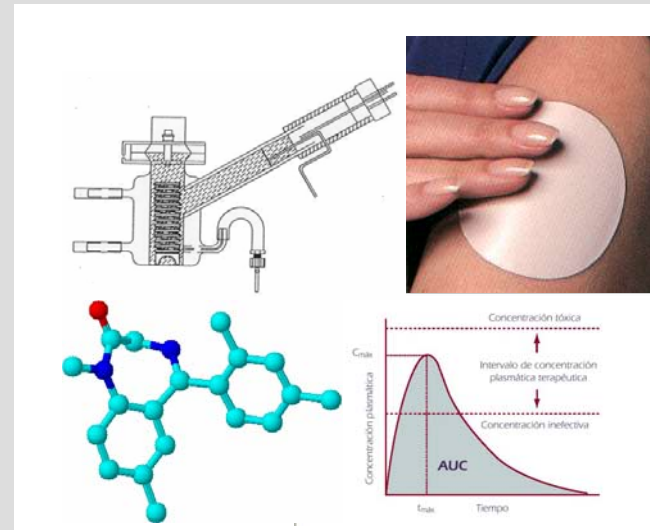




PERMEACIÓ TRANSDÈRMICA D'UNA SÈRIE DE BENZODIAZEPINES



Màrius Duran i Hortolà



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



6. DISCUSSIÓ

La discussió del present treball es desenvolupa en el mateix ordre en què s'han exposat els resultats obtinguts. D'acord amb aquest procediment, la discussió es desglossa comentant els punts indicats en l'índex del treball.

En el present treball s'ha realitzat un estudi comparatiu de les característiques de penetració a través de la pell humana d'una sèrie de benzodiazepines. També es proposa el sistema d'activitat superficial de les monocapes com una metòdica alternativa per a un "screening" ràpid dels promotors més adequats per a potenciar la penetració de fàrmacs a través de la pell. Per últim s'han intentat trobar correlacions entre els principals paràmetres de permeació transdèrmica i paràmetres moleculars.

6.1 VALIDACIÓ DE LES MÈTODIQUES ANALÍTIQUES I LA METODOLOGIA DE MOSTRATGE.

Les metòdiques analítiques per a la quantificació de les benzodiazepines a les mostres de treball, d'acord amb els resultats experimentals obtinguts dels paràmetres representatius de les validacions de les metòdiques, permeten considerar com a acceptable el sistema analític emprat per a obtenir informació realista de les experiències realitzades en la present memòria.

Les metòdiques analítiques han resultat ser selectives per a les benzodiazepines, no detectant-se en els cromatogrames pics que interfereixin la quantificació dels fàrmacs en els seus respectius temps de retenció.

D'acord amb el que ha estat exposat en el capítol de Material i mètodes, per a quantificar les quantitats de fàrmac permeades en els temps de mostra, cal confeccionar la recta de calibratge a fi i efecte d'interpol·lar, en tots els casos, la resposta analítica dins el marge de concentracions lineal.

Considerant de forma global els valors obtinguts pel coeficient de variació percentual (%CV) i l'error relatiu percentual (%E_r) tal com s'exposa en la Taula resum 6.1, es pot afirmar que les metòdiques han estat exactes i precises, amb coeficients de variació compresos entre 1.4 % i 13.2 % i errors relatius compresos entre -14.0 i 14.38 %. El fàrmac amb menor precisió i també exactitud ha estat el Clonazepam, mentre la que tècnica més precisa ha estat la del Pinazepam, amb coeficient de variació màxim de 5.8%. L'exactitud de la mesura de les diferents benzodiazepines estudiades, excloent el Clonazepam, ha estat entre -8.90 i 5.49%.

Taula resum 6.1 : Resum dels valors exposats en l'apartat de RESULTATS corresponents a cada una de les benzodiazepines estudiades

Fàrmac	CV % (Precisió)	E _r % (Exactitud)	Linealitat (p)	Límit de quantificació (mín – màx.)
Alprazolam	3.1 – 10.1	-6,14 ; 4.99	0.1161	0.010 – 0.020
Clobazam	2.2. – 9.2	-3.70 ; 4.06	0.2683	0.013 – 0.043
Clonazepam	7.4 – 13.2	-14.00 ; 14.38	0.149 (NP)	0.010 – 0.013
Diazepam	1.4 – 10.0	-5.15 ; 3.80	0.1182	0.011 – 0.026
Lorazepam	4.4 – 8.9	-3.30 ; 3.98	0.3451	0.013 – 0.022
Midazolam	1.7 – 10.5	-8.90 ; 5.49	0.2398 (NP)	0.016 – 0.034
Pinazepam	1.4 – 5.8	-5.29 ; 2.60	0.5907 (NP)	0.012 – 0.044

NP: No paramètric.

Donat el gran àmbit de concentracions en què van ser dissenyades les rectes de calibratge (entre 30 i 10000 $\eta\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), les variàncies de les respostes analítiques normalitzades van resultar homogènies per a la majoria de benzodiazepines exceptuant el Clonazepam, Midazolam i Pinazepam. Per aquest motiu el factor de ponderació utilitzat ($1/C^2$) pot considerar-se suficientment representatiu de l'invers de la variància, com es suggereix per a compensar aquestes diferències (Wagner, 1983).

Pel que fa referència a la **linealitat** de les respostes cromatogràfiques en l'àmbit de concentracions 30 i 10000 $\eta\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, la comprovació de la linealitat de la mètrica analítica utilitzada, tal com s'exposa en el capítol de Material i mètodes, s'ha portat a terme mitjançant la determinació del coeficient de correlació de les corbes de calibratge així com l'interval de confiança de l'ordenada a l'origen i també duent a terme un estudi estadístic de les respostes analítiques normalitzades per a les respectives concentracions.

Els resultats obtinguts (Taula 5.3, pàg 106) en tots els estudis de linealitat, en totes les rectes assajades, només en dos casos (recta núm. 5 per al Clonazepam i recta núm. 4 per al Pinazepam) s'obté un valor del pendent entre els valors teòrics i experimentals comprès entre 0.975 i 1.025, com es concreta en la bibliografia (Ray 1994; USP XXIII, 1996).

Considerant els valors mitjans en tots els casos, es confirma la linealitat de la mètrica amb un coeficient de correlació mitjà, comprès entre 0.9995 i 0.9591, i amb un interval de confiança que inclou sempre el valor del zero, tal com s'exposa en la Taula resum 6.2 :



Taula resum 6.2: Valors mitjans del coeficient de correlació (r) i dels intervals de confiança de l'ordenada a l'origen corresponents a l'estudi de la linealitat de la metodologia analítica per les benzodiazepines indicades

	Marges de concentració	
	0.03 mcg / ml – 10 mcg/ ml	
	r	IC
Alprazolam	0.9995	- 1.013 / 0.7591
Clobazam	0.9978	-0.0046 / 0.0419
Clonazepam[#]	0.9591	-0.04 / 0.005
Diazepam	0.9959	3.0 E-06 / - 0.03
Lorazepam	0.9967	-0.003 / 0.0005
Midazolam	0.9955	-0.03 / 0.06
Pinazepam	0.9866	-0.02 / 0.02

[#] la recta de calibratge inclou desde 0.03 µg / ml fins a 1 µg / ml

L'estudi estadístic mitjançant l'ANOVA posa de manifest que la metodologia analítica, en tots els casos, és lineal dins el marge de concentracions assajades, ja que en cap de les benzodiazepines estudiades s'han pogut demostrar diferències significatives entre les respostes analítiques normalitzades obtingudes en els diferents nivells de concentració. En la taula resum 6.1 s'exposen els valors de probabilitat. Cal remarcar que en els casos del Clonazepam, Midazolam i Pinazepam s'ha aplicat una anàlisi no paramètrica de Kruskal-Wallis, donat que les variàncies no van sortir homogènies.

Els càlculs dels límits de quantificació s'han fet per aplicació directa de l'equació 4.5 (pàg.59) descrita en el capítol de Material i mètodes, apartat 4.4.3.5. S'exposen en la Taula resum 6.1. Ens permeten afirmar que, en tots el casos, el límit de quantificació de la metodologia analítica és inferior al menor valor de concentració de fàrmac estimat en les mostres de treball.

Per a portar a terme els estudis de permeació a través de la pell va ser necessari validar el sistema automatitzat de presa de mostres (Microette^R). Per a establir les condicions òptimes que permetin el millor seguiment dels nivells de fase receptora de les cel·les de difusió es van fixar temps d'emplenament de 10.0 segons i volums de reposició de 0.7 ml. En aquestes condicions, el volum mitjà dosificat va ser de 0.56±0.01 ml per vial, que s'ajusta al valor teòric especificat en la metodologia de treball (0.56 ml per vial). A més a més, es van mesurar els volums i superfícies de difusió de cada cel·la de Franz (valor mitjà de 13.15±0.06 ml i 2.54±0.16 cm² (Cordero,1998) respectivament). Els valors obtinguts en la validació de les metodiques

de treball emprades en la present experiència, permeten concloure que els resultats que se'n deriven són un fidel reflex dels fenòmens estudiats.

6.2 PARÀMETRES FÍSICO-QUÍMICS DE LES BENZODIAZEPINES ESTUDIADES

El coeficient de repartiment dels fàrmacs entre el vehicle aplicat sobre la pell i els lípids de l'estrat corni és un factor determinant en el pas dels principis actius a través de la pell (Flynn, 1988). En la pràctica, la determinació del coeficient de repartiment dels fàrmacs entre octanol (fase lipídica) i tampó pH 7.4 (vehicle aquós) es considera representatiu del que posseeix el fàrmac entre un vehicle aquós i els lípids de l'estrat corni (Scheuplein, 1983).

6.2.1 Coeficients de distribució i de repartiment

S'ha determinat experimentalment el coeficient de distribució de les benzodiazepines entre octanol / solució reguladora de fosfats, pH 7.4. D'acord amb la metodologia exposada en l'epígraf 4.5.2 del capítol de Material i mètodes per aplicació directa de les equacions 4.9 o 4.10, s'obté la representació gràfica que relaciona $\log D$ i el pH de la solució aquosa, que es pot veure en la Figura 5.2 (pàg.115) de l'epígraf 5.2.2.1.

La correlació gràfica obtinguda posa de manifest que en el pH de treball ($\text{pH} = 7.4$), el valor de $\log D$ equival a $\log P$ en totes les benzodiazepines assajades exceptuant el Clobazam.

Per al Clobazam, fàrmac àcid feble i amb valor de $\text{pK}_a = 6.65$, a partir del valor del coeficient de distribució (D) experimental obtingut per aplicació directa de l'equació 4.9, s'estima el valor del coeficient de repartiment P corresponent a aquesta benzodiazepina.

6.2.2 Solubilitat

Un altre factor limitatiu de la permeació transdèrmica dels fàrmacs és la seva solubilitat en el vehicle utilitzat, donat que aquest valor és representatiu de l'activitat termodinàmica del fàrmac en el vehicle i, com a conseqüència, del seu potencial pas a través de l'estrat corni (Flynn, 1988).

La solubilitat d'un fàrmac en el vehicle és una de les propietats físico-químiques que influeixen directament en el flux d'aquest a través de la pell. Vegeu la Taula 6.3 del capítol de Material i mètodes. De les set benzodiazepines assajades, les que presenten la major solubilitat (S_0) en les condicions experimentals (solució reguladora



pH 7.4) són el Lorazepam ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) i l'Alprazolam ($86.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), i els menys solubles són el Midazolam ($16.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) i el Pinazepam ($22.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Podem concloure que la major activitat termodinàmica de les benzodiazepines estudiades en el vehicle utilitzat en aquest treball, la presenten l'Alprazolam i el Lorazepam.

Com s'ha comentat anteriorment, la solubilitat i el coeficient de repartiment octanol / solució reguladora, pH 7.4, són els paràmetres físico-químics que més influència tenen en el pas de fàrmacs a través de la pell. Per aquest motiu, els valors d'aquests paràmetres obtinguts per a les benzodiazepines estudiades requereixen ser analitzades en aquest epígraf. En la taula resum 6.3, s'exposen els valors obtinguts d'aquests paràmetres ordenats en ordre decreixent de solubilitat.

Taula resum 6.3: Valors dels paràmetres físico-químics corresponents a cadascun dels fàrmacs de la sèrie de benzodiazepines estudiades

Fàrmac	Paràmetres físico-químics		
	Solubilitat (S_0) ^a ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Coefficient de repartiment (P) en octanol / solució amortidora pH 7.4	Punt de fusió ^b ($^{\circ}\text{C}$)
Lorazepam	100.5	263.03	166-168
Alprazolam	86.1	141.25	228-225
Diazepam	83.6	616.59	125-126
Clobazam	56.7	467.74	180-182
Clonazepam	24.9	323.59	236.5-238
Pinazepam	22.5	1174.89	140-142
Midazolam	16.0	2089.30	158-160

^a S_0 correspon a la concentració a saturació del fàrmac en solució reguladora de pH 7.4

^b Veure Annex

En principi, els fàrmacs menys solubles en medi aquós (solució reguladora de fosfats de pH 7.4) haurien de presentar un major coeficient de repartiment en la solució binària octanol / solució reguladora de fosfats de pH 7.4. Aquesta premissa es compleix pel Midazolam i Pinazepam. Efectivament, el Midazolam i Pinazepam presenten la menor solubilitat ($16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ i $22.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) i també presenten el major coeficient de repartiment (2089.30 i 1174.89).

En canvi, el Lorazepam presenta una major solubilitat ($100.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) que l'Alprazolam ($86.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) i, al contrari, el primer presenta un major coeficient de repartiment (263.03) que el segon (141.25).

D'altra banda, l'Alprazolam i el Diazepam, presenten pràcticament la mateixa solubilitat, $86.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ i $83.6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivament, però els valors dels seus coeficients de repartiment són bastant diferents: 141.25 per a l'Alprazolam i 616.59 per al Diazepam.

Podem comprovar també que entre el Diazepam i el Clobazam es torna a no complir altra vegada que el més soluble en solució reguladora de fosfats de pH 7.4 ($83.6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vs $56.7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) és menys lipòfil (616.59 vs 467.74) malgrat que els coeficients de repartiment podem considerar que són del mateix ordre.

Si fem una anàlisi global dels coeficients de repartiment hem de destacar tres casos significatius: l'Alprazolam ($P=141.25$) i el Clonazepam ($P=323.59$) presenten valors baixos en relació a la tendència del grup i el Diazepam ($P=616.59$) presenta un valor lleugerament elevat en relació a la tendència del grup.

Aquestes discrepàncies podrien ser explicades en base a les següents consideracions:

- a) Diferències entre punts de fusió de les benzodiazepines: Per a la majoria de benzodiazepines estudiades (Lorazepam, Clobazam, Pinazepam i Midazolam) el seu punt de fusió (vegeu Annex) oscil·la al voltant de $140\text{-}180^\circ\text{C}$ i, per tant, les seves entalpies de fusió seran bastant similars entre elles. En canvi, l'Alprazolam i el Clonazepam presenten els punts de fusió més elevats, 228°C i 236°C cosa que vol dir que les forces d'interacció existents són més intenses que no pas en el cas de les altres benzodiazepines esmentades anteriorment, fet que pot comportar una major dificultat d'incorporar-se a la fase octanòlica. El cas del Diazepam és precisament l'oposat, és a dir, presenta la més baixa temperatura de fusió (forces d'interacció menors) i, per tant, una major possibilitat d'incorporar-se a la fase octanòlica, fet que podria explicar el seu valor de coeficient de repartiment més elevat. Aquestes consideracions venen també confirmades per la correlació comentada en l'epígraf 6.5.1 d'aquest capítol de Discussió, on es posa de manifest que la correlació lineal entre $\log P$ i $\log S_0$ (P = coeficient de repartiment i S_0 =solubilitat a la solució reguladora de pH 7.4) està també influenciada per un terme corresponent al punt de fusió que contribueix provocant una disminució del valor de $\log P$.
- b) Diferències de concentració de fàrmac entre la fase orgànica i la fase aquosa en la determinació experimental del coeficient de distribució i de repartiment.



Si observem els valors en la Taula 5.8, pàgina 116 del capítol de Resultats, podem observar que la $[BZD]_{oct}$ per a les benzodiazepines estudiades és del mateix ordre, en canvi la $[BZD]_{aq}$ és quantitativament diferent entre elles. Així ens trobem que per al Pinazepam i per al Midazolam (que presenten els valors més elevats de $\log D$ i $\log P$) aquest valors són els més petits ($7.61E-06M$ i $1.39E-05M$) deguts al seu valor de pK_a . En el pH a que es troben aquestes solucions el seu grau d'ionització és baix. S'exceptua el cas del Clobazam, ja que es tracte d'un àcid feble i, per tant, a pH 7.4 amb el pK_a que té es troba ionitzat en un 85% ($\log D$ 1.85 i $\log P$ 2.67), la resta de benzodiazepines estan molt poc ionitzades en el medi fet que provoca poques diferències entre $\log D$ i $\log P$.

En la determinació del coeficient de repartiment ha resultat que la concentració de fàrmac en la fase orgànica (octanol) del Lorazepam ($1.72 E-02$) és superior a la de l'Alprazolam ($1.64E-02$) i la concentració en la fase aquosa de l'Alprazolam és superior a la del Lorazepam. Aquest fet ve determinat per les diferències existents en els seus pK_a (Alprazolam 2.4 vs Lorazepam 0.03) al pH considerat. També la concentració de Diazepam en la fase orgànica (octanol) és superior ($2.18E-02$) a la de l'Alprazolam ($1.64E-02$), d'acord amb els resultats exposats en la taula 5.8, pàg. 116. D'altra banda, la concentració del Diazepam a la fase aquosa és menor ($3.56E-05$) que la de l'Alprazolam ($1.17E-04$) aquesta situació és deguda a que el Diazepam ($pK_a=3.4$) es troba més ionitzat que no l'Alprazolam ($pK_a=2.4$) al pH considerat. Aquest fet provoca que el $\log P$ sigui més elevat en el cas del Diazepam. Pel que fa a les diferències entre coeficients de repartiment del Pinazepam i Clonazepam (solubilitats similars) de nou succeeix que al pH considerat el Clonazepam ($pK_a=1.55$) es troba menys ionitzat que el Pinazepam ($pK_a=3.01$) i la concentració en la fase aquosa és més gran per al Clonazepam que per al Pinazepam, fet que provoca que el $\log P$ del Pinazepam sigui més gran ($\log P=3.07$) que no el del Clonazepam ($\log P=2.51$).

Totes aquestes consideracions anteriors ens permetrien explicar les diferències que es presenten respecte a la relació solubilitat / coeficient de repartiment entre Clobazam i Lorazepam i entre Alprazolam i Diazepam.

En un altre ordre de coses, d'acord amb el valors de $\log P$ exposats en la taula resum 6.4 per a la sèrie de benzodiazepines assajades, en general els valors obtinguts per aquest paràmetre experimentalment i mitjançant el programa KOWWIN i la base de dades SciFinder estan d'acord amb els obtinguts experimentalment, perquè les desviacions respecte als valors experimentals són de l'ordre d'un 30-40 %, a excepció de l'Alprazolam que presenta per al KOWWIN un valor del 80%.

Taula resum 6.4: Valors de log de P determinats experimentalment , mitjançant KOWWIN i a partir de la base de dades SciFinder ACS 2001

FÀRMAC	Log P		
	Experimental	KOWWIN	SciFinder ACS 2001
ALPRAZOLAM	2.15	3.87	2.50
CLOBAZAM	2.67	1.82	2.51
CLONAZEPAM	2.51	2.53	3.02
DIAZEPAM	2.79	2.70	3.86
LORAZEPAM	2.42	2.41	2.48
MIDAZOLAM	3.32	4.33	3.70
PINAZEPAM	3.07	2.91	4.34

6.3 ESTUDI DE LA PENETRACIÓ TRANSDÈRMICA DE LES BENZODIAZEPINES ESTUDIADAES

Els principals paràmetres representatius de la permeació transdèrmica dels fàrmacs són: constant de permeabilitat (k_p), període de latència (T_l) i flux (J). De fet es pot considerar que el període de latència és el primer obstacle que limita el pas de fàrmacs a través de l'estrat corni (Scheuplein, 1983), essent la constant de permeabilitat la limitació física més important perquè el fàrmac travessi la pell, una vegada ha assolit la seva concentració a saturació (Flynn, 1988). D'altra banda, es pot considerar que la solubilitat del fàrmac en el vehicle que el conté és una de les característiques físiques dels principis actius que, conjuntament amb la constant de permeabilitat, condicionen el valor del flux, que en definitiva és el paràmetre de referència respecte a les característiques de pas a través de la pell. Val a dir que els estudis de permeació transdèrmica *in vitro* emprant pell humana són un fidel reflex dels valors dels paràmetres respecte al comportament del pas de fàrmac a través de la pell *in vivo*. (Flynn, 1988).

6.3.1 Influència de la pell

S'ha de considerar que en els estudis de permeació transdèrmica realitzats en el present treball, la membrana de permeació implicada és la mateixa (pell humana), procedent de la mateixa zona anatòmica (zona abdominal), i també s'ha utilitzat el mateix dissolvent a per dissoldre els fàrmacs, és a dir en el compartiment donador de les cel·les s'ha situat el mateix vehicle. D'altra banda,



també s'ha de tenir en compte que l'experiència s'ha portat a terme utilitzant solucions de fàrmac a saturació, perquè l'activitat termodinàmica del fàrmac en el vehicle és màxima. D'altra banda, s'ha de comentar que la solució situada en el compartiment receptor és la mateixa que la utilitzada com a solució medicamentosa en el compartiment donador (solució amortidora de fosfats pH 7.4) per què l'experiència s'ha portat a terme en condicions simètriques. Així mateix, d'acord amb el plantejament de l'estudi, els valors experimentals obtinguts d'aquests paràmetres (k_p , J i T_l) poden sotmetre's a comparació entre els obtinguts per als fàrmacs sotmesos a assaig. Tenint en compte que tant la membrana de permeació (pell humana) com el vehicle en què s'han dissolt els fàrmacs (tampó fosfat pH 7.4), en tots els casos són els mateixos, el valor de K_p obtingut per a cadascuna de les benzodiazepines estudiades és estrictament representatiu de la capacitat per a travessar la pell de cadascuna de les seves estructures químiques (Flynn, 1988). És a dir, el valor de k_p representa la constant de permeabilitat intrínseca del fàrmac en el pas a través de la pell.

Pels motius exposats, pot considerar-se que s'ha minimitzat al màxim la influència de la pell en la permeació transdèrmica de les benzodiazepines estudiades. Aspecte confirmat per l'estudi estadístic emprat el qual posa de manifest que no s'han trobat diferències estadísticament significatives entre les pells emprades.

6.3.2 Control de la integritat de la pell

Aquest és un dels apartats més problemàtics dins els estudis transdèrmics, ja que és relativament difícil detectar irregularitats, lesions a la pell abans de sotmetre-la a experimentació. A més a més, pot succeir que, al llarg de l'experiència, la pell sofreixi pèrdues d'integritat. En aquest sentit, en el present estudi es va optar per un control de la integritat per dos procediments:

- *Directe*. Observació *de visu*, a contrallum, de la integritat. Recordem que la llum visible presenta una longitud d'ona petita i que permet detectar la presència de discontinuïtats (que apareixen com punts de llum) a la pell. Aquesta prova qualitativa es tornava a realitzar al final de l'experiència per a observar si hi havia hagut deteriorament.
- *Indirecte*. A partir de la presa de mostra 0. És a dir, la mostra, que no era retirada al mateix moment d'incorporar la fase donadora, sinó al cap de 5 minuts d'haver-la posat. Si hi havia manca d'integritat de la pell en aquesta mostra, ja es detectaven nivells de fàrmac a la fase receptora.

El procediment s'ha revelat útil per a detectar manques d'integritat.

6.3.3 Paràmetres de permeació

Com s'ha comentat anteriorment, els paràmetres representatius de la permeació transdèrmica són la constant de permeabilitat (k_p), el flux (J), el

període de latència (T_l) i el temps mitjà de residència del fàrmac a la pell (MTT). D'acord amb Williams i col. (1992), la distribució dels valors individuals obtinguts en els diferents replicats realitzats pel càlcul dels paràmetres transdèrmics dels fàrmacs sotmesos a estudi no segueixen una distribució normal. Per aquest motiu, la discussió dels paràmetres transdèrmics de les benzodiazepines assajades es desenvoluparà prenent com a base els valors de les medianes corresponents a cada paràmetre que es poden consultar a la Taula 5.29.

6.3.3.1 La constant de permeabilitat (k_p)

Respecte a la constant de permeabilitat (k_p), el valor més gran el presenta el Midazolam ($k_p = 13149.5 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) i el més petit ($k_p = 623.33 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) es correspon a l'Alprazolam (Taula 5.29). D'acord amb l'equació 4.37, pàg. 81, el valor de la constant de permeabilitat està relacionat amb el coeficient de repartiment del fàrmac en el vehicle i els lípids de l'estrat corni (P_1) i el coeficient de difusió del fàrmac a través de la pell (P_2). El fet que el Midazolam presenti el valor més gran de k_p es deu al fet que el seu coeficient de repartiment vehicle / pell és dos ordres de magnitud superior ($P_1 = 0.1350 \text{ cm.}$) que el corresponent a l'Alprazolam ($P_1 = 0.005213 \text{ cm.}$). Aquests resultats estan d'acord amb els valors experimentals del coeficient de repartiment octanol / solució reguladora de fosfats de pH 7.4, trobats en el present treball. El Midazolam presenta un valor més elevat de P (2089.31) que l'Alprazolam (141.25) com es pot veure en la Taula resum 6.3. Donat que el paràmetre representatiu del coeficient de difusió d'aquests fàrmacs (P_2) és del mateix ordre (Taula 5.29), es pot considerar que el coeficient de repartiment del fàrmac entre el vehicle i la pell sigui el factor responsable que el Midazolam presenti una major capacitat intrínseca per a travessar la pell de totes les benzodiazepines estudiades.

El Clobazam i Clonazepam presenten un valor de constant de permeabilitat del mateix ordre $k_p = 3555.94 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ i $k_p = 2599.27 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivament (Taula 5.29), i el coeficient de repartiment del Clobazam (467.74) és lleugerament superior al del Clonazepam (323.59), d'acord amb els valors exposats en la Taula resum 6.3. Els valors de P_1 són del mateix ordre per a aquests dos fàrmacs (Taula 5.29), i donat que els valors de P_2 per als dos fàrmacs són també del mateix ordre, en resulten valors similars de la seva constant de permeabilitat.

El Diazepam i el Pinazepam presenten valors similars per la seva constant de permeabilitat $k_p = 7158.92 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$, el primer, i $k_p = 6488.8 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$, el segon (Taula 5.29). Si observem els valors de P_1 d'ambdós



fàrmacs podem observar que la diferència en la lipofília més favorable al Diazepam ve compensada per un major coeficient de difusió a través de la pell. En aquest cas la relació H-donadors / H-acceptors és la mateixa (0 / 3).

Respecte al Lorazepam i l'Alprazolam ($k_p = 702.98 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ i $k_p = 623.33 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) el valor de P_2 (Taula 5.29) és superior per al Lorazepam, fet que en principi indica que el Lorazepam posseeix un major coeficient de difusió a través de la pell, fet de nou avalat per la relació H-donadors/H-acceptors favorable al Lorazepam (2 / 4) enfront (0 / 4) a l'Alprazolam.

6.3.3.2 Període de latència

El període de latència (temps que tarda a saturar-se de fàrmac l'estructura cutània) és el temps a partir del qual, si s'apliquen sobre la pell solucions saturades, la permeabilitat transdèrmica dels principis actius és constant. Alguns autors, (Flynn, 1988), com hem esmentat, consideren el pas a través de l'estrat corni, com el primer obstacle per a la permeació transdèrmica dels fàrmacs.

D'acord amb la Taula 5.29, els valors més baixos del període de latència els presenten el Lorazepam i el Pinazepam ($T_l = 0.00 \text{ h}$). Donat que s'assumeix que el gruix de la pell emprada en els assaigs realitzats en el present treball té un valor fix ($400 \mu\text{m}$), el fet que el període de latència sigui pràcticament nul per a aquests fàrmacs és degut, segurament, al fet que presenten un valor més gran del coeficient de difusió a través de la pell, comparats amb els altres elements de la sèrie estudiada. Aquesta propietat difusional, es concreta si considerem el valor del paràmetre P_2 (directament relacionat amb el coeficient de difusió; Equació 4.33) estimat per a aquestes dues benzodiazepines. En efecte, tal com s'exposa la Taula 5.29, els valors del paràmetre P_2 corresponents al Lorazepam i al Pinazepam són els majors de la sèrie; 65.00 h^{-1} i 938.17 h^{-1} , respectivament.

En aquest sentit, el Clonazepam ($T_l = 4.34 \text{ h}$), el Diazepam ($T_l = 2.11 \text{ h}$) i el Clobazam ($T_l = 2.08 \text{ h}$) són, de les benzodiazepines estudiades, les que presenten un valor més elevat per al període de latència (vegeu Taula 5.29) a les quals els corresponen valors baixos de P_2 . Per al Clonazepam, $P_2 = 0.0386 \text{ h}^{-1}$; pel al Diazepam, el $P_2 = 0.07888 \text{ h}^{-1}$ i per al Clobazam, $P_2 = 0.0800 \text{ h}^{-1}$. Aquests resultats permeten deduir que aquests fàrmacs tenen els coeficients de difusió a través de la pell més baixos de la sèrie de les benzodiazepines estudiades.

Segons Flynn i Stewart (1988), els fàrmacs no electròlits que tenen un pes molecular superior a 200 dalton –com és el cas de les benzodiazepines–, en principi presenten períodes de latència elevats. Els autors citen, per exemple que el Fentanil i el Sufentanil, fàrmacs de baixa polaritat presenten períodes de latència d'unes 3 hores. Però aquests mateixos autors publiquen per a la Morfina i la Hidromorfina, fàrmacs relativament polars, temps de latència superiors a les 6 hores. Concreten que les diferències en l'estructura química dels fàrmacs té un gran paper en la seva difusió a través de la pell. El resultat obtingut en el present treball estan d'acord amb les consideracions exposades per Flynn i Stewart: efectivament, el Clonazepam que presenta el valor més gran per al període de latència (4.34 h, Taula 5.29) no és el fàrmac més hidròfil de la sèrie ($P=323.29$, Taula resum 6.3) i el Pinazepam que pràcticament no presenta període de latència ($T_l = 0.00$ h. Taula 5.29) sembla ser un dels fàrmacs de la sèrie que té un major coeficient de repartiment, es a dir una baixa polaritat ($P=1174.9$, Taula resum 6.3).

Es pot concloure, d'acord amb Flynn i Stewart, que les característiques físico-químiques dels fàrmacs, en el que representa la seva polaritat, no són valors de referència per a predir el període de latència quan s'apliquen sobre la pell, i que els estudis *in vitro* són necessaris per a obtenir informació al voltant del temps que tarden els fàrmacs a saturar l'estructura de l'estrat corneï, que tal com s'ha comentat anteriorment és el, primer obstacle que els principis actius han de salvar en el seu trànsit a través de l'estructura cutània.

6.3.3.3 Flux. (J)

El flux dels fàrmacs a través de la pell, és el paràmetre de referència per a calibrar la possibilitat de formular-les en sistemes d'alliberament transdèrmic (SAT). Per això, un estudi comparatiu d'aquest paràmetre constitueix la base a partir de la qual poden seleccionar-se els candidats per a ser formulats en forma de SAT.

En els comentaris al voltant del flux transdèrmic s'ha de considerar l'equivalència d'aquest paràmetre amb factors que incideixen directament en el pas de fàrmacs a través de la pell. D'acord amb l'equació 4.38, pàg. 82, en un model de dosis infinites, el flux transdèrmic està directament relacionat amb la concentració a saturació de fàrmac en el vehicle i amb la constant de permeabilitat.

En el present treball la benzodiazepina que presenta el valor més alt de flux és el Diazepam ($J = 0.59 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) i el més baix l'Alprazolam ($J = 0.05 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$), d'acord amb els valors obtinguts en aquest treball (Taula 5.29).



Malgrat que el Diazepam i l'Alprazolam presenten pràcticament la mateixa activitat termodinàmica en el vehicle, és a dir, pràcticament el mateix valor de S_0 (Taula resum 6.3), el flux del Diazepam és superior al de l'Alprazolam, degut al fet que el primer té un valor molt superior de la constant de permeabilitat: $k_p = 7158.92 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ per al Diazepam i $k_p = 623.33 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ per a l'Alprazolam (Taula 5.29). En aquest sentit val a dir que el Lorazepam presenta l'activitat termodinàmica més elevada. En el vehicle $S_0 = 100.5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ (Taula resum 6.3), el valor de flux d'aquesta benzodiazepina és dels més baixos ($J = 0.07 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) degut al fet que posseeix una constant de permeabilitat baixa $k_p = 702.98 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$.

En aquest punt cal comentar que les molècules hidrofòbiques presenten una baixa cohesió intercrystal·lina, per què són relativament solubles. Presenten una alta solubilitat en medis no polars, incloent-hi les fases lipòfiles de la pell. Aplicant aquests conceptes físico-químics al procés de permeació transdèrmica de fàrmacs, les substàncies altament hidrofòbiques, com el Midazolam ($P = 2089.31$, Taula resum 6.3), presenten un elevat coeficient de permeabilitat que tendeix a compensar la seva baixa solubilitat en aigua: el Midazolam presenta el major valor de $k_p = 13149.50 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ (Taula 5.29). Per aquest motiu, els fàrmacs que presenten un bon equilibri hidròfil / lipòfil, com és el Diazepam, presenten un efecte sinèrgic entre l'activitat termodinàmica en el vehicle (S_0) i el seu valor de la constant de permeabilitat (k_p), fet que es tradueix a provocar un flux elevat a través de la pell. Pels motius exposats, de la sèrie de benzodiazepines estudiades, el diazepam és el fàrmac que presenta un major flux.

6.3.3.4 Temps mitjà de residència del fàrmac a la pell

Entre els paràmetres representatius de la permeació transdèrmica dels fàrmacs s'hauria de considerar el temps mitjà de residència a la pell, o sigui, el temps mitjà de permanència del fàrmac a la pell una vegada aquest ha estat retirat.

Aquests valors s'han de considerar aparents ja que en els estudis de permeabilitat transdèrmica dels fàrmacs *in vitro*, no es poden reproduir amb fiabilitat, degut al fet que l'aclariment cutani que pateix el fàrmac des de la pell es deu a la circulació sanguínia que irriga la dermis. Malgrat tot, a nivell comparatiu, en complir-se les condicions "sink" en tots els casos, els valors experimentals obtinguts de MTT són molt orientatius respecte al temps mitjà de permanència del fàrmac a la pell una vegada retirada la formulació que el conté. A partir de l'equació 4.45, pàgina 83 en el present treball, els valors de V_1 (volum del compartiment donador) i A

(àrea) són constants. Per aquest motiu els valors de MTT trobats depenen dels paràmetres P_2 i k_p .

De la sèrie de fàrmacs estudiada, el valor més gran d'aquest paràmetre el presenta l'Alprazolam (MTT = 636.03 h, Taula 5.29), degut al fet que posseeix el menor valor de k_p ($623.33 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$, Taula 5.29) i un valor mitjà de P_2 (0.202354 h^{-1} , Taula 5.29). D'altra banda, el valor més petit el presenta el Midazolam (MTT = 40.93 h, Taula 5.29), com a conseqüència del fet que aquest fàrmac presenta un major valor de k_p ($13149.50 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$, Taula 5.29) i un valor baix de P_2 . (0.10088 h^{-1} , Taula 5.29).

El valor experimental de MTT proveeix una important informació, perquè és indicatiu del temps mitjà de permanència del fàrmac en la pell una vegada hem retirat de la pell la formulació que el conté, temps que s'ha de tenir en compte quan es dissenya un règim de dosificació d'un fàrmac administrat en un sistema d'alliberament transdèrmic (SAT).

6.3.3.5 Predicció de concentracions plasmàtiques de fàrmac terapèutiques en estat d'equilibri estacionari

Els estudis de permeació transdèrmica dels fàrmacs *in vitro*, emprant pell humana com a membrana de permeació, permeten predir, en funció del valor del flux obtingut i de la superfície del potencial SAT, considerant l'aclariment plasmàtic del fàrmac ($C_{ee} = J / Cl$), les concentracions plasmàtiques que s'obtidrien després de l'aplicació de la forma farmacèutica sobre la pell.

En aquest estudi predictiu s'assumeix que la grandària d'un potencial SAT és de 16 cm^2 i es relaciona la concentració plasmàtica de fàrmacs en estat d'equilibri estacionari prevista amb la corresponent concentració plasmàtica terapèutica referida en la bibliografia (Goodman, 2001).

D'acord amb els resultats exposats a la Taula resum 6.5, per aplicació directa de l'equació ($C_{ee} = J / Cl$) i considerant el valor de l'aclariment plasmàtic pres de la bibliografia, es pot arribar a la conclusió que la concentració a saturació dels fàrmacs assajats en la formulació aplicada sobre la pell no dona un flux suficient per a formular un SAT de 16 cm^2 que permeti, després de la seva aplicació a l'organisme, obtenir concentracions plasmàtiques terapèutiques.



Taula resum 6.5: Concentracions plasmàtiques predites de fàrmacs en estat d'equilibri estacionari (C_{ee}) en funció de la mediana del flux experimental i de l'aclariment plasmàtic (Cl). S'indiquen també els marges de concentracions terapèutiques.

Fàrmacs	J ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	Cl ($\text{l}\cdot\text{h}^{-1}$)	C_{ee} (ng/ml)	C_t^* (ng/ml)
Alprazolam	0.05	4.0	0.21	5-20 / 8-37 / 20 – 40 ^G
Clobazam	0.20	2.0	1.62	100-400 / 125 – 250 ^M
Clonazepan	0.06	6.0	0.17	5- 70 ^G / 20-70 / 25 – 30 ^{Mi}
Diazepam	0.59	1.8	5.26	300 ^{Mi} / 300 – 400 ^G
Lorazepam	0.07	3.0	0.38	20-50 / 50 – 240 ^C
Midazolam	0.21	20.6	0.17	20-70 / 20 – 50 ^G / 100 – 200 ^{Mi}
Pinazepam	0.14	10 [#]	0.22	≅ Diazepam

- [#] Valor estimatiu.
- ^{* G} Goodman&Gilman, ^C Clarke, ^M Merck, ^{Mi} Micromedex

Independentment de la informació que dóna el present treball referent a les característiques sobre la permeació intrínseca de les benzodiazepines estudiades i dels factors que influeixen en el procés, a nivell pràctic pot deduir-se que, en principi, l'Alprazolam, el Diazepam i el Lorazepam serien els fàrmacs seleccionats per ser formulats en forma de SAT. Aquesta asseveració es fonamenta, en primer lloc en el fet que l'Alprazolam és el fàrmac, dins la sèrie estudiada, que presenta un dels valors del MTT més elevats; 636.03 h (Taula 5.29), fet que permet espaiar la pauta de dosificació. En segon lloc, l'addició de penetrants a la formulació permet, en molts casos, augmentar el valor del flux dels fàrmacs a través de la pell de 10 a 100 vegades (Behl, 1994), per la qual cosa hauríem d'esperar que la utilització de penetrants en les respectives formulacions permeti arribar, per a l'Alprazolam i el Diazepam, a concentracions terapèutiques a partir d'un SAT aplicat sobre la pell. D'acord amb el que ha estat exposat anteriorment i donat que l'Alprazolam i el Diazepam són, de la sèrie estudiada, les benzodiazepines més utilitzades en la pràctica clínica diària, aquestes benzodiazepines s'han seleccionat pels estudis en monocapes artificials.

6.4 ESTUDIS D'INTERFASE DE LES BENZODIAZEPINES

En principi, d'acord amb els resultats obtinguts en el present treball, els fàrmacs candidats a ser formulats com a SAT, de la sèrie de benzodiazepines estudiades, són l'Alprazolam i el Diazepam. Cal dir però que el flux transdèrmic en els estudis *in vitro* portats a terme per a aquests fàrmacs a partir de la formulació assajada (solució reguladora de fosfats pH 7.4), no permeten predir concentracions plasmàtiques terapèutiques en estat d'equilibri estacionari; en conseqüència, el disseny d'un SAT hauria de contemplar l'addició de penetrants. Per aquest motiu s'ha assajat en aquest treball la metodologia que permet estudiar la interacció entre fàrmacs i monocapes lipídiques artificials. En el treball realitzat s'ha estudiat la interacció entre l'Alprazolam, el Diazepam i una monocapa de dipalmitoil-dl-fosfatidilcolina (DPPC), representativa, com s'ha comentat anteriorment, d'una membrana cel·lular. L'esmentada tècnica s'ha realitzat amb l'objectiu de comprovar si resulta operativa per a seleccionar els penetrants més adequats, els quals incorporats a la formulació que conté el fàrmac, permeti a aquest augmentar el flux a través de la pell i que pugui proveir concentracions plasmàtiques en estat d'equilibri estacionari terapèutiques.

Els estudis d'interfase d'Alprazolam i Diazepam s'han realitzat en dues etapes: estudis d'activitat superficial dels fàrmacs i estudis de cinètica de penetració en monocapa de DPPC, a àrea constant.

6.4.1 Estudis de l'activitat superficial

D'acord amb el que s'ha exposat en l'epígraf 4.8 del capítol de Material i mètodes, els estudis d'activitat superficial de fàrmacs tenen com a objectiu determinar l'excés de concentració superficial (Γ) que ens indica el grau de tensioactivitat de les molècules de fàrmac estudiades. Es determina quan les molècules de la interfase es troben en equilibri dinàmic amb la resta de la solució, bescanviant-se contínuament entre elles. En condicions d'equilibri, existeix una relació entre la quantitat de solut adsorbit a la interfase i la variació de la tensió superficial o interfacial que produeixen en el solvent. Aquesta relació s'expressa mitjançant la isoterma d'absorció de Gibbs (Equació 4.50), que és indicativa de l'energia lliure del procés. Aquests estudis també ens permeten concretar la concentració òptima de fàrmac a injectar quan es procedeix a desenvolupar la metodologia en els estudis de la cinètica de penetració, així com el temps idoni a què s'ha de sotmetre per a la obtenció de valors de tensió superficial representatius.

Pel que fa referència al procés d'incorporació de fàrmac a la interfase, figures 5.11 i 5.12 pàgines 141 i 142, s'ha de dir que es van desenvolupar amb certa rapidesa per als dos fàrmacs, ja que a les concentracions elevades, després dels 10 primers minuts, s'havia assolit aproximadament un 80% de la pressió



màxima. Tot i això es pot comprovar que en el cas del Diazepam és més ràpid (al cap de 10 minuts s'assoleix el valor asimptòtic per a totes les concentracions assajades) que en el cas de l'Alprazolam, que es pot traduir en una major rapidesa d'acció. D'altra banda, les representacions gràfiques de les Figures 5.11 i 5.12 ens permeten deduir que per a poder observar el temps necessari per a assolir valors asimptòtics és suficient efectuar un registre de la pressió superficial durant 60 min. La incorporació de la benzodiazepina a la interfase aire-solució reguladora de fosfats de pH 7.4 depèn de la concentració que presenti en la subfase.

Taula resum 6.6: Concentracions estudiades de fàrmac i valors de $\Delta\Pi_{\text{màx}}$ i àrea / molècula obtinguts per a cada fàrmac i concentració

	Concentració (mol / dm³)	$\Delta\Pi_{\text{màx}}$ (mN-/ m)	àrea/mol·lècula (nm²)
Alprazolam	1.531 E-05	4.1185±0.2101	6.661
	3.061 E-05	11.1929±0.1206	2.325
	6.62 E-05	14.9073±0.4758	1.028
	12.245 E-05	21.9999±0.8789	0.614
	15.286 E-05	18.4896±0.3554	0.527
Diazepam	1.531 E-05	5.9723±0.0843	3.568
	3.061 E-05	12.6637±0.1191	1.387
	6.62 E-05	17.1470±0.1221	0.852
	9.184 E-05	16.7878±0.0867	0.698
	15.286 E-05	16.1980±0.0558	0.556

D'acord amb el que ha estat exposat en la Taula resum 6.6 anterior es pot deduir, que en general, el Diazepam assoleix, a concentracions menors (6.62E-05M), el valor de $\Delta\Pi_{\text{màx}}$ i, com a conseqüència, és aquest el valor de concentració amb què es treballarà en els estudis posteriors de cinètiques de penetració. A concentracions superiors a aquestes es produiran fenòmens d'agregació molecular que impediran una interpretació racional del comportament individual de les molècules en el fenomen d'interfase.

A l'esmentada concentració, l'àrea per molècula és menor per al Diazepam (1.028 de l'Alprazolam vs 0.852 del Diazepam). A partir del resultat es pot comprovar que el Diazepam presenta una àrea per molècula més petita que l'Alprazolam per a una mateixa concentració molar. D'aquest fet es pot concloure que en la disposició espacial en la interfase, les molècules de Diazepam estan més compactades que no pas les d'Alprazolam en la solució reguladora. Aquestes observacions experimentals també es poden confirmar si observem les estructures químiques d'ambdós compostos (vegeu Annex). Són dues estructures que difereixen en els substituents de l'anell A (els substituents dels anells B i C són

exactament iguals). Dit d'una altra forma, la mida molecular de l'Alprazolam és major que el del Diazepam.

En les taules 5.31 i 5.32 es relacionen els valors de $\Delta\pi$ assolits per a cada concentració. Donat que aquest és un procés espontani, i com s'indica en l'apartat 4.8 del capítol de Material i mètodes, es va aplicar l'equació de Gibbs (per determinar l'excés de benzodiazepina en la interfase i també es va calcular l'àrea/molècula aplicant l'equació 4.58. Com es pot observar a partir de la concentració $6.62 \cdot 10^{-5}M$, els $\Delta\pi$ són pràcticament constants fet que ens informa de que el sistema s'ha saturat i, com a conseqüència, aquesta concentració serà la utilitzada en els estudis de penetració a àrea constant.

En la figura 6.1 es representa el resum de l'activitat superficial obtinguda per a l'Alprazolam i el Diazepam. D'acord amb els resultats de l'apartat s'observa que el procés d'incorporació de les benzodiazepines estudiades, Alprazolam i Diazepam, a la interfase aire/solució de fosfats, és diferent. La incorporació de la benzodiazepina és veu més afectada per la concentració en el cas de l'Alprazolam, que, com es pot veure en la Figura 6.1, no es satura fins a concentracions més altes. Aquest fet es veu corroborat per la major lipofília del Diazepam enfront de l'Alprazolam ($\log P_{\text{Diazepam}} = 2.79$ vs $\log P_{\text{Alprazolam}} = 2.15$, Taula 5.7 pàg. 116).

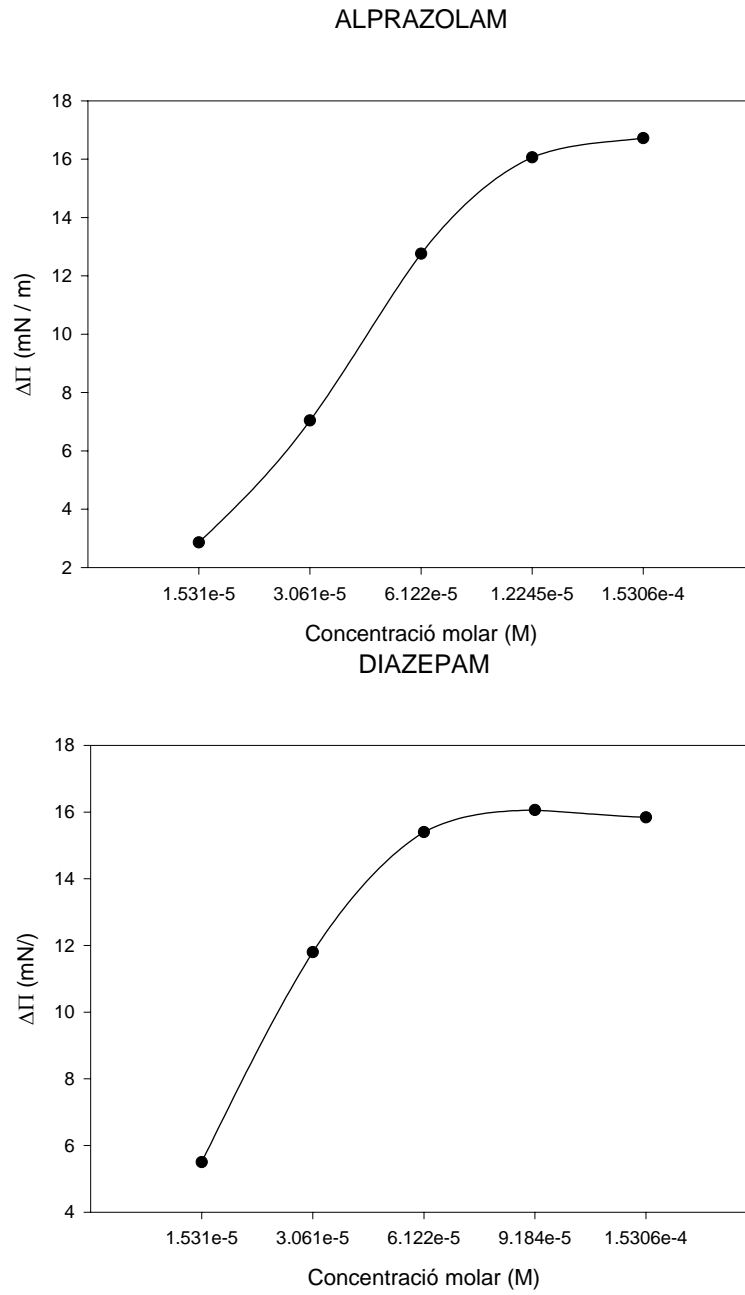


Figura 6.1: Corbes d'incorporació de la benzodiazepina assajada en la interfase

- Determinació de la densitat d'exclusió σ_{ex}

Amb l'objectiu de comparar la capacitat de penetració del fàrmac a la monocapa, es va determinar la densitat d'exclusió segons estableix Maget-Dana, 1999. En la Figura 6.2 es pot veure la relació entre la densitat superficial de fàrmac i l'increment de pressió superficial que provoca. Tal com era d'esperar, d'acord amb els resultats obtinguts fins ara, el Diazepam s'incorpora millor a la monocapa de DPPC que no pas l'Alprazolam, ($\sigma_{ex} = 0.81$ molec·nm⁻² pel Diazepam vs. $\sigma_{ex} = 0.70$ molec·nm⁻² per l'Alprazolam). Aquests fets, en principi, reforcen els resultats obtinguts respecte a la seva utilització per la via transdèrmica.

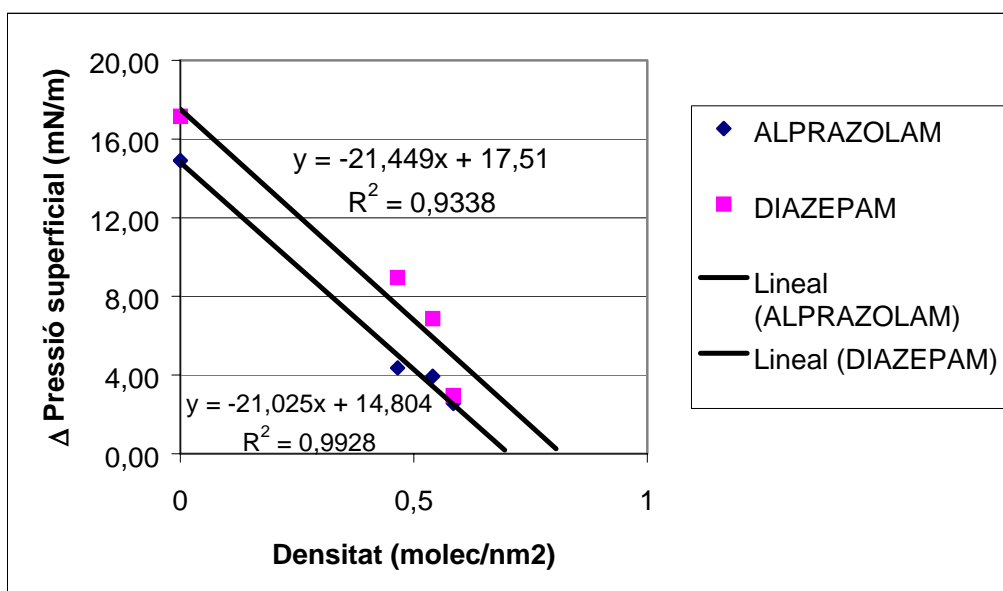


Figura 6.2: Variació de la pressió superficial en funció de la densitat inicial de fàrmac en la monocapa

6.4.2 Cinètiques de penetració a àrea constant

L'objectiu d'aquesta experiència és posar de manifest que els estudis d'interaccions entre fàrmacs i monocapes lipídiques artificials mitjançant la cinètica de penetració sobre una àrea constant és una metodologia que possibilita obtenir informació al voltant de l'activitat dels penetrants per a augmentar el flux dels principis actius a través de la pell. En el present estudi, com a substància penetrant representativa s'ha utilitzat el α -limonè degut a la seva coneguda acció sobre la desorganització reversible de l'estrat corni, facilitant el pas de substàncies a través



seu, propietat avalada per gran nombre de publicacions (Williams, 1990; Katayama, 1994). S'ha addicionat a les formulacions dels fàrmacs sotmesos a estudi, *d*-limonè a l'1% i al 5%, degut al fet que s'ha comprovat que a concentracions superiors al 5% aquest terpè no incrementa la seva activitat penetrant. D'acord amb els estudis d'activitat superficial, la concentració de fàrmac seleccionada ha estat de $6.62 \cdot 10^{-5}$ M (que equival a injectar 100 μ l d'una solució reguladora de fosfats de pH 7.4 que conté 35-36 mg de benzodiazepina per cada 3 ml), concentració lleugerament inferior a la que s'assoleix la pressió a saturació. L'elecció d'aquesta concentració és disposar d'un valor representatiu per a poder establir comparacions entre la benzodiazepina assajada en presència i absència de penetrant. També, d'acord amb els resultats de l'activitat superficial, el temps a què es sotmet el registre ($\Delta\Pi$) de la pressió superficial, la monocapa lipídica artificial DPPC ha estat de 60 min, per ser el temps més operatiu per a aquesta mètrica. Les pressions a què s'ha sotmès la monocapa han estat de 5 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, 10 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ i 20 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, per ser les que habitualment es fan servir en aquest tipus d'estudis (Sospedra, 2001).

Com a paràmetre representatiu de l'activitat del fàrmac per a travessar l'estrat corni, s'utilitza l'increment de pressió superficial ($\Delta\Pi$) que exerceix sobre la monocapa lipídica artificial la solució medicamentosa en presència de fàrmac amb o sense promotor respecte a la solució lliure. Pot interpretar-se, a nivell comparatiu, que la solució medicamentosa que presenti un major increment (Δ) de pressió superficial provocarà en el fàrmac una major capacitat intrínseca per a travessar l'estrat corni. Interpretat en el context dels estudis de penetració transdèrmica, l'increment del valor de $\Delta\Pi$ de la solució medicamentosa respecte a la solució lliure, sense fàrmac ni penetrant, estaria relacionada amb el valor de la constant de permeabilitat del fàrmac k_p contingut en la solució medicamentosa sotmesa a estudi. D'altra banda, donat que en tots els casos s'utilitza, la mateixa concentració de fàrmac, l'augment de $\Delta\Pi$ que es produeixi, és a dir l'increment de k_p , es traduirà en un augment del flux (J) del fàrmac a través de l'estrat corni a partir de la solució medicamentosa sotmesa a estudi, ja que : $J = C_0 \cdot k_p$ (Equació 4.38, pàg. 82).

El procés de penetració de les benzodiazepines en monocapes de lípids a diferents pressions superficials inicials (5, 10 i 20 mN/m) és similar al comportament observat en absència de monocapes com es pot comprovar en les Figures 5.13 a 5.18 de les pàgines 144 a 148.

Taula resum 6.7: Valors de $\Delta\Pi_{\text{màx.}}$ a cadascuna de les pressions assajades corresponents a les formulacions sotmeses a estudi referenciades en la taula			
Formulació	Increment de pressió màxima ($\Delta\Pi_{\text{màx.}}$, $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$)		
	5 ($\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$)	10 ($\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$)	20 ($\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$)
Alprazolam	4.3668±0.2333	3.9441±0.2223	2.5642±0.1388
Alprazolam amb Limonè 1%	7.9182±0.2364	4.5936±0.0291	3.2878±0.2691
Alprazolam amb Limonè 5%	16.0246 ± 0.1575	11.5151 ± 0.0252	6.800±0.001
Diazepam	8.9590±0.3930	6.6660±0.1178	2.9560±0.0001
Diazepam amb Limonè 1%	9.6346 ± 0.0174	5.29752 ± 0.0146	2.4380 ± 0,0066
Diazepam amb Limonè 5%	18.9130 ± 0.0424	15.7885 ± 0.0913	8.8226 ± 0.2387

D'acord amb els valors experimentals obtinguts per $\Delta\Pi_{\text{màx.}}$, exposats en la taula resum 6.7, per a totes les pressions assajades el valor de $\Delta\Pi_{\text{màx}}$ corresponent a la formulació que conté Diazepam és superior al que presenten les formulacions d'Alprazolam. Aquests resultats permeten deduir que el Diazepam en presència o absència de promotor, ha de presentar unes característiques intrínseques de permeació més bones que l'Alprazolam, fet que es pot comprovar a través dels valors de k_p . Efectivament, el valor de k_p del Diazepam en els estudis de permeació transdèrmica és de $k_p = 7158.92 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ i de $k_p = 623.33 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ per a l'Alprazolam (Taula 5.29 pàg 166).

D'altra banda, el *d*-limonè, a totes les pressions assajades incrementa el valor de $\Delta\Pi_{\text{màx.}}$ en el cas de l'Alprazolam i aquest augment és dependent de la concentració de terpè formulada (Taula resum 6.7). En el cas del Diazepam l'augment de $\Delta\Pi_{\text{màx.}}$ només és significatiu quan el *d*-limonè està formulat a una concentració del 5%. Aquestes conclusions poden observar-se a nivell gràfic en les Figures 6.3 i 6.4.

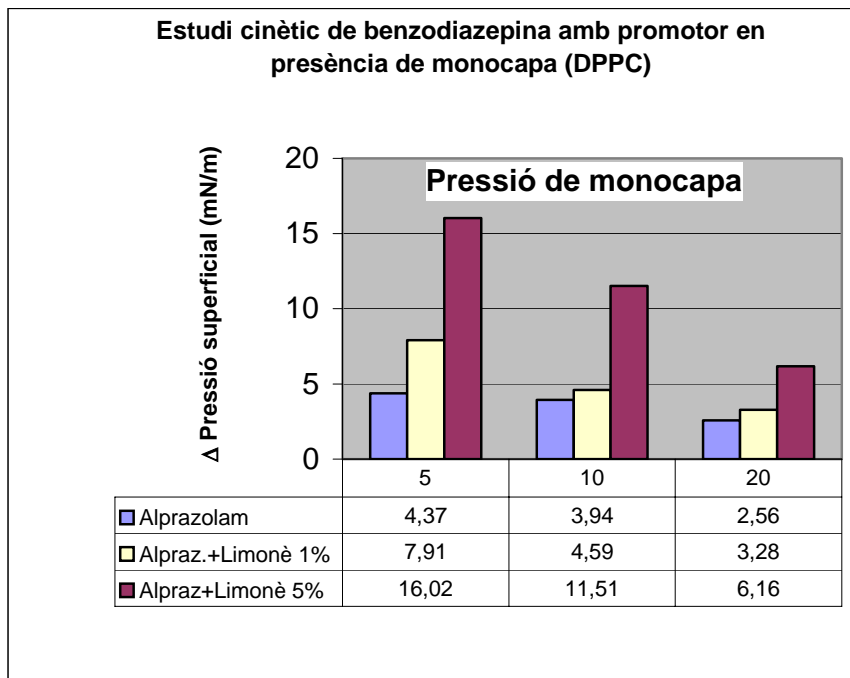


Figura 6.3: Histograma representatiu de la influència que exerceix el *d*-limonè sobre la pressió inicial de monocapa en la solució medicamentosa d'Alprazolam; s'acompanya dels valors corresponents a cadascuna de les pressions superficials assajades

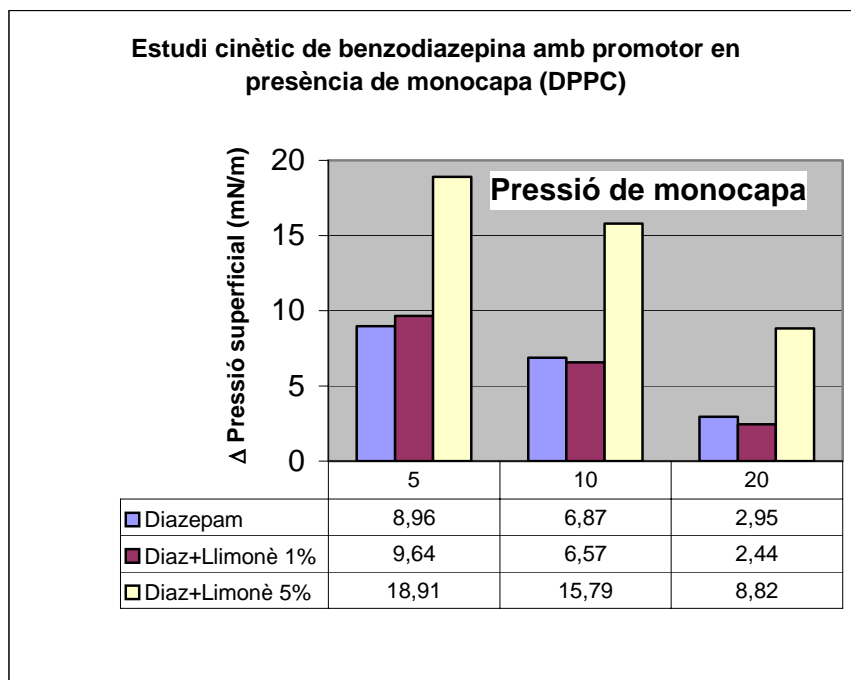


Figura 6.4: Histograma representatiu de la influència que exerceix el d-limonè sobre la pressió inicial de monocapa en la solució medicamentosa de Diazepam; s'acompanya dels valors corresponents a cadascuna de les pressions superficials assajades

D'acord amb els resultats de les figures 6.3 i 6.4, i si s'assumeix com a valor unitari l'augment d' $\Delta\Pi$ corresponent a la formulació dels fàrmacs en absència de promotor, es pot deduir l'augment relatiu d' $\Delta\Pi$ que produeix la presència en la formulació de *d*-limonè a les diferents concentracions utilitzades en cadascuna de les pressions assajades, valors que es poden consultar a les Taules resum 6.8 i 6.9. Es pot observar que l'efecte del *d*-limonè és més gran en l'Alprazolam; potser el Diazepam ja és prou hidrofòbic i potser l'addició de limonè no té tanta influència.



Taula resum 6.8: Incrementos relatius de pressió superficial deguts a la presència del *d*-limonè en la solució de fàrmac.

	Alprazolam		
Pressió monocapa	5	10	20
Fàrmac	1	1	1
Fàrmac+limonè 1%	1.8	1.2	1.3
Fàrmac+limonè 5%	3.7	2.9	2.4

Taula resum 6.9 : Incrementos relatius de pressió superficial deguts a la presència del *d*-limonè en la solució de fàrmac.

	Diazepam		
Pressió monocapa	5	10	20
Fàrmac	1	1	1
Fàrmac+limonè 1%	1.1	1.0	0.8
Fàrmac+limonè 5%	2.1	2.3	3.0

Si es considera que la pressió inicial de $20 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ és la més representativa d'una situació real (Tamm, 1986), d'acord amb els resultats exposats en les taules resum 6.8 i 6.9, la presència a la formulació d'un 5% de *d*-limonè, permet obtenir un increment de $\Delta\Pi_{\text{màx}}$ que equival a un increment de k_p de 2.4 per a l'Alprazolam i 3.0 per al Diazepam.

En un estudi realitzat per Boix (1998), aquest autor va determinar el valor de la constant de permeabilitat k_p de l'Alprazolam, formulat en una solució hidroalcohòlica, emprant cel·les de Franz i pell humana de la zona abdominal com a membrana de permeació. Aquest valor es va comparar amb la k_p obtinguda amb una solució saturada de fàrmac i en presència i absència de *d*-limonè 5%. La relació entre els valors obtinguts per k_p en presència i absència de penetrant va ser de 5.5. S'ha de tenir en compte, però, la presència d'alcohol que també actua de penetrant en la formulació, per tant es pot afirmar que la relació obtinguda és del mateix ordre que la trobada en el present treball 2.4.

Taula resum 6.10 : Valors de la concentració plasmàtica en estat d'equilibri estacionari predites (C_{ee}) considerant l'augment de flux obtingut amb el <i>d</i> -limonè					
Fàrmac	J^* ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	$\Delta'\Pi_{\text{màx.}}$ ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)	J^{**} ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	C_{ee} ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	C_t ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
Alprazolam	0.05	2.4	0.12	0.48	5-20
Diazepam	0.59	3.0	1.76	15.6	100-300
<ul style="list-style-type: none"> • J^* flux obtingut en la formulació que conté el fàrmac sol • $\Delta'\Pi_{\text{màx.}}$ increment de pressió de la formulació em presència d'un 5% de limonè • J^{**} flux del fàrmac que s'obtidria amb la presència d'un 5% de <i>d</i>-limonè en la formulació • C_t marge de concentracions terapèutiques 					

Veient els resultats obtinguts per a $\Delta'\Pi_{\text{màx}}$ a la pressió de $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ poden predefinir-se els valors de flux per als fàrmacs assajats si en la formulació s'addiciona un 5% de *d*-limonè, tal com es pot veure en la Taula resum 6.10. A partir del flux que proveiria per a cada fàrmac la presència d'un 5% de *d*-limonè i per aplicació directa de l'equació de la pàgina 85 (que considera un SAT de 16 cm^2), es pot predir la concentració plasmàtica en estat d'equilibri estacionari que s'assoliria. D'acord amb la Taula resum 6.10, la presència de *d*-limonè al 5% en la formulació, en principi, no permetria assolir per via transdèrmica concentracions terapèutiques de fàrmac.

Malgrat que, en aquest cas, l'experiència portada a terme mitjançant la metodologia de la monocapa lipídica artificial no confirma que l'acció promotora del *d*-limonè formulat al 5% sigui suficient per a predir concentracions plasmàtiques en estat d'equilibri estacionari, terapèutiques, sí que posa de manifest la utilitat d'aquesta tècnica per la selecció de penetrants o combinació d'aquests en el disseny de sistemes d'alliberament transdèrmic. L'avantatge d'aquesta tècnica és la rapidesa amb què s'obtenen els resultats, respecte a la utilització de les cel·les de Franz emprant pell humana com a membrana de permeació. Aquest avantatge temporal es tradueix en el fet que en un reduït espai de temps es poden assajar diferents penetrants a diferents concentracions o combinació de penetrants. Seleccionat el o els penetrants idonis, s'hauria de procedir a confirmar els resultats mitjançant la utilització de cel·les de Franz i pell humana com a membrana de permeació a partir d'un prototipus de SAT. Confirmats els resultats, es disposa d'informació suficient per a abordar els estudis clínics corresponents.



6.5 CORRELACIONS ENTRE PARÀMETRES DE PERMEACIÓ TRANSDÈRMICA I FÍSICO-QUÍMICS

En el present treball s'ha portat a terme un intent d'establir correlacions matemàtiques entre paràmetres transdèrmics i físico-químics corresponents als set fàrmacs de la sèrie de benzodiazepines assajades. L'objectiu d'aquest tipus de correlacions és doble: d'una banda té un sentit predictiu, és a dir, sabent els valors de les variables independents de la correlació d'una benzodiazepina no inclosa a la sèrie estudiada es pot predir el valor de k_p que presentaria. D'altra banda informa al voltant dels paràmetres físico-químics del fàrmac que influeixen en el pas a través de la pell.

En totes les correlacions assajades s'ha considerat com a variable dependent els valors obtinguts de la constant de permeabilitat (k_p), flux (J) i període de latència (T_l), així com els seus corresponents logaritmes decimals. També s'han assajat els paràmetres P_1 i P_2 . Val a dir, però, que només s'han obtingut correlacions significatives quan s'utilitza com a variable dependent la constant de permeabilitat (k_p) o el seu logaritme decimal ($\log k_p$). Aquest fet no sorprèn, ja que la majoria de correlacions publicades en el camp de la permeació transdèrmica s'obtenen considerant com a variable dependent aquest paràmetre. Com a variables independents s'han utilitzat paràmetres físico-químics i moleculars.

6.5.1 Correlacions entre paràmetres físico-químics

També s'ha intentat en aquest estudi establir correlacions entre paràmetres físico-químics de la sèrie de benzodiazepines assajades. La millor correlació obtinguda va ser:

$$\log P = - 0.83296 \cdot \log S_o - 0.00623 \cdot PF + 5.60382$$

(amb coeficient de correlació $r = 0.9767$ i l'estadístic $F=0.3464\%$)

On P i S_o són respectivament els coeficients de repartiment i les solubilitats en solució reguladora de fosfats de pH 7.4. Els valors de PF , punt de fusió, s'han pres de la bibliografia (Merck, 13th edition, 2001).

Els valors dels estadístics r i F són indicatius que la correlació és significativa. D'acord amb la Taula 5.42 (pàg. 150) es posa de manifest la bondat d'aquesta correlació. Les desviacions percentuals entre el $\log P$ experimental i el calculat mitjançant l'equació corresponent a la correlació obtinguda estan compresos entre 4.21% i -3.38%, cosa que confirma la utilitat d'aquesta equació per a una sèrie de benzodiazepines.

6.5.2 Correlacions entre paràmetres de permeació transdèrmica i físico-químics.

L'estudi d'aquest tipus de correlacions concreta que la millor equació matemàtica obtinguda és la següent:

$$\log K_p = 1.5007 \cdot \log P - 0.0171 \cdot MW + 0.00477 \cdot PF - 2.1316$$

(amb coeficient de correlació $r = 0.9844$ i l'estadístic $F=0.883\%$)

Els valors del coeficient de repartiment (P) són els valors experimentals obtinguts en el present treball i els del pes molecular (MW) i punt de fusió (PF) estan referenciats (Merck, 13th edition, 2001).

Aquesta equació correspon a la número 4 de les exposades en la Taula 5.43 (pàg. 151). Es correspon amb l'equació amb major significació de les trobades. En aquest cas la desviació percentual entre el valor de $\log k_p$ i el calculat mitjançant l'equació seleccionada per a la sèrie de benzodiazepines assajades es troba entre un 4.07% i -5.00% (Taula 5.47, pàgina 152).

Pot deduir-se, per a la sèrie de benzodiazepines estudiades, que dins de les constants físico-químiques que presenten les seves molècules, un increment en els valors del coeficient de repartiment i del punt de fusió incrementen el valor de la constant de permeabilitat de la molècula. D'altra banda, un augment en el pes molecular disminueix el valor de la constant de permeabilitat d'aquesta família de fàrmacs. També es pot comprovar que la influència del punt de fusió, dels 3 paràmetres físico-químics correlacionats, és el que té menys pes específic.

6.5.3 Correlacions entre paràmetres de permeació transdèrmica i moleculars

En aquest tipus de correlacions, l'equació que millor correlaciona aquests paràmetres és la següent:

$$\log k_p = 1.2844 \cdot \log P - 0.0074 \cdot MD - 0.01166 \cdot VM - 2.91041$$

(amb coeficient de correlació $r = 0.9379$ i l'estadístic $F=6.658\%$)

Es correspon a l'equació 4' de la Taula 5.51, pàg. 156. D'acord amb els resultats exposats en la Taula, l'equació de referència no és la que presenti els millors valors per al coeficient de correlació ($r = 0.9379$) ni el valor de F que resulta baix. És evident però que aquesta equació és la que millor aproxima els valors de



k_p teòrics als experimentals (Taula 5.55; pàg. 157). Per aquest motiu s'ha escollit com a equació representativa d'aquest tipus de correlacions per a la sèrie de benzodiazepines estudiades. Els valors de P es corresponen als coeficients de repartiment experimentals trobats per a la sèrie de benzodiazepines estudiades. Els valors del moment dipolar (MD) i del volum molecular (VM) s'han calculat d'acord amb la metodologia descrita en l'epígraf 4.7 del capítol Material i mètodes. Pot deduir-se, de l'equació seleccionada, que increments en el valors de MD i VM a les molècules que configuren la sèrie de benzodiazepines estudiades es tradueix en un menor valor de la constant de permeabilitat. S'ha de comentar també la inclusió d'un nou paràmetre molecular com el moment dipolar MD, que fins ara no s'havia tingut en compte en els estudis de paràmetres que influeixen en la determinació de la constant de permeabilitat k_p . En aquest cas la desviació percentual entre el valor de $\log k_p$ i el calculat mitjançant l'equació seleccionada per a la sèrie de benzodiazepines assajades es troba entre un 0.58% i -11.3%.

6.5.4 Correlació no lineal entre la constant de permeabilitat i el coeficient de repartiment

Tal com s'exposa en aquesta Memòria, Flynn-Stewart (1988) van publicar que, per a fàrmacs amb pes molecular superiors a 200 daltons (com succeeix amb les benzodiazepines estudiades), es presentava una correlació sigmoïdal entre el logaritme del coeficient de repartiment dels fàrmacs ($\log P$) i el logaritme de la seva constant de permeabilitat ($\log k_p$). Els autors es basen en la morfologia de la corba que uneix els punts corresponents a aquests paràmetres en una representació doble logarítmica. Malgrat que el nombre d'elements és baix ($n=7$), en el present treball s'ha ajustat una equació hiperbòlica (Equació 4.49, pàg. 88) als resultats experimentals corresponents a $\log P$ i $\log k_p$ obtinguts per a la sèrie de benzodiazepines assajades.

Taula resum 6.11: Valors de $\log k_p$ i $\log P$ obtinguts en el present estudi de permeació transdèrmica corresponent a la sèrie de benzodiazepines estudiades		
Fàrmac	$\log k_p$	$\log P$
Alprazolam	-3.18	2.15
Clobazam	-2.14	2.67
Clonazepam	-2.52	2.51
Diazepam	-1.77	2.79
Lorazepam	-3.14	2.42
Midazolam	-1.93	3.32
Pinazepam	-2.23	3.07

L'ajustament s'ha realitzat a partir dels resultats experimentals obtinguts que es poden observar en la Taula resum 6.11. La representació gràfica d'aquesta relació sigmoïdal s'exposa en la Figura 5.18 del capítol Resultats, pàg.154. La millor correlació s'obté ajustant l'equació 4.49, considerant el valor de l'exponent c . Aquesta equació presenta el millor coeficient de correlació ($r=0.9666$), així com el millor valor de F ($F=7.1130\%$). Aquests resultats permeten concloure que la correlació doble logarítmica entre el coeficient de repartiment i la constant de permeabilitat presenten, a nivell quantitatiu, una relació sigmoïdal que està d'acord amb la proposada per Flynn i Stewart.