agitación 820 rpm y membrana de celulosa regenerada de 5 kDa).....	20
Figura 7. Gráfico logarítmico de la fracción de Azul de Metileno liberado al compartimento 2 en función del tiempo con diferentes tipos de membrana, Ceteris Paribus (temperatura 37°C, velocidad de agitación 820 rpm y membranas de 5 kDa).	21
Figura 8. Gráfico logarítmico de la fracción de Azul de Metileno liberado al compartimento 2 en función del tiempo a diferentes velocidades de agitación, Ceteris Paribus (temperatura 37°C y membrana de celulosa regenerada de 5 kDa)	22
Figura 9. Gráfico logarítmico de la fracción de Azul de Metileno liberado al compartimento 2 en función del tiempo utilizando la membranas de celulosa regenerada con diferentes tamaños de poro, Ceteris Paribus (temperatura 37°C y velocidad de agitación 820 rpm)	23
Figura 9. Aproximación gráfica al sistema de la Celda de Franz a t_1	25
Figura 10. Aproximación gráfica al sistema en t_2	26
Figura 11. Aproximación gráfica del sistema entre t_2 y t_e	27

Resumen

Introducción: La problemática de la resistencia adquirida de las bacterias a los antibióticos tiene una incidencia global que ha llevado al desarrollo de múltiples estrategias para mitigarlo. Las matrices poliméricas bioprotectoras son una de estas estrategias. Con el tiempo se han desarrollado algunas de estas matrices para comercialización, sin embargo estas son muy costosas y no son asequibles a múltiples compañías, surgiendo la necesidad de obtener nuevas opciones de matrices bioprotectoras menos costosas. Para evaluar estas matrices poliméricas es necesaria la realización de estudios previos relacionados con la fundamentación fisicoquímica básica, tales como estudios de solubilidad, cinéticas de disolución y permeabilidad, con los cuales obtener caracterizaciones iniciales del comportamiento de la matriz polimérica.

Objetivos: Determinar la viabilidad de la aplicación de la celda de Franz como técnica para caracterizar matrices poliméricas con potenciales aplicaciones bioprotectoras mediante una caracterización inicial del comportamiento de la misma, utilizando el azul de metileno como molécula modelo.

Materiales y métodos: Se tomaron perfiles de permeabilidad para el azul de metileno, sin réplicas, cuantificando en función del tiempo, mediante espectrofotometría UV-VIS, la concentración de Azul de Metileno en los compartimientos de la celda de Franz a diferentes condiciones de Temperatura, velocidad de agitación, tipo de membrana y tamaño de poro de membrana. El área bajo la curva (AUC) de cada perfil, dejando variar un parámetro a la vez con todo lo demás constante (Las condiciones estándar fueron 37°C, 820 rpm y membrana de celulosa regenerada con poros de 5 kDa), fue la variable de cuantificación. Así bien, se tomaron perfiles de permeabilidad a 25°C, 31°C, 34°C y 37°C, luego con una membrana de celulosa, nitrocelulosa y celulosa regenerada, luego con velocidades de agitación de 573 rpm, 820 rpm y 1073 rpm, finalmente con membranas de celulosa regenerada con poros de 5 kDa, 10 kDa y 30 kDa. Se evaluó el efecto de las variables mediante la comparación de su AUC y la correlación de los resultados con el modelo de Korsmeyer-Peppas tratando matemáticamente los resultados para que sean comparables con lo predicho por el mismo y viendo el grado de similaridad entre ellos.

Resultados: Se obtuvo que las cuatro variables en estudio generaban un efecto crítico en el comportamiento de los perfiles de permeabilidad obtenidos, también se obtuvo correlación entre los resultados y el modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas.

Palabras Clave

Celda de Franz; Azul de Metileno; Perfil de permeabilidad; Bioprotección.

Abstract

Introduction: The problem of acquired resistance from bacteria to antibiotics has an overall incidence, which has caused that many pharmaceutical scientists focus their research on it. The bioprotector polymeric matrices are one of the developed strategies to mitigate it. Over time they have developed some of these matrices for marketing, however these are very expensive and not affordable for many companies. Springing the need for new options of bioprotective matrices with lower costs. The above also leads to the need of run basic physicochemical studies such as kinetic dissolution and permeability profiling studies, which can give an overall characterization of the polymeric matrix behavior on a further application.

Objectives: Determinate the feasibility of the implementation of the Franz's cell as a technique to characterize polymeric matrices with potential applications as bioprotective by an initial characterization of the behavior of the system, using methylene blue as a model molecule. Searching the effect of the variables temperature, membrane type, mixing speed and membrane pore size, and the correlation of the results with the Korsmeyer-Peppas semi-empirical model, mainly used for evaluate the performance of these polymeric matrices.

Materials and methods: Permeability charts were taken for methylene blue, without repetitions, quantified by the area under the curve (AUC) of each chart and leaving vary only one parameter at a time (The standard conditions were 37°C, 820 rpm and a membrane made of regenerated Cellulose with 5 kDa pores), with everything else constant. Thereby, there were taken permeability chats at 25°C, 31°C, 34°C and 37°C, then with a cellulose, nitrocellulose and regenerated cellulose membrane, then with mixing speeds of 573 rpm, 820 rpm and 1073 rpm, finally with regenerated cellulose membranes with pores of 5 kDa, 10 kDa and 30 kDa. The effect of the variables was determined by comparing the AUC of the charts and the correlation of the results with the Korsmeyer-Peppas model was determined doing a mathematical treatment to the results and seeing the degree of similarity between them and the predictions of the model.

Results: It was found that the four studied variables generate a critical effect on the behavior of permeability charts obtained, high correlation degree was also obtained between the results and the semi-empirical model of Korsmeyer-Peppas.

Key words:

Franz Cells; Methylene Blue; Permeability chart; Bioprotection.

1. Introducción:

Problemas como la pérdida de eficacia de los antibióticos asociada al desarrollo de la resistencia microbiana ha llegado a preocupar al mundo entero, sin embargo, el desarrollo de las ciencias farmacéuticas, relacionadas con las etapas de diseño y formulación ha podido brindar soluciones a este problema. Una de las soluciones más eficientes es la utilización de ciertas matrices poliméricas que presentan un efecto bioprotector sobre el fármaco, esto es, ayuda a que el fármaco llegue a su diana farmacológica mientras impide que los mecanismos de defensa de la bacteria dañen al fármaco.

Sin embargo, al ser una tecnología novedosa, se encuentran en la actualidad muy pocas opciones comerciales de este tipo, que además son muy costosas como el Eudragit® L100, que puede costar en más de \$55.000 por kilogramo sin tener en cuenta el costo de envío e importación (Zaubo Imports and Shipments, 2013), haciéndose asequibles sólo para las grandes industrias multinacionales, siendo entonces muy necesario desarrollar nuevos materiales con propiedades bioprotectoras.

De acuerdo a lo anterior surge la necesidad de implementar técnicas que permitan predecir la viabilidad de aplicación que tengan determinadas matrices poliméricas bioprotectoras. Estas técnicas deberán ser lo más prácticas y económicas posibles, dado que de esta forma podrán hacerse asequibles en laboratorios académicos como los de las universidades locales.

La aplicabilidad de determinada matriz polimérica como excipiente de formulación está condicionada a que no afecte negativamente el perfil biofarmacéutico del fármaco, de acuerdo a su proceso ADME (Absorción, distribución, metabolismo y eliminación). El proceso que podría afectarse más críticamente es el de la absorción. Por lo que a nivel de laboratorio las técnicas a utilizar deberán permitir obtener información del perfil de solubilidad y permeabilidad que presente el fármaco, tanto en presencia, como en ausencia de la matriz polimérica. Concluyendo que no haya un cambio negativo en el mismo, porque esto implicaría deficiencias biofarmacéuticas a la hora de implementarse en seres vivos, ya sea por vía cutánea, oral o sublingual.

Otro aspecto importante que permite conocer el perfil de permeabilidad es el grado de afinidad que pueda llegar a presentarse entre el polímero y el fármaco. Esto es importante porque si esta interacción es muy fuerte, no se dará una liberación eficiente del fármaco y, si es muy débil, el polímero no podrá ejercer un efecto bioprotector sobre el mismo.

El método de la Celda de Franz es una de las herramientas más utilizadas a nivel mundial para estos fines como se evidencia en Kumar (1993), Bonferoni

(1999) o Klimundová (2006), ya que permite determinar perfiles de permeabilidad de manera muy simple y económica. Esta técnica se basa en la utilización de una celda bicompartimental con agitación constante, en cuyo centro se coloca una membrana con determinadas características (asociadas a lo que se quiera determinar). Esta celda posee un sistema de reflujos de temperatura ajustable, de tal forma que pueda controlarse la temperatura del ensayo. En ambos compartimentos se deposita un medio solvente determinado pero sólo a uno de ellos se agrega el fármaco y, en función del tiempo, se cuantifica la concentración del fármaco en los compartimentos. Esto último por la metodología analítica o instrumental que se haya determinado pertinente.

Este proyecto pretende estandarizar la metodología de la celda de Franz para su posterior utilización en laboratorios de investigación de la universidad Icesi. Para esto se realizaron ensayos a diferentes condiciones de temperatura, velocidad de agitación, tipo de membrana utilizada y tamaño de poro en membranas del mismo tipo.

Los perfiles de permeabilidad obtenidos son analizados en términos de su Área Bajo la Curva (AUC) y se determina el efecto que tiene cada variable en el resultado obtenido. Todo lo anterior para una molécula modelo fácilmente cuantificable por espectrofotometría UV-VIS como lo es el Azul de Metileno.

También se realiza un análisis teórico de los resultados obtenidos en función de los modelos cinéticos derivados de las leyes de Fick más comúnmente utilizados para tal fin; los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas. Para así concluir sobre qué tan alineados se encuentran los resultados obtenidos respecto a estos modelos.

2. Descripción del proyecto:

2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia:

Las ciencias farmacéuticas se han desarrollado de una manera increíble desde muchos campos en los últimos tiempos, la aparición de la biotecnología, modelos computacionales y en general de herramientas, metodologías y equipos de mayor eficiencia han permitido revolucionar campos como el desarrollo de nuevos medicamentos (*Drug Discovery*). Sin embargo, otro de los campos de gran importancia para el desarrollo de medicamentos con propiedades óptimas es el correspondiente al diseño y formulación.

Las ciencias de investigación y desarrollo de productos y específicamente, la relacionada con el diseño y formulación estudian los procesos, materiales y condiciones que son necesarios para obtener una matriz que medie la entrega del fármaco a su diana o blanco farmacológico, asegurando su estabilidad y administrabilidad. Con el paso del tiempo, estas ciencias han permitido desarrollar muchas estrategias para obtener propiedades definidas en los medicamentos, desde la corrección organoléptica para hacer más atractivos los medicamentos, hasta patrones de liberación modificada de muchos fármacos y con ello, obtener perfiles terapéuticos específicos.

Con el paso de los años van surgiendo nuevos problemas, retos a vencer mediante estrategias de diseño y formulación. Uno de los problemas más importantes de la actualidad (Ackerman, S., & Gonzales, R. 2012) recae en la bioresistencia adquirida de las bacterias patógenas a los antibióticos de primera elección terapéutica, siendo uno de sus principales causantes una inadecuada utilización de los antibióticos que, al automedicarse o al dejar su terapia incompleta con la desaparición de los síntomas perceptibles, han mediado la aparición de microorganismos resistentes a estos.

Por otro lado, el desarrollo de la ingeniería de polímeros y la nanotecnología de materiales han permitido la aparición de nuevas estrategias de diseño y formulación para dar solución a este tipo de problemas. Estudios previos han mostrado que el uso de determinadas matrices poliméricas permite aumentar la eficacia de los antibióticos mediante un efecto de bioprotección del fármaco (Arenas et al., 2012), lo resulta especialmente interesante para los antibióticos cuyo espectro de acción ya se ha vuelto casi nulo debido a la resistencia microbiana. Estos estudios han mediado entonces la aparición en el mercado de dichas matrices poliméricas como materias primas, sin embargo, debido a que son muy pocas marcas las disponibles hasta el momento, sus precios son muy altos y sólo son asequibles por las grandes industrias multinacionales. La empresa *EVONIK INDUSTRIES*, por ejemplo, que es de las más populares con

sus matrices poliméricas como Eudragit® o PlasACRYL®, comercia sus productos a más de \$55.000 por kilogramo, sin tener en cuenta los costos de envío e importación (Zauba Imports and Shipments, 2013). Teniendo en cuenta lo anterior y con el agravante de que la mayoría de los antibióticos cubiertos por el Plan Obligatorio de Salud (POS) en Colombia son de los que más resistencia microbiana presentan actualmente (Redalyc, 2011), se puede afirmar que esta situación es una problemática de alta relevancia para salud pública en Colombia.

Matrices poliméricas como el Eudragit E® presentan por parte de sus empresas manufactureras estudios previos donde se soporta su biocompatibilidad con el cuerpo humano, por lo que pequeñas derivatizaciones de sus estructuras pueden presentar alta capacidad potencial de servir como matrices poliméricas bioprotectoras también. Resulta pertinente caracterizarlas y realizar un estudio donde se determine si es viable su aplicación para tal fin. De lo anterior se sigue que es apropiado estandarizar una metodología que permita evaluar dicha viabilidad. Siendo que la determinación de perfiles cinéticos mediante celdas de Franz es una potencial técnica para este fin y que esta apenas está siendo implementada en la universidad Icesi, surge de ahí la pregunta de este proyecto: ¿Cuáles son los parámetros que afectan significativamente la reproducibilidad de esta técnica, de tal manera que al controlarlos se garantice un resultado estandarizado?

2.2 Marco teórico y estado del arte:

En el desarrollo de nuevos fármacos ha sido vital poder predecir no sólo comportamiento farmacodinámico, sino también el comportamiento farmacocinético. El determinar el comportamiento del proceso ADME para un fármaco es importante ya que de nada sirve que el fármaco tenga gran potencial de interacción con el sitio de acción farmacológica, si no es capaz de llegar hasta la misma. Hablando de formas farmacéuticas no inyectables, dentro de todos los procesos del ADME, quizá el más importante de todos sea la absorción, puesto que es esta la que determina que el fármaco sea capaz de ingresar sistémicamente al organismo y pueda encontrarse con la diana farmacológica (Avdeef, 2003).

De acuerdo a lo anterior se sigue la necesidad de implementar metodologías que permitan predecir la permeabilidad a través de membranas de un fármaco a nivel *in vitro* o bien en las etapas primarias de preformulación, donde es necesario el desarrollo y la implementación de metodologías, rápidas y económicas, que permitan la obtención de información que dirija las posteriores investigaciones. Estas metodologías tendrían múltiples potenciales aplicaciones, dado que también permitirían evaluar perfiles de permeabilidad para formas farmacéuticas de liberación modificada, permitiendo comprender el comportamiento de asociación que podría llegar a haber entre fármacos y excipientes.

Antes de hablar sobre cualquier técnica que permita estimar la permeabilidad de un fármaco, es necesario definir los fenómenos fisicoquímicos implicados en dicho proceso, especialmente los relacionados con los fenómenos de difusión y la permeabilidad.

La capacidad del fármaco para permear una membrana dependerá en principio de su capacidad para llegar hasta la misma. El fenómeno cinético que describe este proceso para cualquier soluto se denomina difusión y, según Atkins (1998), para un solvente acuoso depende de las interacciones intermoleculares que se presentan entre el soluto y el solvente. De acuerdo a lo anterior se puede deducir que para que se dé un proceso de difusión resulta fundamental que, por lo menos, el soluto sea soluble en el solvente.

La difusión fue descrita de manera teórica por Fick (Castellan, 1983) quien determinó dos ecuaciones que permitieron describir estos fenómenos, estas ecuaciones son comúnmente conocidas como la primera y segunda Ley de Fick y se definen, respectivamente, de la siguiente manera:

$$\vec{J}_i = -D_i \nabla C_i(\vec{r}) \quad (1)$$

Donde el vector J_i es el flujo de un soluto i dentro del sistema, D_i es el coeficiente de difusión del soluto i en el sistema y ∇C_i representa los gradientes de concentración del sistema.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D \nabla^2 C_i(\vec{r}, t) \quad (2)$$

Donde $\frac{\partial C_i}{\partial t}$ es la difusión del soluto i , D es el coeficiente de difusión del soluto y $\nabla^2 C_i$ es la variación de los gradientes de concentración del sistema respecto a las variables dimensionales del mismo.

La primera ley de Fick (Ec. 1) predice que el flujo “ j ” de moléculas dentro del seno del sistema en un intervalo de tiempo determinado va a depender de la facilidad que tengan las moléculas para moverse a través del mismo, representado por el coeficiente de difusión “ D ”, y de los gradientes de concentración que se presenten en el mismo (término diferencial). La segunda ley (Ec. 2) representa el proceso de difusión como tal, esto es, la variación de la concentración del soluto en un punto determinado del sistema respecto al tiempo, prediciendo que esta dependerá directamente de la variación que haya en los gradientes de concentración a lo largo del sistema (término diferencial) y de la facilidad con que puedan migrar las moléculas dentro del sistema “ D ”.

La permeabilidad de los fármacos, de acuerdo a Rosenbaum S. (2011), se define como la capacidad del fármaco de ser absorbido a través de las membranas celulares a favor de gradientes de concentración de manera espontánea y es una propiedad que depende del tamaño molecular, de la polaridad y del equilibrio de disociación electrolítica a las condiciones de entorno a la membrana.

El tamaño molecular influye principalmente en la vía de absorción que primará en el fármaco. Existen dos vías de absorción celular (Malmsten, 2002); la vía paracelular y la vía transcelular. La vía paracelular es la que atraviesa entre los espacios intersticiales de las membranas celulares, mientras que la vía transcelular es la que atraviesa la membrana como tal, ya sea por difusión pasiva o difusión facilitada por transportador.

De acuerdo con lo anterior se concluye que la vía paracelular sólo es relevante en moléculas de muy bajo tamaño molecular. Siendo que los fármacos, especialmente los antibióticos, suelen ser moléculas de gran tamaño molecular (>500 Da), la vía paracelular no juega un papel primordial en su absorción, siguiéndose que el tamaño molecular no sea una variable de gran interés para este análisis.

Al contrario del tamaño molecular, la polaridad es una propiedad trascendental en la permeabilidad de un fármaco y debe encontrarse equilibrada, ya que si el fármaco es muy polar, se disolverá muy bien en el medio fisiológico acuoso, pero será repelido por la naturaleza lipídica de la membrana, mientras que si es muy apolar podría atravesar muy fácilmente las membranas, pero presentaría una fuerte limitación para disolverse.

En términos generales, la polaridad de los fármacos suele expresarse en términos de su coeficiente de distribución logarítmico, el cual se define para un sistema bifásico de agua a un pH específico y n-octanol en el cual se distribuye un soluto de interés, en este caso un fármaco determinado. El coeficiente de distribución logarítmico es entonces el logaritmo del cociente entre la concentración del fármaco que se distribuye hacia el n-octanol y la del fármaco que se distribuye hacia el Agua a determinado pH, lo que matemáticamente sería:

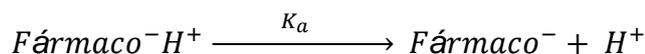
$$\log(D)_{pH} = \log\left(\frac{C_{n-Octanol}}{C_{Agua,pH}}\right) \quad (3)$$

Donde $\log_{10}(D)_{pH}$ es el coeficiente de distribución logarítmico a un pH determinado para el fármaco en estudio, $C_{n-Octanol}$ es la concentración de fármaco en la fase de n-octanol, o lo que es lo mismo, la proporción del fármaco que se distribuyó a la fase de n-octanol y $C_{Agua,pH}$ es la concentración del fármaco en la fase acuosa a un pH definido. Es importante mencionar que el $\log(D)_{pH}$ suele reportarse a un pH=7, en cuyo caso se expresa simplemente como $\log(D)$.

En relación a los sustratos correspondientes a electrolitos potenciales, el equilibrio de disociación electrolítica es importante igualmente para la permeabilidad de un fármaco. Si el fármaco es un electrolito pH-dependiente (un ácido o una base débil), como es el caso de la mayoría de fármacos electrolitos, su capacidad para atravesar membranas se determinará casi al 100% en función del pH del medio. Si se encuentra en su forma ionizada sus cargas serán repelidas por la membrana mientras que si se encuentra en su forma no ionizada podrá permear la membrana.

El equilibrio de disociación electrolítica para los fármacos suele tratarse de un equilibrio ácido-base, por lo que los parámetros más utilizados para describirlos son el pK_a y el pK_b , los cuales son medidas del equilibrio químico de la reacción de disociación ácido-base del fármaco en cuestión. Esto es, en términos generales de la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

Para un fármaco ácido



$$pK_a = pH - \text{Log} \left(\frac{[\text{Fármaco}^{-}]}{[\text{Fármaco}^{-}\text{H}^{+}]} \right) \quad (4)$$

Para un fármaco básico



$$pK_b = pOH - \text{Log} \left(\frac{[\text{Fármaco}^{+}]}{[\text{Fármaco}]} \right) \quad (5)$$

Ya habiendo descrito los fenómenos fisicoquímicos que están primariamente involucrados en la permeabilidad de los fármacos y cualquier otra molécula, se procede a discutir una de las metodologías más comúnmente utilizadas, por ser sencilla y económica, para estimar la permeabilidad de un fármaco o soluto; el método de la celda de Franz.

La celda de Franz es un instrumento que permite estudiar estos fenómenos de permeación a nivel experimental *in vitro* (Shiow-Fern, 2010). Ya que consta de dos compartimentos entre los cuales se puede colocar una membrana, si se adiciona fármaco o un soluto cualquiera en uno de los compartimentos, este tenderá de permear la membrana hasta alcanzar un equilibrio material. Levine (2004) afirma que estos fenómenos dependen significativamente del tiempo y se denominan fenómenos cinéticos. La presencia del fármaco en uno de los compartimento media una disminución del potencial químico del solvente, generando entonces un gradiente de potencial químico entre los compartimentos, dado que la barrera que se opone a que los compartimentos alcancen el equilibrio químico es la membrana, sobre esta membrana se ejerce una presión denominada presión osmótica. Se espera entonces que, en función del tiempo, el fármaco permee la membrana hasta que los potenciales químicos de ambos compartimentos se igualen, quedando en equilibrio. A continuación se muestra un diagrama general de la celda de Franz:

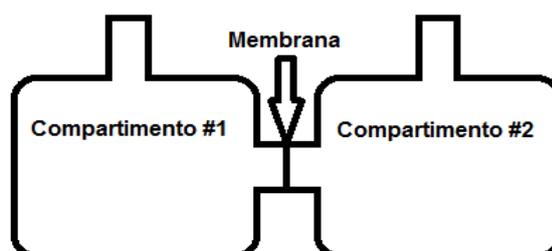


Figura 1. Diagrama general de una celda de Franz

Tras el desarrollo de instrumentos como la celda de Franz, surgió la necesidad de desarrollar modelos matemáticos que permitieran describir y predecir los comportamientos observados experimentalmente. Basándose en principios mecanocuánticos y mecanoestadísticos, la fisicoquímica logra determinar soluciones analíticas a todos estos sistemas, sin embargo, estas soluciones implican complejas operaciones y son muy poco generalizables, por lo que este comprensivo tratamiento matemático debe repetirse para cada especie molecular y condición ambiental (Liu, 2008). Debido a lo anterior este tipo de modelo analítico es muy poco utilizado.

Siendo que la necesidad de determinar modelos que resultaran suficientemente exactos pero más prácticos permanecía, no pasó mucho tiempo para que se pensara en utilizar modelos semiempíricos, esto es, tomar principios fisicoquímicos fundamentales y con correcciones empíricas basadas en los resultados experimentales para obtener modelos matemáticos sencillos que describan el comportamiento observado. Es así como se desarrolló el primer modelo que ajustó muy bien los resultados experimentales independientemente de las condiciones ambientales y de la especie química de la que se tratara; el modelo de Higuchi (Higuchi, 1963).

El modelo de Higuchi es un modelo semiempírico que se basa en la teoría macroscópica de difusión de Fick (Segunda ley de Fick), utilizando una corrección basada en la relación microscópica de difusión de Einstein-Smoluchowski, la cual está determinada por la ecuación:

$$\langle \Delta x \rangle^2 = 2Dt$$

Donde $\langle \Delta x \rangle^2$ es el recorrido cuadrático promedio de una molécula que difunde, D es el coeficiente de difusión y t el tiempo.

El modelo de Higuchi se planteó para diferentes sistemas de diferente naturaleza química, reológica y geométrica. Sin embargo, el modelo que se ajusta más al sistema de la celda de Franz es su forma más básica, la cual está definida por la siguiente ecuación:

$$Q = \sqrt{2Dt \left(A - \frac{C_s}{2} \right) C_s} \quad (7)$$

Donde Q es la fracción de fármaco liberada a un tiempo "t" determinado, D es el coeficiente de difusión, A es la cantidad total de fármaco presente en la matriz por unidad de volumen y C_s la solubilidad del fármaco en la matriz. Esta ecuación permite describir el comportamiento para una matriz homogénea con superficie planar, haciendo interfase con un sifón ideal. Donde la fracción

liberada sería equivalente a la fracción de fármaco que ha permeado la membrana a un tiempo determinado.

Dado que la mayoría de argumentos de la ecuación (7) son constantes, la ecuación de Higuchi suele expresarse de la siguiente manera:

$$Q = k\sqrt{t} = kt^{0.5} \quad (8)$$

Donde Q sigue siendo la fracción de fármaco liberada a un tiempo "t" determinado, t el tiempo y k sería:

$$k = \sqrt{2D \left(A - \frac{C_s}{2} \right) C_s} \quad (9)$$

Donde D es el coeficiente de difusión, A es la cantidad total de fármaco presente en la matriz por unidad de volumen y C_s la solubilidad del fármaco en la matriz.

Finalmente, la aplicabilidad de este modelo tan idealizado no fue compatible para todo tipo de sistema, ya que cuando se presentaban ciertos patrones de interacción intermolecular entre las especies químicas, las fuerzas de atracción y repulsión hacían que los patrones de difusión fueran algo diferentes de los patrones de difusión Fickianos, ideales. Es por esto que *Korsmeyer et al.* (1983) plantearon una versión más generalizada del modelo de Higuchi, el cual resulta ser el más utilizado en la actualidad debido a su simpleza y mayor rango de aplicación. Este modelo se rige por la ecuación:

$$Q = kt^n, \quad 0 < n < 1 \quad (10)$$

$$\ln(Q) = n\ln(t) + \ln(k) \quad (11)$$

Donde k es igual que en el modelo de Higuchi y el valor de n depende de las interacciones intermoleculares del sistema, conocidas como efecto matriz. Así pues, para un sistema donde las interacciones intermoleculares sean despreciables se hablaría de un $n=0.5$, lo que sugeriría una difusión Fickiana ideal, mientras que un $n \neq 0.5$ sugiere la presencia de un efecto matriz, ya sea que en la liberación hay un efecto significativo del fenómeno de hinchamiento inicial del polímero ($n > 0.5$) o que los fenómenos de asociación entre el fármaco, la matriz excipiente y incluso el medio circundante causan un perfil de cinético anómalo ($n < 0.5$).

2.3 Aporte intelectual del investigador:

Esta investigación se enmarca en obtener información fisicoquímica básica que aporte a futuros estudios de pre-formulación donde se evalúe el efecto pueden tener diversos sistemas excipientes sobre el proceso termodinámico de permeación de sustratos orgánicos con potencial aplicación farmacéutica y cosmética en diferentes medios biorrelevantes.

En función de lo evidenciado en los resultados obtenidos se realizará un análisis termodinámico, cinético y, en general, fisicoquímico para dar una explicación lógica y verídica a nivel molecular de los comportamientos observados a nivel macroscópico, para esto se realizarán las revisiones bibliográficas respectivas, nuevamente, en función de los resultados obtenidos y las tendencias evidenciadas. Lo anterior con fin de garantizar que la técnica realmente tiene un comportamiento extrapolable a otras especies químicas.

2.4 Objetivos:

2.4.1 Objetivo general:

Estandarización de una metodología para la evaluación de los perfiles cinéticos de permeación de fármacos utilizando celdas de Franz a condiciones fisiológicas.

2.4.2 Objetivos específicos:

- Obtener los parámetros de validación linealidad repetibilidad y precisión intermedia para la cuantificación del azul de metileno mediante espectrofotometría UV-VIS.
- Evaluar el efecto de la naturaleza química de diferentes membranas sintéticas, sobre los perfiles de permeabilidad del azul de metileno a 37°C en medio acuoso.
- Evaluar el efecto del tamaño de poro de membranas sintéticas de la misma naturaleza, sobre los perfiles de permeabilidad del azul de metileno a 37°C en medio acuoso.
- Evaluar el efecto de tres diferentes velocidades de agitación en la celda de Franz, sobre los perfiles de permeabilidad del azul de metileno a 37°C en medio acuoso.
- Evaluar modelos matemáticos semi-empíricos asociados a los fenómenos de difusión y permeabilidad.

2.5 Materiales y métodos.

2.5.1. Materiales:

Los compuestos utilizados en la parte experimental fueron: Azul de Metileno marca Merck®. Agua ultra purificada obtenida por un equipo Millipore®. Las membranas utilizadas fueron: membranas de Celulosa para diálisis con Peso molecular típico de corte de = 14.000 Daltons marca Aldrich®. Membranas de ultrafiltración de celulosa regenerada marca Millipore®, con tamaños de corte de 1000, 5000, 10000 y 30000 Dalton.

2.5.2 Obtención de curva de calibración de Azul de Metileno:

2.5.2.1 Preparar una solución stock 20 μM de Azul de Metileno grado analítico en agua destilada y realizar 5 diluciones 1:2.

2.5.2.2 Medir absorbancia a 664 nm para cada una de las diluciones preparadas en el paso anterior.

2.5.2.3 Utilizar regresión lineal por mínimos cuadrados para obtener la ecuación de la recta de Beer-Lambert.

2.5.3 Preparación de montaje:

2.5.3.1 Dejar, desde el día anterior al ensayo, la membrana que va a utilizarse activándose en agua destilada.

2.5.3.2 Llenar de agua potable el baño maría termostatzado hasta el tope definido.

2.5.3.3 Armar la celda de Franz, colocando la membrana activada en medio de los compartimentos y colocar los magnetos agitadores en los mismos.

2.5.3.4 Conectar a la celda de Franz el sistema de mangueras de reflujo desde el baño maría.

2.5.3.5 Activar la bomba de reflujo para que el agua del baño maría recircule por la chaqueta de calentamiento de la celda de Franz.

2.5.3.6 Montar en la celda de Franz el termómetro y los otros instrumentos de medición necesarios.

2.5.3.7 Adicionar sobre los compartimentos los volúmenes de agua destilada respectivos, 99 mL para el compartimento 1 y 100 mL para el compartimento 2. Tener en cuenta que el volumen del compartimento 1 se completa con la

adición de 1 mL de la solución 20 μ M de azul de metileno, la cual no se adicionará hasta que comience a cronometrarse el experimento.

2.5.3.8 Configurar y activar el baño maría a la temperatura en estudio y dejar termostatar por 20 minutos.

Encender el espectrofotómetro UV-VIS multicelda con termocupla integrada y configurarlo para tomar 2 lecturas fotométricas simultáneas a 664 nm y a la temperatura del estudio.

2.5.4 Obtención del perfil de permeabilidad:

2.5.4.1 Adicionar 1 mL de solución 20 μ M de Azul de Metileno en el compartimento 1 e inmediatamente iniciar el cronometraje del experimento.

2.5.4.2 Desde que inicia el cronometraje, tomar alícuotas de 3 mL de ambos compartimentos para medir absorbancias a 664 nm cada minuto durante los primeros 5 minutos, dichas alícuotas deberán reintegrarse al sistema lo más pronto posible.

2.5.4.3 A partir de los 5 minutos de toma de muestra, observar el comportamiento de variación de los datos de absorbancia obtenidos, si estos varían muy poco, se comienzan a tomar datos cada 5 minutos, si la variación tras dos mediciones cada 5 minutos es poca, tomar cada 15 minutos hasta completar una hora, si durante esta primera hora no se observa variación significativa de los datos se mide cada media hora hasta las primeras 3 horas. A partir de las primeras 3 horas es válido medir cada hora, si la variación es lenta.

2.5.4.4 A partir de los datos de absorbancia en función del tiempo, se puede usar la ecuación de Beer-Lambert obtenida de la curva de calibración para obtener datos de concentración de Azul de Metileno en los compartimentos 1 y 2 en función del tiempo. El gráfico obtenido de concentración de Azul de Metileno en el compartimento 2 contra tiempo es el perfil de permeabilidad a la temperatura, velocidad de agitación y tipo de membrana de estudio.

2.5.5 Recopilación de datos para estandarización:

Los procedimientos "Preparación de montaje" y "Obtención de perfil de permeabilidad", descritos en los dos numerales anteriores, deberán repetirse a condiciones de 25°C, 31°C, 34°C y 37°C, membranas de celulosa, nitrocelulosa y celulosa regenerada, velocidades de agitación de 573 rpm, 820 rpm y 1073 rpm y membranas de celulosa regenerada con poros de 5 kDa, 10 kDa y 30 kDa, siendo la condición estándar temperatura 37°C, velocidad de agitación 820 rpm y membrana de celulosa regenerada de 5 kDa.

2.6 Resultados:

Se procede a reportar tanto los datos, como los resultados obtenidos en este estudio. Se reportará todo en orden cronológico, de acuerdo a cómo se hicieron las cosas y qué se buscaba con cada uno.

Lo primero que se obtuvo en este estudio fue la curva de Calibración de Azul de metileno para poder cuantificarlo posteriormente, la cual tuvo un coeficiente cuadrático de correlación lineal (r^2) aproximado de 0.9986 y su ecuación fue:

$$Y = 0.073x - 0.048 \quad (12)$$

$$x = \frac{Y + 0.048}{0.073} \quad (13)$$

Donde Y es absorbancia a 664 nm y x concentración en μM (la obtención de los parámetros de validación de esta metodología de cuantificación se encuentran en el Anexo 1).

Los datos de absorbancia en función del tiempo fueron convertidos a concentración mediante la ecuación 12, obteniendo así los perfiles de permeabilidad. A continuación se reportan los 12 perfiles de permeabilidad obtenidos, de manera resumida, agrupados por tripletas de acuerdo a las variables de estudio:

Temperatura del sistema

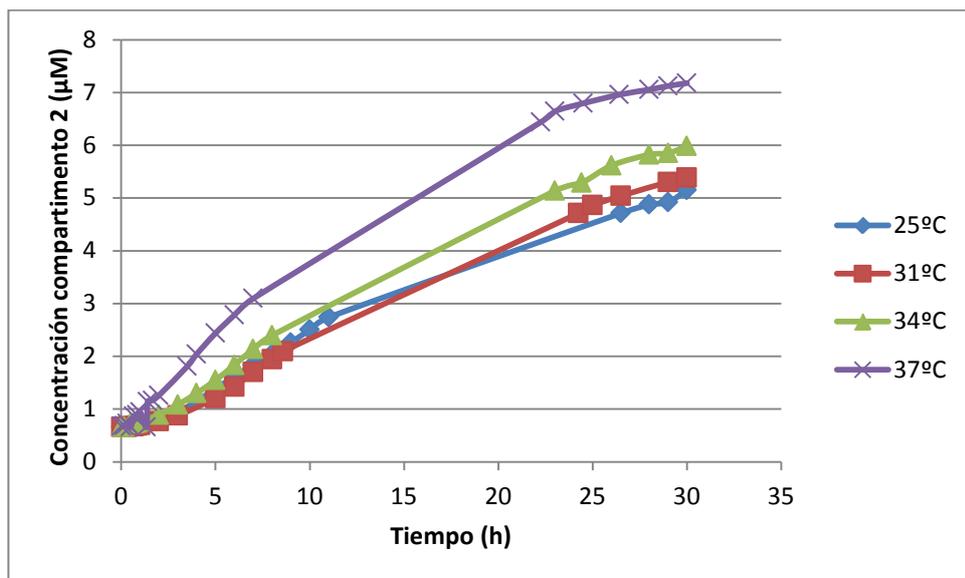


Figura 2. Perfiles de permeabilidad para Azul de Metileno a diferentes temperaturas, Ceteris Paribus (temperatura 37°C, velocidad de agitación 820 rpm y membrana de celulosa regenerada de 5 kDa).

Naturaleza química de la membrana

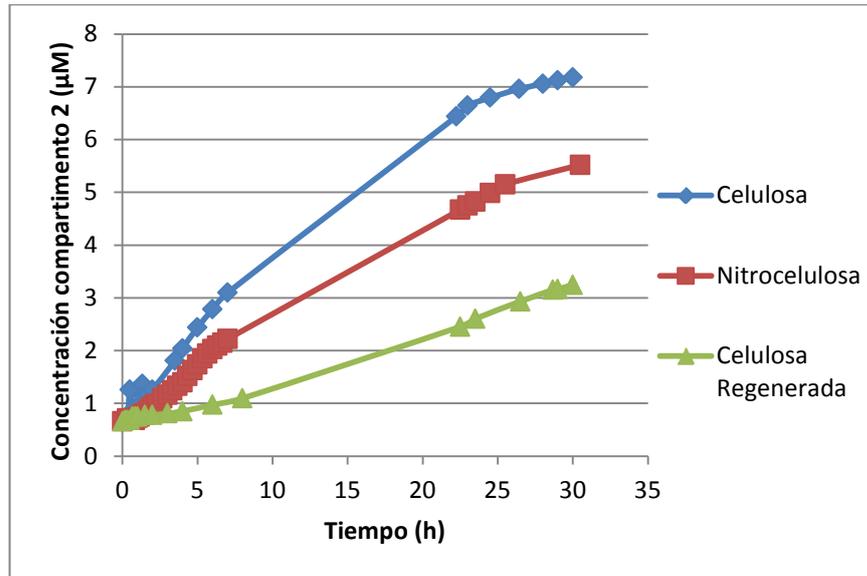


Figura 3. Perfiles de permeabilidad de Azul de Metileno con diferentes tipos de membrana, Ceteris Paribus (temperatura 37°C, velocidad de agitación 820 rpm y membranas de 5 kDa).

Velocidad de agitación

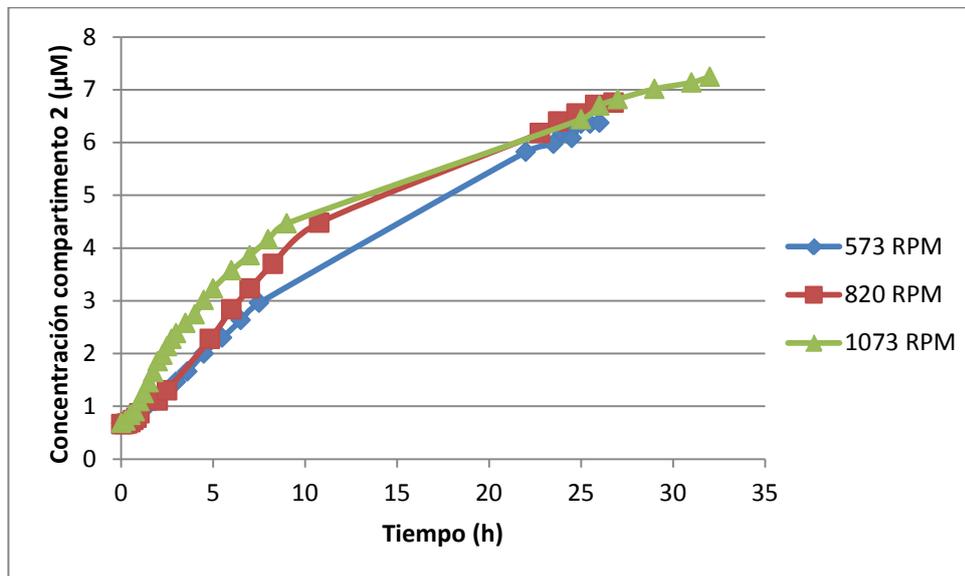


Figura 4. Perfiles de permeabilidad de Azul de Metileno a diferentes velocidades de agitación, Ceteris Paribus (temperatura 37°C y membrana de celulosa regenerada de 5 kDa).

Tamaño de poro

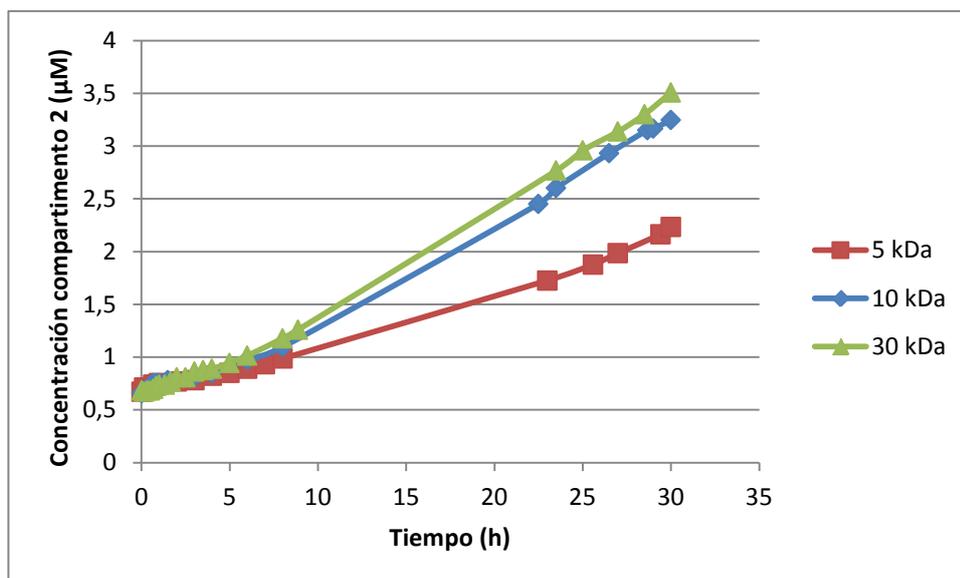


Figura 5. Perfiles de permeabilidad de Azul de Metileno con membranas de Celulosa regenerada de diferentes tamaños de poro, Ceteris Paribus (temperatura 37°C y velocidad de agitación 820 rpm).

A continuación se reportan los datos de área bajo la curva (AUC), calculados mediante el método de los trapecios y agrupados por variable de estudio (Muestra de cálculo y formalización del método en Anexo 2):

Temperatura del sistema

Tabla 1. Datos de área bajo la curva del perfil de permeabilidad de Azul de Metileno a diferentes temperaturas, ceteris paribus (velocidad de agitación 820 rpm y membrana de celulosa regenerada de 5 kDa), tras 30 horas.

Condición de estudio	AUC ₃₀ (µM*h)
25°C	91.82
31°C	92.79
34°C	106.80
37°C	139.05

Naturaleza Química de la membrana

Tabla 2. Datos de área bajo la curva del perfil de permeabilidad de Azul de Metileno con diferentes tipos de membrana, ceteris paribus (temperatura 37°C, velocidad de agitación 820 rpm y membranas de 5 kDa), tras 30 horas.

Condición de estudio	AUC ₃₀ (µM*h)
Celulosa	139.29
Nitrocelulosa	104.24
Celulosa regenerada	54.39

Velocidad de agitación

Tabla 3. Datos de área bajo la curva del perfil de permeabilidad de Azul de Metileno a diferentes velocidades de agitación, ceteris paribus (temperatura 37°C y membrana de celulosa regenerada de 5 kDa), tras 26 horas.

Condición de estudio	AUC ₂₆ (μM*h)
573 RPM	101.20
820 RPM	110.44
1073 RPM	125.99

Tamaño de poro

Tabla 4. Datos de área bajo la curva del perfil de permeabilidad de Azul de Metileno con membranas de Celulosa regenerada de diferentes tamaños de poro, ceteris paribus (temperatura 37°C y velocidad de agitación 820 rpm), tras 30 horas.

Condición de estudio	AUC ₃₀ (μM*h)
Celulosa regenerada 5 kDa	40.65
Celulosa regenerada 10 kDa	54.39
Celulosa regenerada 30 kDa	58.07

Finalmente se reportan los datos de correlación que tienen los resultados con la teoría. Para esto se utiliza el modelo de Korsmeyer-Peppas (Ecuación 11) para determinar el coeficiente de correlación lineal y el exponente “n” del modelo.

Temperatura del sistema

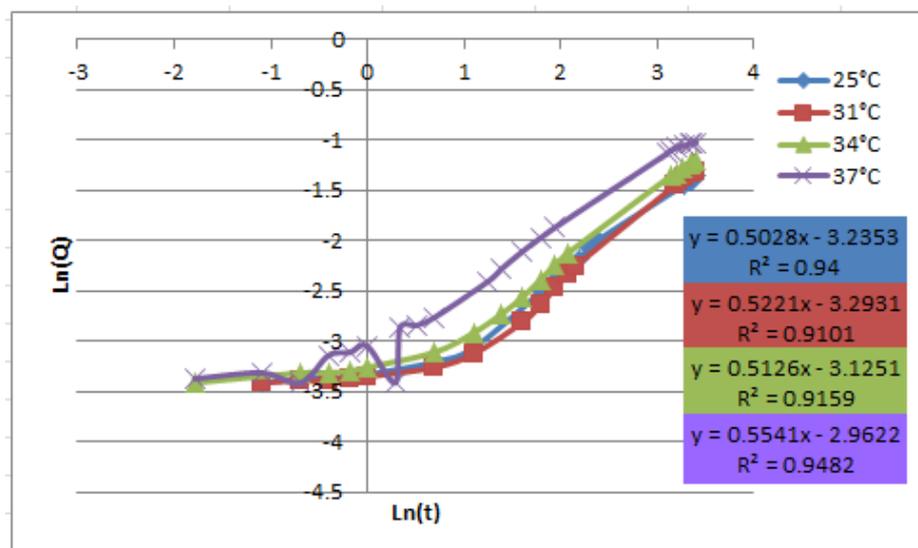


Figura 6. Gráfico logarítmico de la fracción de Azul de Metileno liberado al compartimento 2 en función del tiempo a diferentes temperaturas, Ceteris Paribus (velocidad de agitación 820 rpm y membrana de celulosa regenerada de 5 kDa).

Tabla 5. Datos de correlación de los resultados obtenidos con el modelo de Korsmeyer-Peppas para los sistemas de azul de metileno a diferentes temperaturas, ceteris paribus (velocidad de agitación 820 rpm y membrana de celulosa regenerada de 5 kDa).

Condición de estudio	R ²	n
25°C	0.94	0.5028
31°C	0.9101	0.5221
34°C	0.9159	0.5126
37°C	0.9482	0.5541

Naturaleza química de la membrana

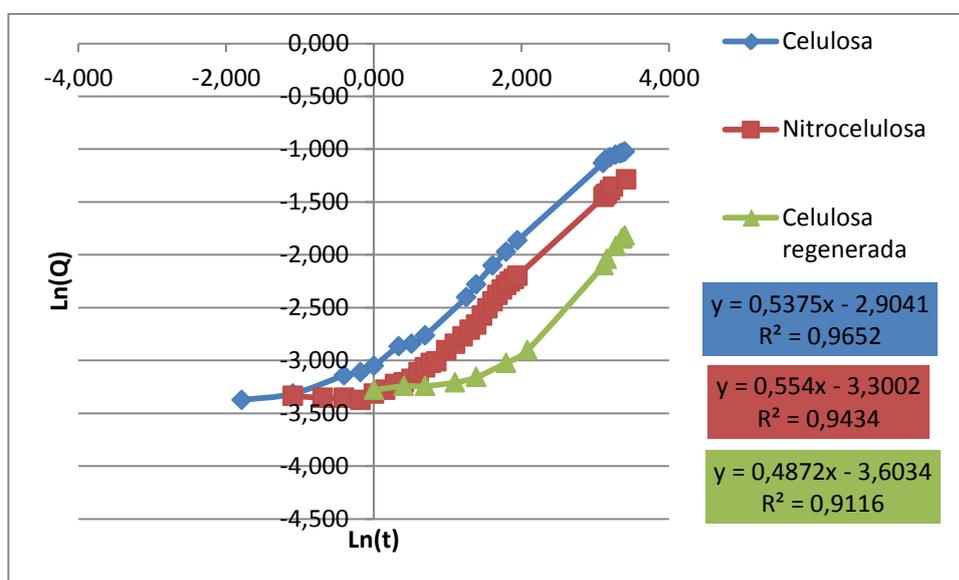


Figura 7. Gráfico logarítmico de la fracción de Azul de Metileno liberado al compartimento 2 en función del tiempo con diferentes tipos de membrana, Ceteris Paribus (temperatura 37°C, velocidad de agitación 820 rpm y membranas de 5 kDa).

Tabla 6. Datos de correlación de los resultados obtenidos con el modelo de Korsmeyer-Peppas para los sistemas de azul de metileno con diferentes tipos de membrana, ceteris paribus (temperatura 37°C, velocidad de agitación 820 rpm y membranas de 5 kDa).

Condición de estudio	R ²	n
Celulosa	0.9652	0.5375
Nitrocelulosa	0.9434	0.554
Celulosa regenerada	0.9116	0.4872

Velocidad de agitación

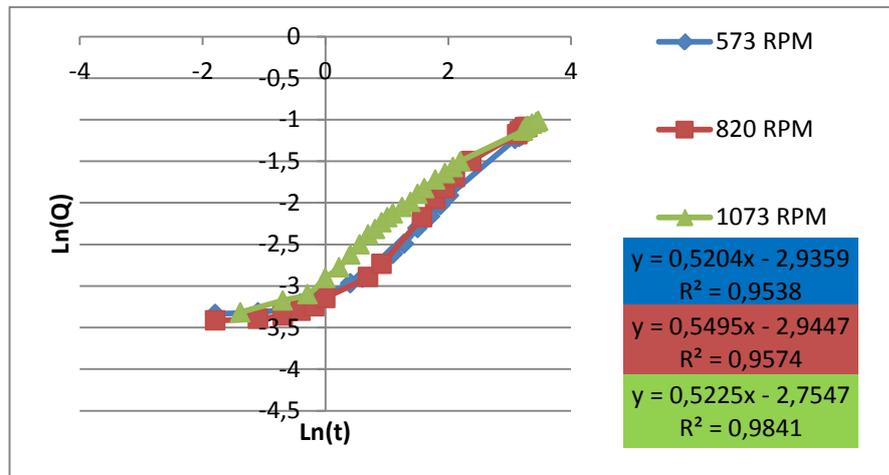


Figura 8. Gráfico logarítmico de la fracción de Azul de Metileno liberado al compartimento 2 en función del tiempo a diferentes velocidades de agitación, Ceteris Paribus (temperatura 37°C y membrana de celulosa regenerada de 5 kDa).

Tabla 7. Datos de correlación de los resultados obtenidos con el modelo de Korsmeyer-Peppas para los sistemas de azul de metileno a diferentes velocidades de agitación, ceteris paribus (temperatura 37°C y membrana de celulosa regenerada de 5 kDa).

Condición de estudio	R^2	n
573 RPM	0.9538	0.5204
820 RPM	0.9574	0.5495
1073 RPM	0.9841	0.5225

Tamaño de poro

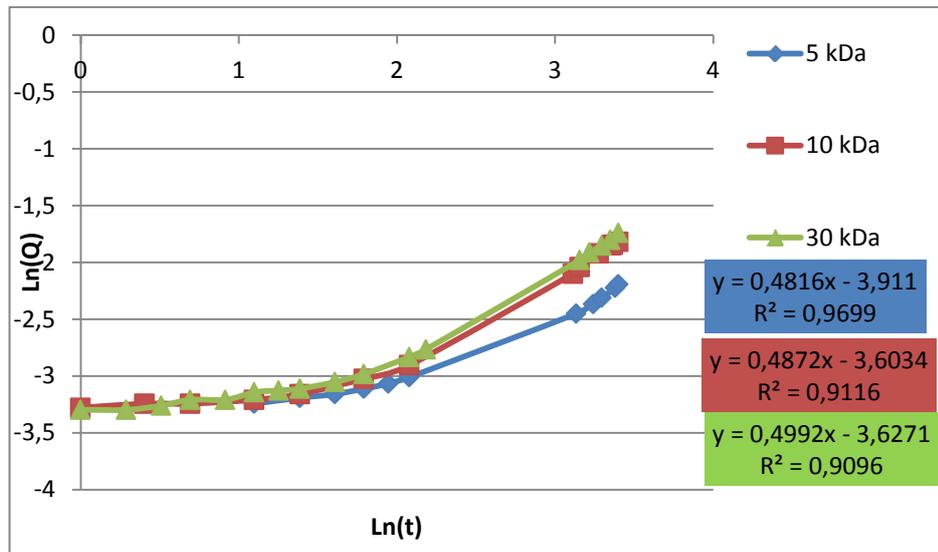


Figura 9. Gráfico logarítmico de la fracción de Azul de Metileno liberado al compartimento 2 en función del tiempo utilizando la membranas de celulosa regenerada con diferentes tamaños de poro, Ceteris Paribus (temperatura 37°C y velocidad de agitación 820 rpm).

Tabla 8. Datos de correlación de los resultados obtenidos con el modelo de Korsmeyer-Peppas para los sistemas de azul de metileno utilizando membranas de celulosa regenerada con diferentes tamaño de poro, ceteris paribus (temperatura 37°C y velocidad de agitación 820 rpm).

Condición de estudio	R ²	n
5 kDa	0.9699	0.4816
10 kDa	0.9116	0.4872
30 kDa	0.9096	0.4992

2.7 Discusión

Fundamentos de la técnica

Para comprender cómo funciona la celda de Franz a nivel macroscópico se precisa describir el proceso en que se ve involucrada cada molécula a nivel microscópico. Dicho proceso comienza en el instante infinitesimal previo a la adición del azul de metileno, donde se tiene un equilibrio químico entre ambos compartimentos. Se pretende a continuación describir los procesos fisicoquímicos involucrados en el sistema de la celda Franz revisando los que ocurren tanto en ambos compartimentos, como en la membrana, en función del tiempo:

Compartimento 1

Justo en el instante de la adición del azul de metileno (t_0) disminuye el potencial químico de las moléculas de agua con las que este interacciona, ya que disminuye la fracción molar del agua en esa zona del Compartimento 1 (Levine, 2004). El que se cree esta disminución localizada de potencial químico media que se dé un proceso irreversible, termodinámicamente hablando, de dilución. Eso a nivel macro, sin embargo, a nivel micro lo que tenemos son moléculas de azul de metileno que se repelen entre ellas y buscan alejarse para interactuar con moléculas de agua, este alejarse sería equivalente, en este contexto, a que se dé un proceso de difusión de las moléculas de azul de metileno dentro del sistema continuo de agua en el compartimento 1.

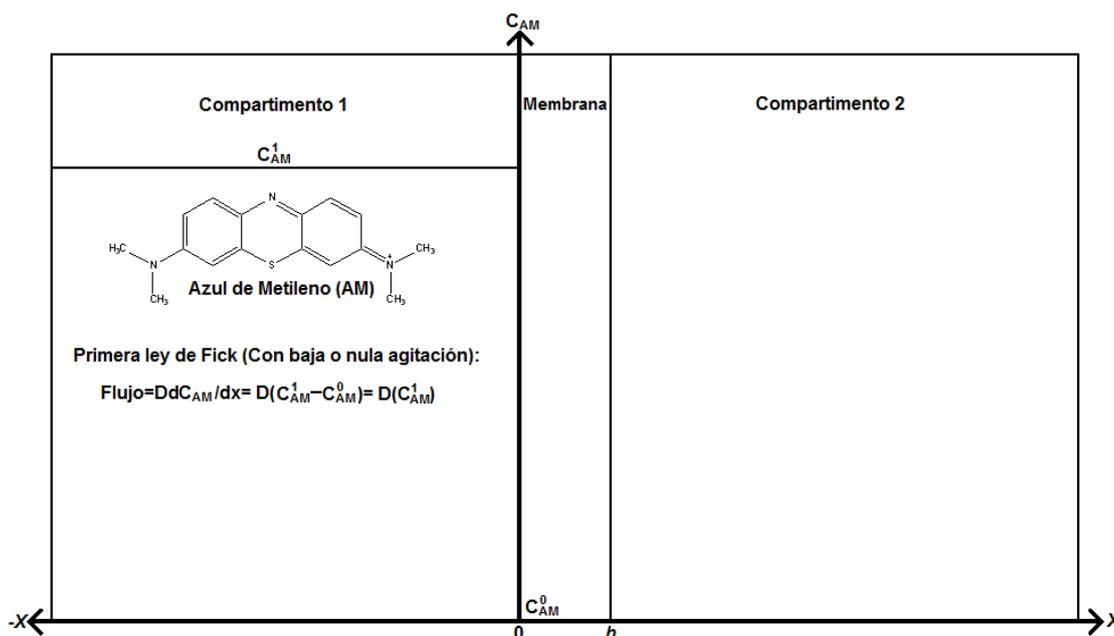
Este proceso de difusión busca dejar al compartimento 1 en un pseudo-equilibrio químico, igualando el potencial químico en cualquier punto de dicho compartimento. El que haya igual potencial químico, a nivel macro, significa que hay igual temperatura y que la fracción molar del azul de metileno en cualquier parte del compartimento 1 es la misma y, a escala micro, significa que la energía cinética de las moléculas maneja un promedio con baja incertidumbre y que las interacciones intermoleculares son significativamente homogéneas. El tiempo que toma desde t_0 hasta que se alcanza este estado de pseudo-equilibrio químico, justo antes de que cualquier molécula de azul de metileno atraviese la membrana, será denominado t_1 para efectos de este texto. Es importante aclarar que t_1 se ve disminuido significativamente debido a la presencia de un sistema de agitación en la celda de Franz, el cual favorece entrópicamente el fenómeno de difusión.

Hasta que se llega a t_1 , el único fenómeno significativo que se presenta en el sistema es la difusión del azul de metileno en el compartimento 1, el cual, pese a que pueda parecer muy corto dada su duración de uno o dos segundos, es un proceso bastante complejo y extenso a nivel micro, donde la escala

temporal suele ser del orden de los microsegundos (10^{-6} s). Una vez en t_1 se tiene un denominado pseudo-equilibrio material, este se ha denominado "pseudo" precisamente porque a partir de t_1 aparecen otros fenómenos que rompen constantemente el equilibrio en mención y obliga al compartimento 1 a encontrar otros múltiples estados equilibrios en función del tiempo. Estos fenómenos vienen asociados a la permeación de la membrana y a la difusión en el compartimento 2 y se describirán más adelante.

Cabe aclarar que el fenómeno de difusión descrito anteriormente, regido como tal por las leyes de Fick (Castellan, 1983), será válido en la medida en que sea pobre la agitación. A nivel operativo casi siempre habrá agitación, sin embargo, dada la naturaleza de este trabajo como caracterización del efecto de las variables de estudio, todos los casos deben ser tomados en cuenta. Gráficamente, en t_1 , el sistema se visualizaría así:

Figura 9. Aproximación gráfica al sistema de la Celda de Franz a t_1 .



Membrana intercompartimental

La membrana intercompartimental es, en principio, una irregularidad en la naturaleza química de las fronteras del compartimento 1. Ya que es el único tramo que es permeable a las moléculas que se encuentran en él. Antes de llegar a t_1 no hay ningún efecto asociado a la presencia de la membrana, ya que la naturaleza significativamente polar del azul de metileno favorece entálpicamente las interacciones intermoleculares con el agua que con la membrana, mucho menos polar que el agua, además que el agua es mucho menos densa y viscosa que la membrana, por lo que la difusividad es mucho mayor en ella que en la membrana (Malstem, 2002).

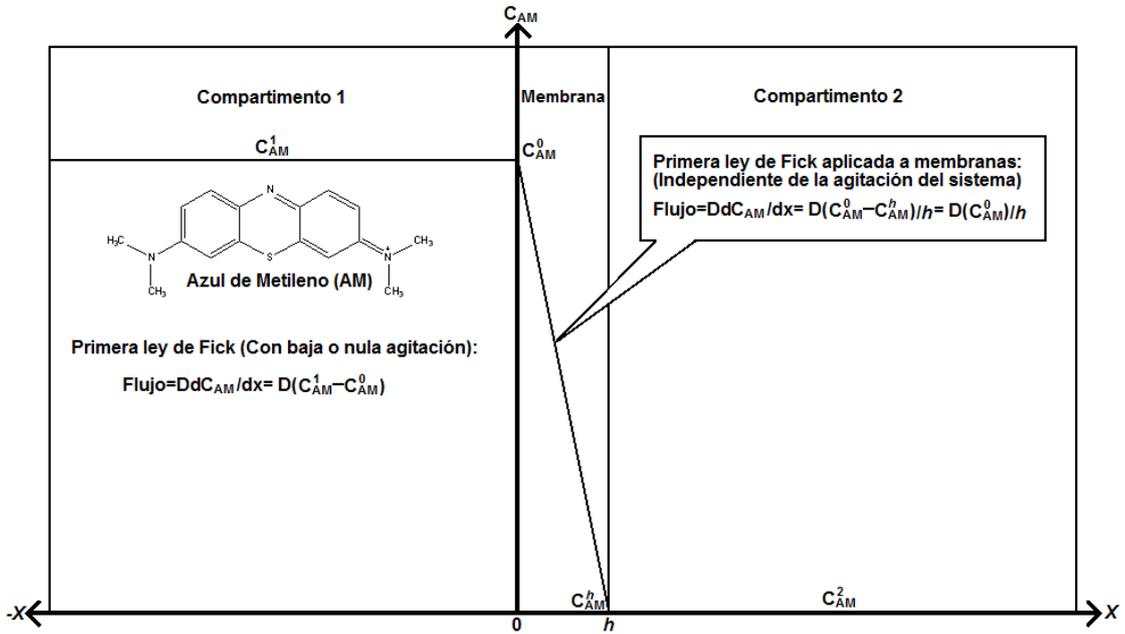
Una vez en t_1 , se encuentran moléculas de azul de metileno a lo largo de toda el área de sección transversal de la membrana, las cuales, al no tener hacia donde más difundir, comienzan a ejercer una presión osmótica sobre la membrana. Esta presión osmótica no se debe sólo al azul de metileno, las leyes de Newton indican que debe haber una contra-fuerza que mantenga el sistema en equilibrio. En este caso, la contra-fuerza la ejercen moléculas de agua del compartimento 2, las cuales debido al gradiente de concentración buscan atravesar rápidamente la membrana.

Casi instantáneamente se pasa del estado de t_1 a un nuevo estado que se denominará t_2 , donde la membrana ha sido atravesada desde ambas caras, por moléculas de azul de metileno desde el compartimento 1 y por moléculas de agua desde el compartimento 2, y es el instante infinitesimal previo a que la primera molécula de azul de metileno llegue al compartimento 2.

Durante el intervalo entre t_1 y t_2 se da el fenómeno de permeación. Donde las moléculas de azul de metileno difunden hacia adentro de la membrana y, para mantener el equilibrio newtoniano, el agua del compartimento 2 lo hace también. Cuando se alcanza t_2 se encuentran moléculas, tanto de agua como de azul de metileno dentro de la membrana. A este punto, viendo la membrana como una fase continua que actúa como interfase entre los compartimentos, se puede decir que existe otro pseudo-estado de equilibrio material.

La permeación puede verse como otro tipo de difusión simplemente si se ve la membrana como otro medio continuo con propiedades reológicas diferentes a las del agua (Rosenbaum, 2011). Sin embargo, siendo que hay tantos fenómenos ocurriendo de manera simultánea, resulta conveniente diferenciarlo de la difusión en el compartimento 1 y en el compartimento 2. A continuación se hace una representación gráfica del sistema a t_2 :

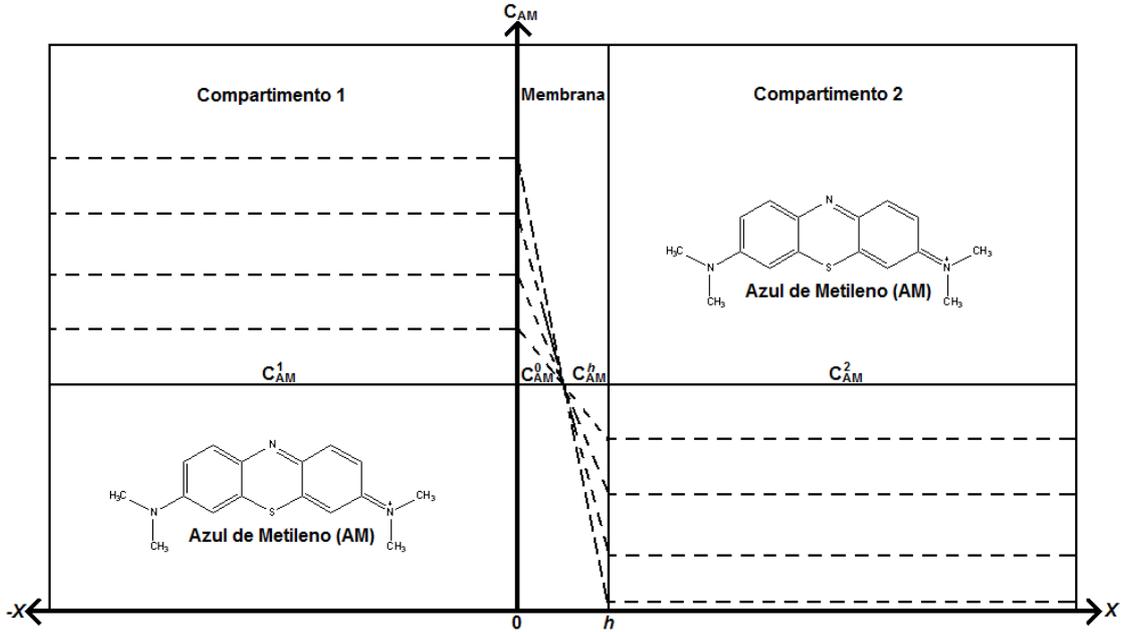
Figura 10. Aproximación gráfica al sistema en t_2 .



Compartimento 2

En el compartimento 2 se encuentra actividad relevante para el comportamiento del sistema sólo hasta t_2 , donde comienza a darse un proceso de difusión (Atkins, 1998) similar al que se da en el compartimento 1. Sin embargo presenta una significativa diferencia, y es que en el compartimento 1 se alcanza un pseudo-estado de equilibrio material antes de que comience la permeación del azul de metileno, mientras que en el compartimento 2 la fracción molar de azul de metileno comenzará a variar constantemente y no se podrá crear ningún equilibrio material. Las moléculas de azul de metileno seguirán migrando del compartimento 1 hacia el 2, alterando los equilibrios materiales de ambos compartimentos hasta que se alcanza el punto de equilibrio t_e , donde finalmente el potencial químico de los compartimentos y la membrana es el mismo y no se dan más procesos termodinámicamente irreversibles. Una representación gráfica de cómo varía el estado del sistema desde t_2 hasta t_e se muestra a continuación, donde hay algunos estados intermedios para ejemplificar (líneas punteadas) y el estado final de equilibrio (línea continua):

Figura 11. Aproximación gráfica del sistema entre t_2 y t_e .



Vale la pena aclarar que, a medida que se alcanza el equilibrio final (de acuerdo con la ecuación 1), el flujo o velocidad de la permeación se hace menor. Esto conlleva a que el grado de interacción de las moléculas de Azul de metileno con la membrana sean más duraderas y, en últimas, a que algunas moléculas queden adsorbidas y absorbidas a la misma. Este fenómeno es de los últimos en darse, y es importante porque es el que acaba completamente los procesos termodinámicamente irreversibles, ya que al mostrar la membrana la misma naturaleza química hacia ambos compartimentos se establece un equilibrio entre las tres fases independientes, algo análogo a la ley cero de la termodinámica, ya que el que la membrana esté en equilibrio con cada compartimento individualmente implica que los compartimentos están en equilibrio entre ellos.

Finalmente, de acuerdo con Liu (2008), es importante aclarar que la velocidad con la que estos procesos, desde t_0 hasta t_e , ocurren es inversamente proporcional a la viscosidad del medio solvente que se utilice, al espesor de la membrana, al grado de estrechez de los poros de la membrana, al tamaño molecular de la molécula permeadora y al tiempo. La magnitud del gradiente de concentración entre compartimentos, la velocidad de agitación, la temperatura, a menos que la molécula permeadora sea termolábil, tendrá un efecto directamente acelerador del proceso. Algunas de estas variables serán discutidas a profundidad más adelante.

Selección de variables de estudio

Siendo que se pretende estandarizar las condiciones de trabajo de la técnica, simulando condiciones fisiológicas, existen variables que resultan más pertinentes que otras para analizar, en especial porque los ensayos con la metodología suelen durar más de 24 horas, así que cada variable extra representa múltiples ensayos, o lo que es lo mismo, disponer de mucho tiempo.

Las variables que se escogieron para analizar fueron la temperatura del ensayo, el material de membrana, el tamaño de poro y la velocidad de agitación. Dichas variables se escogieron debido a que eran fáciles de controlar y monitorear, a que son muy tendientes a variar entre ensayos y a que, de acuerdo con Shioh-Fern (2010), estas tienen un efecto significativo en los resultados arrojados por la metodología.

Algunas variables como la concentración inicial de azul de metileno o la viscosidad o la fuerza iónica del medio solvente fueron dejadas de lado, la primera porque el efecto era demasiado predecible como para justificar la inversión de tiempo y recursos, la segunda porque la técnica se pretende utilizar emulando condiciones fisiológicas y dichas variables no suelen variar mucho en etapas de absorción de fármacos.

Efecto de la temperatura

La temperatura viene asociada al nivel energético en el que se encuentran las moléculas, a mayor temperatura, mayor será su estado de excitación y su nivel de vibración, rotación y traslación. De lo anterior se llega a que un aumento de temperatura favorece entrópicamente el proceso de permeación y debería verse reflejado en un aumento de la velocidad de permeación del azul de metileno.

Los resultados obtenidos gráficamente a 25°C, 31°C, 34°C y 37°C muestran correlación visual con lo planteado por la teoría, sin embargo, con fines de realizar un análisis más profundo, se utiliza el área bajo la curva (AUC) de cada gráfico para estimar una relación cuantitativa del efecto que tiene como tal la variación de la temperatura. Los datos de AUC aumentan directamente con la temperatura, sin embargo, el comportamiento de los datos (Tabla 1) evidencian que este aumento no es lineal. Se observa entonces que un aumento de 3°C, desde 34°C hasta 37°C, causa un aumento de más del 30% en AUC, mientras que un aumento de 6°C, el doble de magnitud, desde 25°C a 31°C, causa apenas un aumento aproximado del 1%. Pese a que se carecen de réplicas que corroboren la validez estadística de estos datos, los datos están de acuerdo la teoría cinética, donde el efecto de la temperatura sobre la constante cinética de un proceso no se lineal sino exponencial.

De acuerdo a lo obtenido, la temperatura es una variable crítica para el sistema, dado que en el rango de temperaturas que se maneja para hacer estudios a condiciones fisiológicas (36.5°C-37.5°C) las variaciones entrópicas asociadas a cambios de temperatura son muy marcadas, obteniendo perfiles de liberación muy diferentes. Esta variable deberá siempre ser monitoreada rigurosamente durante los ensayos.

Efecto de la naturaleza química de la membrana

El efecto de la naturaleza química de la membrana dependerá de la molécula con la que se esté trabajando, de tal manera que este efecto puede ser tanto de aceleración como de ralentización. Los factores determinantes en el efecto de la naturaleza química de la membrana son las interacciones intermoleculares entre la molécula que va a permear la membrana con la membrana y las interacciones intermoleculares entre la molécula que va a permear con las especies químicas presentes en el medio continuo de los compartimentos, en especial en el compartimento 1.

La ralentización podría darse porque la molécula fuera muy afín al medio continuo, muy poco afín con la membrana o incluso muy afín con la membrana, al punto que se une fuertemente a ella, mientras que la aceleración se va a dar en la medida que se determinen las condiciones ideales de interacción, de tal forma que la molécula no sea repelida por la membrana ni tampoco se quede unida a ella.

Los resultados obtenidos arrojan que el azul de metileno es más afín por la membrana de celulosa que por las otras membranas. Las razones para justificar a detalle esto requieren de estudios que trascienden el alcance de este proyecto, tales como analizar la morfología de las membranas y su distribución de tamaños de poro. Sin embargo, basándose en la estructura molecular y la construcción del material es posible dar una explicación coherente a los resultados.

La nitrocelulosa es una molécula relativamente más polar que la celulosa, debido a que tiene el ion nitrato incorporado a su estructura. Dado que el azul de metileno se ioniza parcialmente en solución, es bastante probable que existan repulsiones asociadas a las cargas iónicas. La celulosa regenerada es una versión sintética de la celulosa, la cual, por su mecanismo de fabricación, está estructurada por microfibras entrelazadas (MacLeod et al, 2001). Las membranas de estos materiales, dado que tienen gran variación entre sus tamaños intersticiales, suelen retener mucho los materiales que intentan permearlas.

De los resultados, estimados mediante el AUC (Tabla 2), se evidencia que el tipo de membrana es una variable crítica que causa una marcada variación en el perfil de permeabilidad obtenido. De lo anterior se concluye que debe vigilarse recelosamente que, cuando se hagan ensayos en secuencia que vayan a ser comparados como equivalentes u homólogos, todos los ensayos se realicen con el mismo tipo de membrana.

Efecto de la velocidad de agitación

La agitación, al igual que el calentamiento, es un aporte entrópico al sistema que favorece a que los procesos cinéticos en general se den más rápido. La agitación, como tal, no influye en la permeabilidad de la membrana, sino en la velocidad de difusión de las moléculas de azul de metileno dentro de los compartimentos, por lo que la agitación sí influye en la velocidad con la que se alcanzan los pseudo-equilibrios materiales en ambos compartimentos y en la velocidad de permeación de las moléculas, puesto que las moléculas permearán más rápido en la medida en que estos pseudo-equilibrios se alcancen.

El efecto concreto de un aumento en la velocidad de agitación sería entonces, para el compartimento 1, que las moléculas de azul de metileno lleguen más rápido a la interfase con la membrana, mediando que siempre hayan moléculas listas para permear y, en el compartimento 2, que las moléculas que permear se difundan más rápidamente por todo el compartimento, despejando la interfase con la membrana para que otras moléculas de azul de metileno permeen.

De lo anterior se infiere que el efecto de la agitación impacta en la velocidad con la que se alcanzan gradientes de concentración y potencial químico más grandes entre los compartimentos ya que, por ejemplo, durante el tiempo que le toma a las moléculas de azul de metileno que acaban de permear, difundir por el compartimento 2 hay una mayor concentración del mismo en el área aledaña a membrana, por lo cual el gradiente de concentración y potencial químico entre compartimentos se ve aparentemente disminuido, afectando directamente la cinética del proceso. También se infiere que la agitación no afectará la permeabilidad de la membrana, debido a que esta está directamente asociada al espesor, porosidad, naturaleza química, entre otros.

Es importante también aclarar que el efecto de la velocidad de agitación no es proporcional o lineal sino, más bien, logarítmico, ya que a medida que aumenta la misma, más se puede aproximar el sistema a un estado “difusión inmediata”, donde se despreja este tiempo de difusión compartimental. De lo anterior se sigue que el efecto de la velocidad de agitación es muy marcado partiendo de valores bajos, en especial comparando el sistema en agitación con uno sin

agitación, sin embargo, a medida que aumenta la velocidad de agitación, el efecto de dicho aumento se reduce hasta el punto en que se genera un comportamiento de meseta, donde por más que se aumente la velocidad no se verá un efecto significativo entre perfiles.

Los resultados obtenidos evidencian a la perfección el comportamiento descrito anteriormente. A nivel gráfico (figura 4) se observa claramente cómo la liberación es más rápida y eficiente a medida que aumenta la velocidad de agitación. Así pues, se alcanzarán las mismas concentraciones de equilibrio pero el perfil de liberación será diferente en cuanto a velocidad inicial de liberación. Lo anterior también se sustenta en los valores de AUC obtenidos (Tabla 3), donde se ve claramente que, a 26 horas de corridos todos los experimentos, los perfiles con mayor velocidad de agitación poseen un AUC de mayor magnitud. También se observa cómo una variación inicial entre valores pequeños de velocidad de agitación causa un efecto de mucha mayor magnitud que la variación entre velocidades de agitación mayores, donde los perfiles se comportan prácticamente igual.

Se concluye entonces que la velocidad de agitación es una variable crítica a ser controlada por lo tanto, cuando se estén tomando múltiples perfiles seguidos, debe tomarse la precaución de que no haya variaciones significativas en esta variable, en especial con los valores bajos e intermedios.

Efecto del tamaño de poro

El efecto del tamaño de poro, al igual que el de la naturaleza química de la membrana, dependerá de la molécula con la que se esté tratando. En términos generales interesa que la molécula sea más pequeña que, por lo menos, el promedio de los poros. Si bien es claro que las membranas manejan una distribución de tamaños, entre mayor rango de esa distribución sea de menor tamaño que la molécula a permear, más benéfico será esto para la permeación de dicha molécula.

Es importante también la constitución de la membrana, si es monolítica o es una serie de microfibras superpuestas y/o entrelazadas, ya que todo esto influirá en qué tan grande es el rango de distribución de tamaños de poro y qué tanta dispersión tienen los mismos. Se deja en claro que, justo como se explico anteriormente, la naturaleza química de la membrana influye demasiado en el efecto del tamaño de poro, debido a que condiciona en qué medida la molécula que permea puede adsorberse o ser retenido al interior de la membrana.

El tamaño de poro tampoco tiene un efecto proporcional o lineal, su efecto se comporta, más bien, discretamente en función de los radios moleculares que presente el poro (O'Brien et al, 2007). En general cuando el tamaño de poro

promedio es menor a un radio molecular, la molécula difícilmente atravesará. Si los poros tienen un diámetro entre un radio molecular y menos de dos, es equivalente que solo tuviera uno, puesto que no sería posible que dos moléculas ingresaran al tiempo, por lo que se habla de una escala discreta en términos de radio molecular de la molécula que va a permear. Entre más radios moleculares contenga el tamaño de poro, más moléculas podrán atravesarlo simultáneamente y más rápido será el proceso de permeación.

Debe finalmente dejarse en claro que todo lo mencionado anteriormente está supeditado a cada caso particular, porque el radio molecular muchas veces deberá incluir el radio de distancia de repulsión entre moléculas o incluso entre la molécula y la membrana, radios que a su vez dependen de todas las condiciones de entorno, entálpica y entrópicamente. Siempre deberá considerarse, tanto la naturaleza química de la membrana y la molécula que va a permear, como la interacción entre las mismas.

Teniendo en cuenta lo anterior, se puede observar que los resultados manejan gran congruencia con la teoría, se observa (Tabla 4) que a partir de un primer aumento del tamaño de poro se genera un aumento significativo del AUC, sin embargo, otro aumento de gran magnitud no aumenta significativamente la misma, sugiriendo que no ha alcanzado el siguiente nivel discreto requerido para aumentar significativamente la afluencia de moléculas.

Si bien puede parecer incongruente que un aumento de 3 veces mayor magnitud que otro no cause un aumento en el nivel discreto de radios moleculares, esto recobra sentido si se tiene en cuenta que el azul de metileno tiende a asumir cargas iónicas en solución acuosa, y que las fuerzas de repulsión de cargas son muy intensas, teniendo radios de repulsión de gran magnitud.

Se concluye que el tamaño de poro es otra variable crítica a tener en cuenta, siempre debe asegurarse que todos los perfiles de permeabilidad que vayan a ser comparados como homólogos o réplicas se realicen con membranas del mismo material y tamaño de poro.

Correlación de los datos con el modelo de Korsmeyer-Peppas

Durante todo el análisis realizado hasta el momento, se ha tomado como postulado que el sistema obedece las leyes de Fick (Castellan, 1983). Sin embargo, pueden ocurrir múltiples fenómenos asociados a la afinidad de la molécula que permea con la membrana, en especial cuando es una membrana diferenciada, de línea celular Caco-2 por ejemplo, o con otras especies químicas dentro de los compartimentos. Incluso, cuando a futuro se vaya a realizar el ensayo con matrices inicialmente sólidas, los posibles mecanismos

de disolución de dicha matriz son muchos y pueden involucrar también cierto grado de afinidad entre especies químicas que haga que el sistema no siga estrictamente las leyes de Fick.

Todos estos posibles fenómenos se agrupan en un solo concepto, que es el de efecto matriz. Siendo que el objetivo de este proyecto es, primariamente, evaluar la viabilidad de aplicación que tiene esta técnica para caracterizar matrices poliméricas como excipientes farmacéuticos bioprotectores a condiciones que simulen las fisiológicas, resulta entonces necesario que la técnica sea capaz de identificar si dichos polímeros o la membrana utilizada generan un efecto de matriz en la liberación o en la permeabilidad del fármaco.

Un modelo sencillo que permite evidenciar la presencia de un efecto matriz en el sistema es el modelo de Korsmeyer-Peppas, el cual deriva de la teoría de Higuchi sobre liberación modificada de fármacos, pero que asume la posibilidad de que el sistema no siga todos los postulados de Higuchi, donde el principal de todos es que el sistema sigue las leyes de Fick.

Tras expresar los resultados de los perfiles de permeabilidad en términos de la fracción de soluto liberada al tiempo t (Q), de manera logarítmica, se obtienen los gráficos 6-9, en los cuales basta aplicar una regresión lineal para obtener una ecuación que es homóloga a la ecuación logarítmica de Korsmeyer-Peppas (Ec. 11), cuya pendiente será igual al exponente n . De acuerdo con la relación de difusión de Einstein-Smoluchowski (Ec. 6), para todo sistema que siga las leyes de Fick, dicho exponente debe ser 0.5, de lo contrario hay presencia de un efecto matriz en el sistema.

Para el caso de estos ensayos no debería presentarse ningún efecto matriz, ya que el azul de metileno se está adicionando ya disuelto en una sola adición, además que la membrana utilizada no es de ningún tipo especial diferenciado. Es de acuerdo a lo anterior que obtener unos valores de n cercanos a 0.5 con un coeficiente correlación lineal mayor a 0.9, sugeriría que el sistema está correlacionado con la teoría y que la técnica sería capaz a futuro de evidenciar con sus resultados la presencia de un efecto matriz.

La aplicación del anterior razonamiento matemático a todos los perfiles de permeabilidad arroja los valores reportados en las tablas 5-8, donde se observa que todos los n tienden a 0.5 con un coeficiente de correlación superior a 0.9. Lo cual significa que el sistema, que por definición no debería presentar efectos de matriz, es congruente con la teoría.

Validez de resultados

Los resultados obtenidos cumplen a cabalidad con una función preliminar de caracterización de la técnica. Sin embargo, debe dejarse claro que estos resultados carecen de una validez estadística, al no haber tenido réplicas.

La ausencia de réplicas es justificable debido a lo dispendioso que resultaría tomar todos estos datos en una fase preliminar de la caracterización de la metodología, principalmente por el tiempo que requeriría en relación a la disponibilidad de espacios y equipos. Pese a lo anterior, el que los resultados estén alineados con la teoría, da un aval para realizar futuros estudios que cuantifiquen la precisión y la exactitud de la técnica, los parámetros de validación, la incertidumbre y los factores de error más importantes en los resultados.

2.8 Impacto ambiental

El desarrollo de nuevos materiales biocompatibles y biodegradables, tales como los materiales poliméricos que se llegarían a desarrollar con la técnica estandarizada en este proyecto, conllevan a que los procesos industriales sean más limpios y tolerados por el medio ambiente, ya que este tipos de materiales permiten la utilización completa de sistemas acuosos, evitando que los procesos se utilicen solventes orgánicos. También, al ser biodegradables representan menor riesgo de ser desechos contaminantes.

2.9 Conclusiones

- ✓ Se obtuvieron los parámetros de validación linealidad, repetibilidad y precisión intermedia de la metodología de cuantificación de Azul de metileno mediante espectrofotometría UV-VIS
- ✓ Se determinó que el efecto de las variables temperatura, tipo de membrana, velocidad de agitación y tamaño de poro en los perfiles de permeabilidad del azul de metileno como molécula modelo, utilizando celdas de Franz, es crítico y son variables que deberán ser controladas y monitoreadas durante cualquier futuro estudio con la técnica en mención.
- ✓ Se encontró alta correlación de los resultados con el modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas, lo que evidencia la capacidad de la técnica para detectar la presencia de un efecto matriz en el sistema.
- ✓ Se dilucidó que los resultados obtenidos carecían de validez estadística debido a la ausencia de réplicas de cada perfil, pero que los mismos sí eran válidos como una caracterización inicial de la técnica para ver su grado de congruencia con la teoría, en cuanto a lo cual se obtuvieron resultados muy satisfactorios.

2.10 Recomendaciones

Pese a los resultados arrojados por este estudio, se recomienda que a futuro se realicen estudios con réplicas que puedan proveer una validez estadística rigurosa a la utilización de la técnica. De tal manera que pueda obtenerse un protocolo validado para la utilización de la misma.

También se recomienda cuantificar estadísticamente el tiempo al que la evaporación del solvente asociada a la toma de la alícuota tiene un efecto significativo en la concentración de la molécula en ambos compartimentos, ya que entre más tiempo sea requerido por el ensayo, este efecto será más marcado. Sería conveniente que se lograra obtener un factor de corrección para este error.

Finalmente, se recomienda considerar otras variables que, al emular sistemas fisiológicos, son de gran relevancia como el pH, la fuerza iónica y el espesor de la membrana.

3. Referencias:

- Ackerman, S., & Gonzales, R. (2012, agosto). The Context of Antibiotic Overuse. *Annals of Internal Medicine*. pp. 211-212.
- Arenas, T., Mora, C., Salamanca, C., & Jaramillo, M. (Enero-marzo 2012). Actividad del (2E)-3-(2, 3-dimetoxifenil)-1-(4-metilfenil) prop-2-en-1-ona en presencia del poli(ácido maleico-co-2-vinil-pirrolidona) sobre un aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* productor de β -lactamasas. *IATREIA* Vol 25(1).
- Atkins, P. (1998). Ecuación de difusión. En Atkins, P. (6 Ed.): *Química Física*. (pp. 752-755). Barcelona: Ediciones Omega.
- Avdeef, A. (2003). Permeability-Solubility-Charge State and the pH Partition Hypothesis. En Avdeef, A. (1 Ed): *Absorption and Drug Development*. (pp. 7-11). Hoboken, New Jersey.
- Bonferoni, M. C. and Rossi, S. and Ferrari, F. and Caramella, C. A Modified Franz Diffusion Cell for Simultaneous Assessment of Drug Release and Washability of Mucoadhesive Gels. *Journal of Pharmaceutical Development and Technology*, Volume 4, pages 45-53, 1999.
- Castellan, G. (1983). Diffusion and Fick's Laws. En Castellan, G. (3 Ed): *Physical Chemistry*. (pp. 919-925). Massachusetts: Addison-Wesley.
- Higuchi, T. (1963), Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J. Pharm. Sci.*, 52: 1145–1149.
- Klimundová, J. Šatinský, H. Sklenářová, P. Solich, D. Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell, *Talanta*, Volume 69, Issue 3, 15 May 2006, Pages 730-735
- Korsmeyer RW, Peppas NA, "Controlled Release Delivery Systems" (editors). T. J. Roseman y S.Z. Mansdorf, Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1983).

- Kumar, P. Sanghvi, P. Collins, P. Charles C. Comparison of Diffusion Studies of Hydrocortisone Between the Franz Cell and the Enhancer Cell. *Journal of Drug Development and Industrial Pharmacy*. P 1573-1585, Vol 19, 1993.
- Levine, I. (2004). Cinética. En Levine, I. (5 Ed.): *Fisicoquímica Volumen 2*. (pp. 609-610). Madrid: MCGRAW-HILL.
- Liu, R. (2008). Drug absorption models. En Liu, R. (2 Ed.): *Water insoluble drug formulation*. (pp. 315-316). Florida: Taylor & Francis Group.
- MacLeod, A. Daly, C. Khan, I. Vale, L. Campbell, M. Wallace, S. Cody, J. Donaldson, C. Grant, A. (2001). Comparison of cellulose, modified cellulose and synthetic membranes. *Medicine and Therapeutics, University of Aberdeen, Polwarth Building, Foresterhill, Aberdeen, Scotland, UK, AB25 2ZD. Cochrane Database Syst Rev*. 2001;(3):CD003234.
- Malmsten, M. (2002). Absorption Mechanisms. En Malmsten, M: *Surfactants and polymers in drug delivery*. (pp. 33-41). New York: Marcel Dekker.
- O'Brien, F. Harley, B. Waller, M. Yannas, I. Gibson, L. Prendergast, P. (2007). The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering. Department of Anatomy, Royal College of Surgeons in Ireland, St Stephen's Green, Dublin, Ireland. *Technol Health Care*. 2007;15(1):3-17.
- Redalyc: Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (2011). Resúmenes Congreso nacional "Panorama nacional de la resistencia bacteriana como elemento fundamental para la seguridad del paciente". *Entramado*, vol. 7, núm. 2, Julio-Diciembre 2011, pp. 198-214, Universidad Libre, Colombia.
- Rosenbaum, S. (2011). Passive Diffusion. En Rosenbaum, S: *Pharmacokinetics & Pharmacodynamic*. (pp. 22-27). New Jersey: John Wiley & Sons.
- Shioh-Fern Ng, Jennifer J. Rouse, Francis D. Sanderson, Victor Meidan, Gillian M. (2010). Validation of a static Franz diffusion cell system for *in*

vitro permeation studies. AAPS PharmSciTech.2010;11:1432–1441. doi: 10.1208/s12249-010-9522-9.

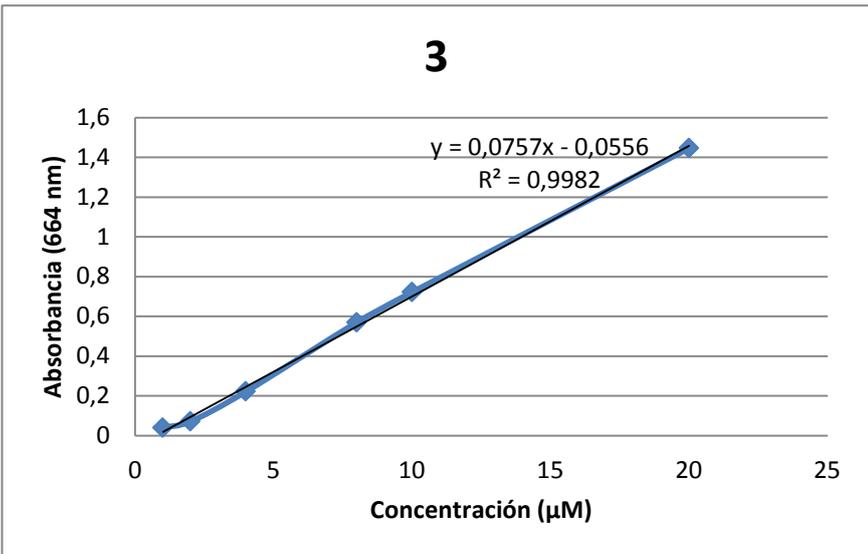
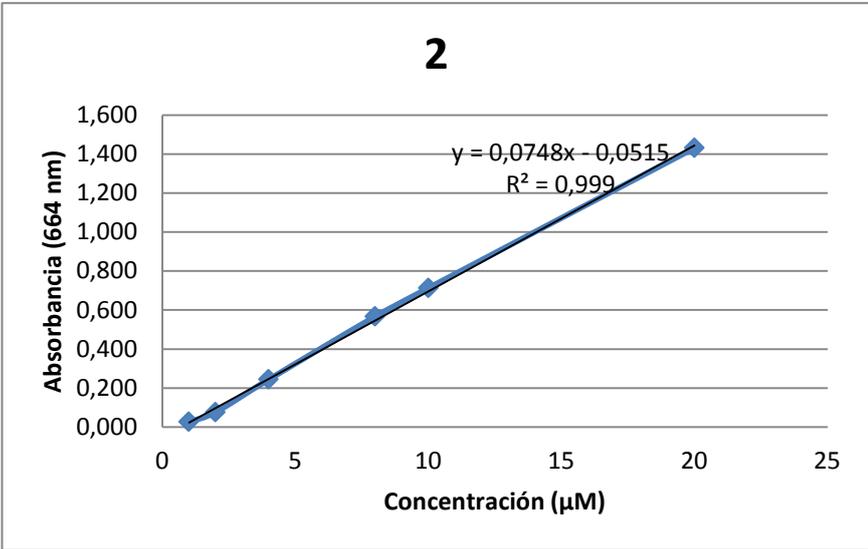
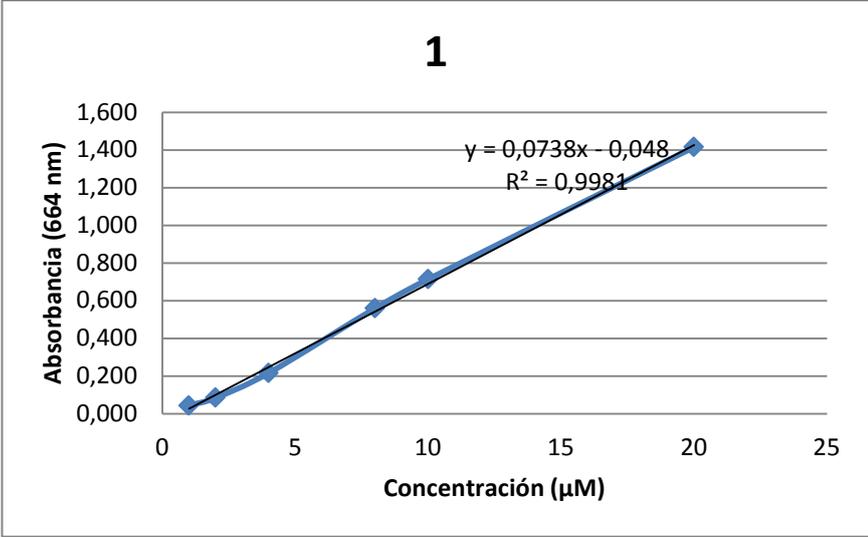
- Singh, A., Garg, G., & Sharma, P. K. (2010). NANOSPHERES: A NOVEL APPROACH FOR TARGETED DRUG DELIVERY SYSTEM. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review & Research*, 5, (3), pp. 84-88.
- Torchilin, V. (2006). Polymeric Nanoparticles for Delivery in the Gastro Intestinal Tract. En Torchilin, V: Nanoparticulates as drug carriers. (pp. 609-648). London: Imperial College Press. Sistema gastrointestinal.
- Zauba Imports and Shipments Ltda. (2013). Zauba.com. Recuperado el día 08 de octubre de 2013 desde: <http://www.zauba.com/import-EUDRAGIT+L+100-hs-code.html>

Anexo 1. Obtención de los parámetros de validación linealidad, repetibilidad y precisión intermedia para la metodología de cuantificación de Azul de Metileno mediante espectrofotometría UV-VIS.

Linealidad:

muestra	concentracion M, *10-6	absorbancia	MEDIA	SD	%DSR
A1	1	0,043	0,036	0,009	24,974
A2		0,026			
A3		0,040			
B1	2	0,084	0,077	0,006	7,901
B2		0,076			
B3		0,072			
C1	4	0,216	0,227	0,015	6,485
C2		0,244			
C3		0,222			
D1	8	0,559	0,565	0,006	1,006
D2		0,567			
D3		0,570			
E1	10	0,714	0,716	0,005	0,689
E2		0,713			
E3		0,722			
F1	20	1,415	1,431	0,016	1,084
F2		1,431			
F3		1,446			

CONCENTRACION (M)	ABSORBANCIA			PROMEDIO	SD	S2
CONCENTRACION (μM)	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3			
1	0,043	0,026	0,04	0,036	0,00907377	8,23333E-05
2	0,084	0,076	0,072	0,077	0,0061101	3,73333E-05
4	0,216	0,244	0,222	0,227	0,01474223	0,000217333
8	0,559	0,567	0,570	0,565	0,00568624	3,23333E-05
10	0,714	0,713	0,722	0,716	0,00493288	2,43333E-05
20	1,415	1,431	1,446	1,431	0,01550269	0,000240333
PENDIENTE	0,073	0,074	0,075	0,074	0,001	t-STUDENT INTERCEPTO
INTERCEPTO	0,048	0,051	0,055	0,051	0,00351188	25,31744405



ANÁLISIS
DE
VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	219,9404	3	73,3134	5,8265	0,0049	3,0983
Dentro de los grupos	251,6552	20	12,5827			
Total	471,5957	23				

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
CONCENTRACION (M)	6	45	7,5	49,5
CURVA 1	6	3,031	0,50516667	0,26978057
CURVA 2	6	3,057	0,5095	0,2772131
CURVA 3	6	3,072	0,512	0,2840608

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	Total
<i>1</i>				
Cuenta	6	6	6	18
Suma	3,031	3,057	3,072	9,16
Promedio	0,50516667	0,5095	0,512	0,50888889
Varianza	0,26978057	0,2772131	0,2840608	0,24443622
<i>Total</i>				
Cuenta	6	6	6	
Suma	3,031	3,057	3,072	
Promedio	0,50516667	0,5095	0,512	
Varianza	0,26978057	0,2772131	0,2840608	

ANÁLISIS DE
VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
					0,99974	3,68232034
Muestra	0	0	65535	65535	113	4
	0,00014344			0,0002	0,99974	3,68232034
Columnas	4	2	7,17222E-05	5891	113	4
					0,99974	3,68232034
Interacción Dentro del grupo	0	0	65535	65535	113	4
	4,15527233					
	3	15	0,277018156			
	4,15541577					
Total	8	17				

Anexo 2. Método de los trapecios y muestra de cálculo de Área Bajo la Curva (AUC)

El método de los trapecios es una aproximación del área de bajo una curva utilizando una sumatoria de las áreas de los trapecios que se forman entre la recta y un eje de referencia. Para el caso concreto de los perfiles de permeabilidad tomados en este trabajo, donde los intervalos de tiempo eran homogéneos, esto sería:

$$AUC_t = \int_0^t C(t)dt \approx \sum_{i=0}^{t-1} \frac{\Delta t}{2} [C(t_i) + C(t_{i+1})] \quad (1)$$

Se tomará como ejemplo de cálculo el perfil de permeabilidad estándar de este trabajo, cuyas condiciones son temperatura 37°C, velocidad de agitación de 820 rpm y membrana de celulosa regenerada con poro de 5 kDa. Los datos de concentración contra tiempo para este caso son:

Tiempo (h)	Concentración en compartimento 2 (µM)
0,0167	0,6712
0,1667	0,6849
0,3333	0,7260
0,5	0,6575
0,6667	0,8630
0,8333	0,8904
1	0,9452
1,3333	0,6575
1,4	1,1370
1,6667	1,1644
2	1,2603
3	1,8082
4	2,0411
5	2,4384
6	2,7808
7	3,0959
22,25	6,4384
23	6,6438
24,5	6,7945
26,4167	6,9589
28	7,0548
29	7,1233
30	7,1781

A partir de los primeros dos datos de tiempo en horas y los dos primeros datos de concentración en el compartimento 2, se puede utilizar la ecuación (1) para calcular el área de ese primer trapecio, esto es:

$$\text{Área}_{\text{Trapezio } 1} = \frac{C(0.017 \text{ h}) + C(0.17 \text{ h})}{2} * (0.17 \text{ h} - 0.017 \text{ h})$$

$$\text{Área}_{\text{Trapezio } 1} = \frac{0,6712 + 0.6849}{2} * (0.17 \text{ h} - 0.017 \text{ h}) = 0.1017 \mu\text{M} * h$$

Así mismo pueden calcularse las áreas de los otros trapecios, obteniendo al final los siguientes datos:

Número de Trapecio	Área de trapecio
1	0,1017
2	0,1176
3	0,1153
4	0,1267
5	0,1461
6	0,1530
7	0,2671
8	0,0598
9	0,3068
10	0,4041
11	2,3014
12	0,9623
13	2,2397
14	2,6096
15	2,9384
16	72,6986
17	4,9058
18	10,0788
19	13,1804
20	11,0942
21	7,0890
22	7,1507

Finalmente, de acuerdo con la ecuación (1):

$$AUC = \sum \text{Áreas de trapecios} = 139.0471 \mu\text{M} * h$$

Esta misma metodología se siguió para el cálculo de todas las AUC dentro del trabajo.