

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA  
FARMACÉUTICA

ESTUDIOS “IN VITRO” E “IN VIVO” DE LA ABSORCIÓN  
PERCUTÁNEA DE LA BEMIPARINA: MÉTODOS DE  
VALORACIÓN

M<sup>a</sup> ÁNGELES CLARÍ PONS

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 06 de Juliol de 2004 davant un tribunal format per:

- D. N. Víctor Jiménez Torres
- D<sup>a</sup>. Marina Herráez Domínguez
- D. J. Vicente Herráez Domínguez

Va ser dirigida per:

D<sup>a</sup>. Virginia Merino Sanjuán

D. Octavio Díez Sales

D<sup>a</sup>. Alicia López Castellano

©Copyright: Servei de Publicacions  
M<sup>a</sup> Ángeles Clarí Pons

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6060-5

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

ESTUDIOS “IN VITRO” E “IN VIVO” DE LA ABSORCIÓN  
PERCUTÁNEA DE LA BEMIPARINA: MÉTODOS DE  
VALORACIÓN



M<sup>a</sup> ÁNGELES CLARÍ PONS

*Desde estas líneas quiero expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a todos aquellos que, de un modo u otro, han hecho posible que el presente trabajo, hoy, sea una realidad.*

*No hay suficientes palabras con las que agradecer a mis directores los Doctores Virginia Merino, Octavio Díez y Alicia López por la inestimable atención, colaboración y dedicación para que este trabajo saliera adelante y sobre todo por la amistad, ayuda y paciencia que me habéis tenido conmigo.*

*Gracias también a la Dra. Marina Herráez, por tu amistad y apoyo continuo, sobre todo en los momentos bajos.*

*Como no, mi gratitud al Dr. Víctor Jiménez por su ayuda incondicional, así como el reconocimiento por su continua dedicación y entrega a la profesión farmacéutica.*

*A Amparo, Juana, Pilar, gracias por vuestra amistad, por haberme escuchado en los días malos y por todos los momentos compartidos.*

*Asimismo, agradecer a mis compañeros del departamento toda la ayuda incondicional recibida.*

*Especial agradecimiento al Servicio de Farmacia del Hospital Doctor Peset de Valencia, por su contribución en el suministro de Bemiparina y por permitir realizar en su departamento de Farmacocinética parte de la valoración de las muestras, así como a todo el personal que lo compone, por la atención y ayuda prestada.*

*He de dar especialmente las gracias a mis padres, por ser para mí, ejemplo diario de trabajo y sacrificio y que junto con mi hermano y resto de mi familia me habéis apoyado día tras día y por supuesto a mi marido, Jesús, tu comprensión y apoyo, ha sido muy importante para mi.*

*A mi padre*

*A mi madre*  
*A mi hermano*  
*A Jesús*

# *Índice*

	<b><i>Página</i></b>
<b><i>Introducción y Objetivos</i></b>	7
<b><i>Capítulo 1: Antecedentes</i></b>	11
1. ESTUDIOS DE ABSORCIÓN PERCUTÁNEA	13
1.1 Estructura de la piel	13
1.1.1 Epidermis celular	14
1.1.2 Dermis	23
1.1.3 Hipodermis	24
1.2 Vías de absorción percutánea	24
1.3 Factores implicados en la absorción transdérmica	27
1.4 Modelos matemáticos de aplicación a la absorción transdérmica	31
2. HEMOSTASIA	38
2.1 Trombosis	40
3. ANTICOAGULANTES	42
3.1 Anticoagulantes orales	42
3.2 Anticoagulantes inyectables (vía subcutánea)	43
3.2.1 Heparinas de bajo peso molecular	44
3.2.2 Diferencias entre las heparinas no fraccionadas y las de bajo peso molecular	48
3.3 Novedades en terapia antitrombótica	50
3.4 Bemiparina	52

<b>Capítulo 2: Materiales y Métodos</b>	<b>57</b>
2.1 <i>ESTUDIO DE ABSORCIÓN DE BEMIPARINA</i>	59
2.1.1 <i>Ensayos de permeabilidad “in vitro”</i>	59
2.1.1.1 <i>Obtención de la membrana</i>	59
2.1.1.2 <i>Montaje del sistema</i>	60
2.1.1.3 <i>Toma de muestras</i>	61
2.1.1.4 <i>Extracción de la Bemiparina de las muestras de piel</i>	61
2.1.2 <i>Ensayos de permeabilidad “in vivo”</i>	62
2.1.2.1 <i>Preparación de los animales y administración</i>	62
2.1.2.2 <i>Absorción a las 4–8 horas post-administración</i>	64
2.1.2.3 <i>Procesado de las muestras de sangre</i>	64
2.1.2.4 <i>Procesado de las muestras de piel</i>	64
2.1.3 <i>Cuantificación de Bemiparina en las muestras</i>	64
2.1.3.1 <i>Validación del método analítico</i>	65
2.1.3.2 <i>Valoración de las muestras: determinación de la actividad anti-Xa</i>	66
2.2 <i>DETERMINACIÓN DE BEMIPARINA SÓDICA MEDIANTE CLAE</i>	69
2.2.1 <i>Determinación de Bemiparina sódica por absorción en UV</i>	69
2.2.2 <i>Determinación de Bemiparina sódica: digestión enzimática previa</i>	71
2.2.2.1 <i>Digestión enzimática</i>	71
2.2.2.2 <i>Valoración del disacárido por absorción UV</i>	73
2.2.2.1 <i>Valoración del disacárido por fluorescencia</i>	74

2.2.3 VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS MEDIANTE CLAE	78
2.3 MÉTODOS ESTADÍSTICOS	81
2.3.1 Análisis de regresión	81
2.3.2 Comparación de medias	82
2.3.2.1 Pruebas paramétricas	82
2.3.2.2 Pruebas no paramétricas	82
<b>Capítulo 3: Resultados</b>	85
3.1 ENSAYOS DE PERMEABILIDAD DE BEMIPARINA	87
3.1.1 Validación del método analítico	87
3.1.2 Estudios de absorción “ <i>in vitro</i> ”	89
3.1.3 Estudios de absorción “ <i>in vivo</i> ”	102
3.2 VALORACIÓN MEDIANTE CLAE: DETECCIÓN UV	110
3.2.1 Valoración de Bemiparina mediante absorción en ultravioleta	110
3.2.2 Valoración del disacárido mediante absorción en ultravioleta	122
3.3 VALORACIÓN DEL DISACÁRIDO POR FLUORESCENCIA	131
<b>Capítulo 4: Discusión</b>	139
4.1 ENSAYOS DE PERMEABILIDAD	141
4.1.1 Ensayos de absorción “ <i>in vitro</i> ”	141
4.1.2 Ensayos de absorción “ <i>in vivo</i> ”	145

4.2 VALORACIÓN DE BENIPARINA SÓDICA MEDIANTE CLAE: DETECCIÓN ULTRAVIOLETA	150
4.3 VALORACIÓN DE BENIPARINA SÓDICA MEDIANTE CLAE: DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA	154
<i>Resumen y Conclusiones</i>	155
<i>Bibliografía</i>	159

# *Introducción y Objetivos*

La trombosis venosa profunda (TVP) y el embolismo pulmonar (EP), son entidades clínicas de consecuencias muy serias, que responden a un proceso patológico único, denominado tromboembolismo venoso (TEV). Clásicamente, el tratamiento farmacológico del TVP ha sido realizado con heparina no fraccionada (HNF), mucopolisacárido perteneciente a la familia de los glucosaminoglucanos, de peso molecular entre 5 kD y 30 kD. Desde hace una década se han desarrollado diferentes métodos de fraccionamiento de la heparina a fin de obtener heparinas de bajo peso molecular, HBPM (3-9 kD). Todas las HBPM, debido a su elevada biodisponibilidad y a su larga semivida biológica, cuando se administran por vía subcutánea, se han mostrado igual de eficaces y más seguras que la HNF, administrada por vía intravenosa.

Por otra parte, la administración transdérmica de fármacos presenta ciertas ventajas frente a las vías convencionales, entre las que destacan la eliminación del efecto de primer paso intestinal y hepático; la eliminación de la variabilidad en la absorción y metabolismo inherente a los tratamientos por vía oral; y la posibilidad de administrar a velocidad constante medicamentos de forma no invasiva, eliminando los riesgos e inconvenientes asociados a la administración parenteral. Asimismo, en tratamientos crónicos, representa una modalidad de administración fácil y cómoda para el paciente. Sin embargo, no se puede considerar que ésta sea una vía de administración generalizable a todos los fármacos, sino que deben reunir una serie de características, poseer una elevada actividad intrínseca y además, que su paso a través de la piel transcurra de modo favorable para que las cantidades que penetran proporcionen concentraciones plasmáticas eficaces.

Para la realización de este trabajo de investigación se ha seleccionado la Bemiparina, PM medio=3.6 kD, de entre todas las HBPM existentes, para un diseño de estas características. Es decir, a priori, se piensa que el estudio puede proporcionar resultados útiles para la prevención de la enfermedad

tromboembólica, con todas las ventajas que la nueva vía de administración aportaría en este campo terapéutico (comodidad para el paciente, adherencia al tratamiento y por tanto mayor efectividad). Se ha demostrado su eficacia y seguridad, mediante ensayos clínicos controlados, para la prevención de la TVP en pacientes quirúrgicos (postoperatorios).

Con estas premisas iniciales se plantean los siguientes **objetivos**:

- Determinación de la capacidad de penetración cutánea *in vitro* e *in vivo* de Bemiparina.

- Búsqueda de métodos para la cuantificación de Bemiparina, alternativos al descrito en la Farmacopea Española 2002.

# *Capítulo 1: Antecedentes*

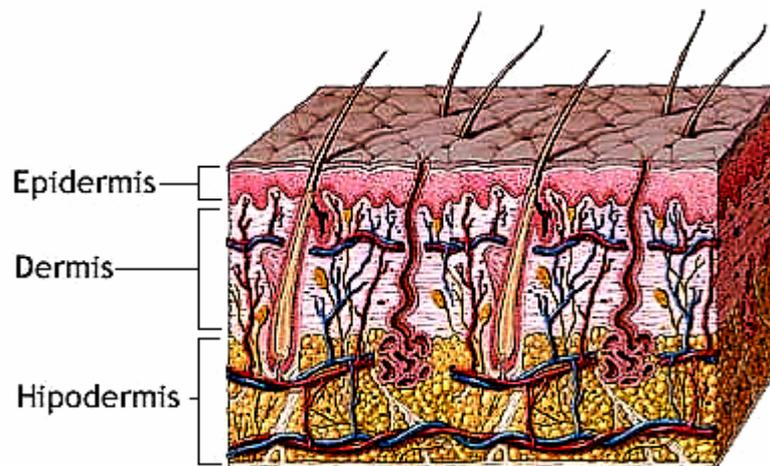
## 1. ESTUDIOS DE ABSORCIÓN PERCUTÁNEA

### 1.1 ESTRUCTURA DE LA PIEL

La piel constituye el órgano más extenso del cuerpo humano, con una superficie total de  $1.6 \text{ m}^2$  y un peso de unos 4 kilogramos aproximadamente.

Debido a su composición, las principales funciones de la piel consisten en mantener la homeostasia de los fluidos corporales evitando la evaporación excesiva de agua interna; regular la temperatura corporal mediante la constante dilatación-contracción de sus capilares; proteger al individuo de agresiones externas (muestra de ello es que la acidez del sudor secretado por las glándulas sudoríparas protege de las infecciones) y actuar como emuntorio de productos de metabolismo epidérmico, que son englobados junto con la queratina y los lípidos procedentes de la secreción sebácea.

En su compleja estructura se diferencian varias capas: epidermis, dermis e hipodermis, cada una de ellas con características propias, representadas en la figura 1.1.



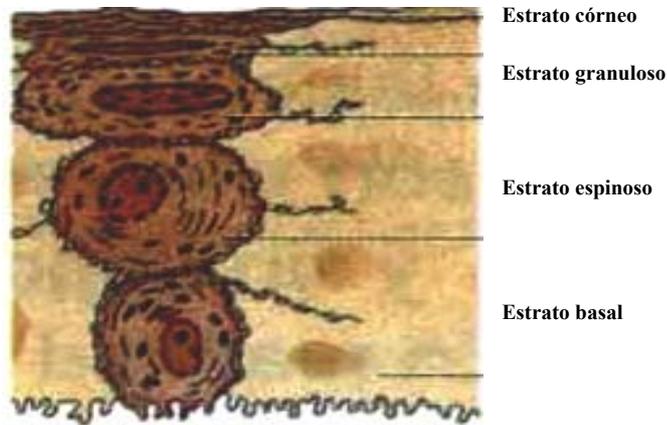
**Figura 1.1.** Detalle morfológico de la piel

### 1.1.1 EPIDERMIS CELULAR

La epidermis está formada por una masa celular compacta constituida por una serie de capas de células epiteliales afectadas por un proceso de diferenciación. Los estratos más profundos están formados por células viables, llamadas *queratinocitos*, y el estrato más superficial lo constituyen los *corneocitos*, células muertas que finalmente serán eliminadas mediante un proceso de descamación imperceptible. Los queratinocitos se caracterizan por su elevado contenido en queratina y por la práctica ausencia de agua en el reducido espacio extracelular que los rodea. Los corneocitos, muy aplanados, se distribuyen en una superposición de células más o menos ordenadas, las cuales sólo contienen, en condiciones normales, un 13% de agua. Esta cantidad de agua, aunque mínima, es necesaria para mantener la flexibilidad necesaria de toda la estructura cutánea fronteriza (*Nguyen, BC. y Kochevar, IE., 2003; Alonso, A. y col., 2003*).

Además, la epidermis contiene melanocitos, células dendríticas (*Jimbow, K. y col., 1993*), y otro tipo de células minoritarias distribuidas libremente dentro de la capa de queratinocitos, como son las células de Langerhans, importantes en los mecanismos inmunológicos (*Stingl, G. y col., 1993*) y las células de Merckel, relacionadas con la percepción sensorial.

La descamación normal de los corneocitos más superficiales requiere una renovación celular constante y controlada que tiene su origen en el estrato basal de la epidermis. El ritmo de mitosis de los queratinocitos proliferantes es decisivo para que se incorporen nuevas células a la epidermis, ya que su posterior diferenciación debe ser capaz de suplir el número de corneocitos eliminados. Esta situación supone la existencia de un equilibrio entre los tres compartimentos implicados: el proliferante, situado en la zona más profunda de la epidermis; el de las células en tránsito, sometidas a un proceso de diferenciación; y el de las células queratinizadas.



**Figura 1.2.** Estructura microscópica de la epidermis.

Por tanto, en función del grado de diferenciación celular, dentro de la epidermis se pueden distinguir varios estratos, que se describen a continuación y que aparecen esquematizados en la Figura 1.2.

- **Estrato germinativo**

El estrato basal, germinativo o proliferante se encuentra en contacto con una membrana constitutiva de la unión dermoepidérmica en la zona de separación entre la epidermis y la dermis. Las células que constituyen este estrato son indiferenciadas, es decir, carecen de marcadores bioquímicos característicos de las células más diferenciadas de las capas superiores y su proliferación está regulada por diversos factores intrínsecos o endógenos como son el factor de crecimiento epidérmico (FCE), enzimas como protein kinasas (PKC) (*Kondo, S. y col 1990; Stoica, GE. y col., 2003*), y por factores extrínsecos o exógenos como cambios de temperatura, radiaciones UV, etc, que alteran la proliferación celular (*Bowman, PD. y col., 1997; Berton, TR., y*

*col., 2001*), vitaminas, como la vitamina D<sub>3</sub> (*Mommers, JM. y col., 1999*) que interviene en la diferenciación y proliferación celular en la psoriasis; y medicamentos como la dexametasona que inhibe al factor de crecimiento epidérmico (FCE) (*Kondo, S. y col., 1990*).

Tras su proliferación las células del estrato basal ascienden para situarse en posición suprabasal, pierden su capacidad proliferativa e inician el complejo proceso de diferenciación que, finalmente, dará lugar a la queratina.

- **Estrato espinoso**

Esta capa debe su nombre a la morfología que le confiere la existencia de numerosas estructuras proteicas intra y extracelulares denominadas **desmosomas**, constituidas por diversas moléculas de adhesión que unen células adyacentes (*Jones, PH. y Watt, FM., 1993; Burge, S., 1994*).

- **Estrato granuloso**

El proceso de diferenciación de las células del estrato espinoso conduce a la formación del estrato granuloso (*Wertz, PW. y Downing, DT., 1998*). En estas células granulosas de la epidermis abundan unas estructuras ovoides bien delimitadas y de reducido tamaño que poseen un elevado contenido lipídico, denominadas **cuerpos lamelares**. Estos cuerpos lamelares contienen, además de proteínas estructurales y diversos enzimas, lípidos, de los que cabe destacar vesículas lipídicas aplanadas formadas por bicapas en contacto, constituidas por glicosilceramidas, como componente mayoritario, y acilceramidas, cuya presencia probablemente contribuya a estabilizar esta peculiar disposición.

Cuando las células epidérmicas entran en la última fase de su proceso de diferenciación se llenan además de agregados densos de contorno irregular, que

permiten identificar a las células que las contienen como pertenecientes al estrato granuloso, llamados **gránulos de queratohialina**. Estas estructuras contienen proteínas insolubles no queratínicas y aunque no se conocen todos los componentes proteicos, los más representativos se relacionan a continuación:

- *profilagrina*, proteína rica en histidina que se caracteriza por su elevado grado de fosforilación y por contener numerosas subunidades proteicas iguales, alineadas y enlazadas entre sí por segmentos de unión
- *involucrina*, proteína rica en glicina y ácido glutámico (*Marekov, LN. y Steinert, PM., 1998*)
- *loricrina*, proteína rica en cisteína, serina y glicina (*Michel, S. y col., 1998*)
- *queratolinina* (*Takahashi, M. y col., 1992*)
- *PRP*, proteína rica en prolina (*Hohl, D. y col., 1995; Greco, MA. y col., 1995; Steinert, PM. y col., 1999*).

El espacio citoplasmático de la célula granulosa se convertirá en un entramado proteico denso formado por fibras de queratina y filagrina, encargado de ensamblar las queratinas dentro del corneocito (*Dale, BA. y Holbrook, KA., 1987*). Tanto la profilagrina, precursora de las moléculas de filagrina, como la involucrina y la loricrina, destinadas a formar la envoltura proteica del corneocito, son fundamentales en la función barrera que realiza el estrato córneo.

La célula granulosa se transforma en corneocito a través de un complejo proceso que supone una transformación cualitativa y cuantitativa de los componentes proteicos y lipídicos (*Steinert, PM. y Marekov, LN., 1997*). El

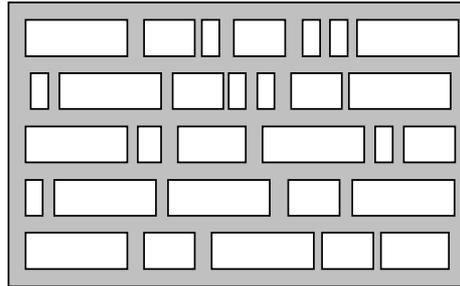
primer paso consiste en el desplazamiento de los cuerpos lamelares hacia la cara apical de la célula granulosa, fundiéndose con la membrana plasmática que posee una composición muy parecida. Esto permite además del vertido de los lípidos y proteínas almacenadas al espacio intercelular, la introducción de lípidos de membrana y de ciertas enzimas en la propia membrana plasmática (Swartzendruber, DC. y col., 1995). Uno de estas enzimas clave es la **transglutaminasa I**, especializada en la formación de enlaces covalentes entre residuos de ácido glutámico y residuos de lisina. Este enzima es necesario para la formación de envolturas proteicas propias de los corneocitos, sustituyendo la membrana plasmática de naturaleza lipídica propia de las células vivas (Nemes, Z. y col., 2000).

Los queratinocitos afectados por este proceso desconectan sus desmosomas de las células contiguas, reducen su volumen, condensan su cromatina en una zona próxima a la membrana nuclear y la fragmentan para producir pequeñas masas nucleares de tinción basófila.

- **Estrato córneo**

El estrato córneo constituye la principal barrera cutánea al paso de sustancias procedentes del medio ambiente; la eliminación de las capas más superficiales provoca un extraordinario aumento de la permeabilidad al agua (Scheuplein, R.J. y Blank, I.H., 1971) y otros compuestos (Kriwet y col., 1995). Este hecho se explica por la peculiar organización de este estrato, una estructura biológica especial muy diferente de otras barreras biológicas como las membranas celulares. La organización del estrato córneo puede simplificarse con el modelo denominado “brick and mortar” (ladrillo y cemento) (Elias, P.M. y col., 1987). Este concepto (Figura 1.3) describe la presencia de dos zonas: la primera (representada por los ladrillos), de composición fundamentalmente

proteica, corresponde a los corneocitos; la segunda representada por el cemento, corresponde a los lípidos intercelulares.



**Figura 1.3.** : Modelo “*brick and mortar*” descriptivo de la organización del estrato córneo.

El estrato córneo contiene aproximadamente un 15% de agua, 70% de proteínas y 15% de lípidos (Flynn, GL., 1990). El escaso nivel de hidratación se debe a la hidrólisis y degradación de ácidos nucleicos, proteínas, fosfolípidos y otros compuestos con capacidad higroscópica. Los niveles fisiológicos de agua (5-30%) no alteran la estructura del estrato córneo (Hou, SY. y col., 1991); por el contrario, proporciones superiores (30-40%) ocasionan un hinchamiento de los corneocitos y cambios en los lípidos intercelulares, reduciendo progresivamente la capacidad de barrera de la piel (Barry, BW., 1983).

No presenta una estructura homogénea, sino que existe un gradiente que refleja los diferentes estadios de maduración de los corneocitos que varían tanto en composición (Wertz, PW. y Downing, DT., 1998) como en la estructuración de sus capas (Chapman, SJ. y Walsh, A., 1990; Hou, SY. y col., 1991; Fartasch, M. y col., 1993). Las capas más superiores constituyen el “**stratum**

**disjunctum**”, que se encuentran en un proceso continuo de descamación, siendo sustituidas por otras nuevas procedentes del tejido epidérmico subyacente (Zanowiak, P. y Jacobs, MR., 1982). Las capas más profundas constituyen el “**stratum compactum**”, más grueso, regular y con un mayor grado de hidratación (Hou, SY. y col., 1991; Fartasch, M., 1997).

El corneocito o queratinocito es la unidad celular fundamental constituyente del estrato córneo. A diferencia de las células vivas, son delgadas laminillas poligonales carentes de citoplasma y núcleo, formadas por una estructura queratínica enlazada por diversas proteínas no queratínicas. En estas células la membrana plasmática ha sido sustituida por una estructura compleja, formada por una envoltura proteica que rodea el entramado de queratina y por una envoltura lipídica (ceramidas, fundamentalmente del tipo I y, en menor medida, ácidos grasos y  $\omega$ -hidroxiácidos) que se caracteriza por su unión covalente con la involucrina y por su marcada hidrofobicidad (Swartzendruber, DC. y col., 1987; Lazo, ND. y col., 1995; Steinert. PM. y Marekov, LN., 1997; Norlen, L. y col., 1999).

Mediante técnicas de inmunofluorescencia se ha podido comprobar que la filagrina es abundante y se distribuye homogéneamente en el estrato córneo profundo. En la zona media del estrato córneo la filagrina sufre una degradación parcial, por lo que su presencia es muy inferior. El primer paso de este proceso corresponde a la conversión enzimática de los residuos de arginina en citrulina, produciéndose la separación de las moléculas de filagrina de las fibras de queratina, lo que posibilita que las proteasas del estrato córneo degraden las moléculas de filagrina que han quedado aisladas, liberando sus aminoácidos. Algunos de estos aminoácidos sufren a su vez una transformación enzimática importante para convertirse en moléculas más hidrófilas, como el ácido pirrolidín carboxílico, la citrulina y la serina. Éstos, junto con otras moléculas como lactosa, urea, y algunos azúcares, constituyen un grupo de moléculas que

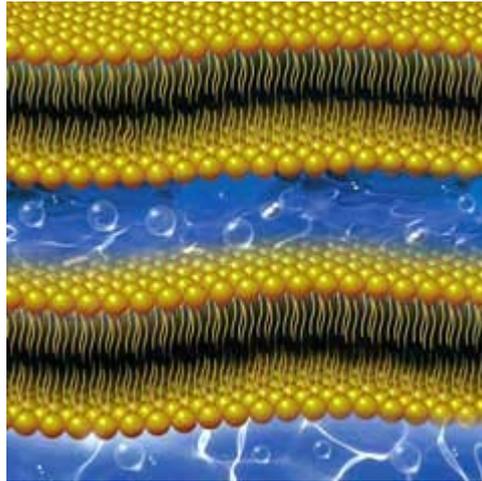
globalmente se denomina “factor hidratante natural”, responsable de que los corneocitos que ocupan una posición central en el estrato córneo sean capaces de retener una cantidad de agua mayor que el resto de corneocitos (*Yamamura, T. y Tezuka, T., 1989; Meyer, JC. y col., 1990*).

Los corneodesmosomas son otro tipo de estructura proteica encargada de la comunicación entre los distintos queratinocitos a la vez que contribuye al soporte mecánico de los mismos. Su degradación precede a la descamación (*Fartasch, M. y col., 1993*), hecho que sugiere que aún en las capas superiores del estrato córneo se mantiene una cierta actividad metabólica.

Asimismo, en la zona de transición entre la epidermis viva y el “stratum compactum” existe un gran número de enzimas involucrados en el proceso de transformación de los precursores lipídicos que darán lugar a los lípidos intercelulares (*Holleran, WM. y col., 1992; Mao-Quiang, M. y col., 1996; Mauro, T. y col., 1998*). Estos lípidos de los espacios intercelulares constituyen la única región continua del estrato córneo (*Fartasch, M. y col., 1993*) y presentan una estructura y composición diferente a los que constituyen el resto de membranas biológicas, lo que conduce a una mayor resistencia difusional (*Fartasch, M., 1997; Wertz, PW. y Downing, DT., 1998; Pouliot, R. y col., 1999*).

De acuerdo con observaciones de microscopía electrónica, los espacios intercelulares poseen unas estructuras lipídicas alargadas, dispuestas de modo constante en los espacios intercelulares, de forma paralela a la superficie cutánea, denominadas **lamelas** (Figura 1.4). Estas estructuras presentan un tipo de organización que se ha denominado **membrana o unidad de Landman** (*Madison, KC. y col., 1993*), y está formada por tres bandas transparentes a la radiación electrónica alternadas con tres bandas opacas, la primera de ellas discontinua, lo que plantea nuevas cuestiones respecto a la

homogeneidad de esta región lipídica (*Bouwstra, JA. y col., 1991, 1992, 1994, 1995, 1996*).



**Figura 1.4.** Estructura de las lamelas de los espacios intercelulares del estrato córneo.

Ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres son los lípidos mayoritarios en el estrato córneo y resultan fundamentales para la formación de la estructura lamelar característica en los espacios intercelulares. Cualquier alteración cualitativa o cuantitativa de estos lípidos puede repercutir en la eficacia de la función barrera.

El estrato córneo contiene también lípidos procedentes de la secreción sebácea (*Wertz, PW. y Downing, DT., 1991; Downing, DT. y col., 1993*). Aunque no intervienen en la formación de la estructura del estrato córneo, se ha demostrado que pueden incrementar la permeabilidad del mismo, debido a la

acción de los ácidos grasos cis-monoin saturados sobre los lípidos intercelulares del estrato córneo (*Squier, CA. y col., 1994*). Estos ácidos se han descrito como promotores de la permeabilidad cutánea, debido a la fluidificación que produce la inserción de su cadena insaturada en las estructuras ordenadas que forman dichos lípidos intercelulares (*Lewis, D. y Hadgraft, J., 1990*).

### **1.1.2 DERMIS**

La dermis se sitúa a continuación de la epidermis. Tiene un espesor muy superior al de esta última y está vascularizada. Entre ambas capas se encuentra la *unión dermoepidérmica*, que permite la adherencia entre ambas capas y actúa como soporte mecánico de la epidermis, controlando, al mismo tiempo, el paso de células y macromoléculas a la zona externa de la piel.

La dermis está compuesta principalmente por proteínas (colágeno, elastina y reticulina) y mucopolisacáridos (ácido hialurónico y dermatán sulfatos). La densa vascularización de la zona (especialmente en su parte superior), provee a los componentes del tejido cutáneo de los nutrientes necesarios. Además de las estructuras propias del tejido en la parte inferior de la dermis se originan los folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas, que atraviesan el resto de estructuras hasta la superficie cutánea.

### **1.1.3 HIPODERMIS**

La hipodermis está constituida fundamentalmente por tejido graso. Su misión fundamental es la de aislar térmica y mecánicamente al organismo. Se extiende bajo la superficie de la dermis a lo largo de todo el cuerpo, con la excepción del aparato genital masculino y los párpados. Su composición y tamaño varía con la edad, sexo, sistema endocrino y estado nutricional.

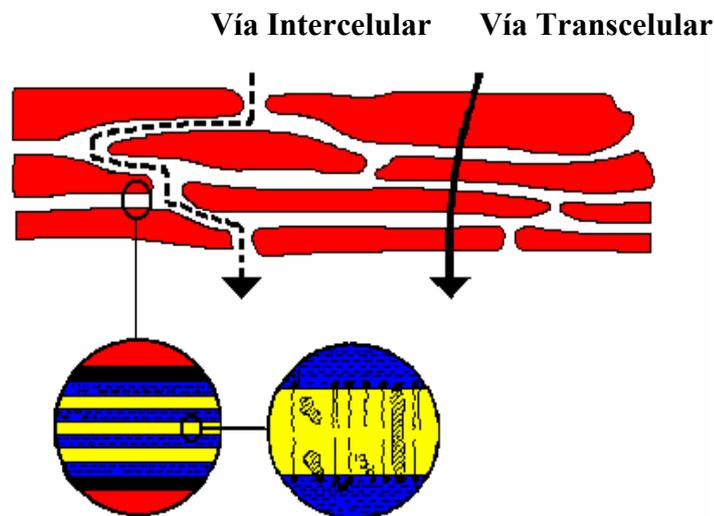
Básicamente, está compuesta por agregados de grasa y grandes cantidades de fibras de colágeno que unen de un modo flexible las estructuras inferiores de la piel con el resto del organismo.

## 1.2 VÍAS DE ABSORCIÓN PERCUTÁNEA

La absorción percutánea implica el paso de un fármaco a través de la piel hasta los capilares que irrigan la dermis, tras su liberación del sistema que lo incluye. Ya en la circulación sistémica, se distribuye por todo el organismo hasta alcanzar su lugar de acción.

El paso de sustancias a su través puede llevarse a cabo mediante varias vías que se resumen a continuación:

1. Transepidérmica (Figura 1.5):



**Figura 1.5.** Esquema de la vía transepidérmica

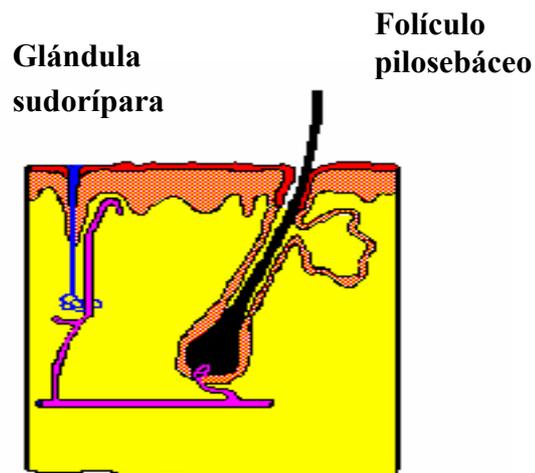
-Transcelular:

La sustancia atraviesa los queratinocitos de las distintas capas del estrato córneo, alternando estructuras hidrófilas y lipófilas.

-Interceular:

De naturaleza fundamentalmente lipídica (*Elías, PM., 1981*), actualmente se piensa que ésta es la vía mayoritaria. La sustancia difunde a través de los espacios intercelulares (*Potts, R'O. y Francoeur, ML., 1991*).

2. Transapendicular (Figura 1.6):



**Figura 1.6.** Esquema de la vía transapendicular.

-Transfolicular:

Las moléculas difunden a través de la secreción lipófila de los folículos pilosos y poros sebáceos (*Scheuplein, RJ. y Blanck., IH., 1973*).

La vía transfolicular es utilizada por moléculas cuya difusión a través del estrato córneo es muy baja, debido a su tendencia a formar enlaces con puntos activos de la queratina, reduciendo su velocidad de transporte. Moléculas grandes con algún grupo polar como los esteroides son las que más la utilizan (*Scheuplein, R.J., 1967*). Esta ruta, no obstante, constituye menos del 1% de la superficie corporal.

-Transudorípara.

Se ha visto que compuestos hidrófilos, con bajo peso molecular y algunos electrolitos (*Pinnagoda, J. y col., 1990*), difunden en el seno del líquido acuoso que contiene los conductos sudoríparos y alcanzan la base de la glándula que se encuentra en contacto con numerosos vasos sanguíneos (dermis). No obstante esta vía de penetración representa únicamente el 0.1 % de la superficie corporal.

### 1.3 FACTORES IMPLICADOS EN LA ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA

En la absorción percutánea son muchos los factores implicados, pudiéndose clasificar en dos grandes grupos:

- Factores biológicos

Están relacionados con la propia naturaleza de la piel, por lo que existe una enorme variabilidad interindividual.

La **edad**, es un factor importante a tener en cuenta, ya que se ha podido comprobar que la permeabilidad de la piel en individuos jóvenes es mayor que en edades más avanzadas (*Feldman, R.J. y Maibach, H.I., 1970*). En estudios de absorción transdérmica de fenobarbital realizados en fetos, recién nacidos y adultos, se observa que el flujo del fármaco disminuye a medida que se

incrementan las semanas de gestación y, a su vez, es mayor en recién nacidos que en adultos (*Bonima y col., 1993*).

Aunque el contenido lipídico de la piel en determinadas zonas del cuerpo es distinto en hombres y mujeres (*Cua, AB. y col., 1995*), no parece que el **sexo** sea un factor determinante en la penetración cutánea de fármacos (*Mc Cormick y Abdel Rahman, 1991*).

Del mismo modo, la **raza** también puede ser causa de diferencias en la absorción percutánea de medicamentos. De este modo, la piel de individuos de raza negra presenta una menor permeabilidad debido a la mayor densidad de la misma (*Weingand, DA. y col., 1990*).

La **zona de aplicación** resulta fundamental ya que dependiendo de la zona el espesor de estrato córneo varía, siendo éste mayor en las zonas del cuerpo expuestas a mayor roce, como las palmas de las manos y las plantas de los pies (*Treffel, P. y col., 1994*).

También tienen trascendencia importante las variaciones de **flujo sanguíneo** (*Cross, SE. y Roberts, MS., 1995*). Al aumentar el flujo sanguíneo se reduce el tiempo de permanencia de las sustancias en la dermis y aumenta el gradiente de concentración de las mismas, favoreciendo su difusión desde la superficie cutánea hacia la dermis. Cuando por alguna causa el flujo disminuye y no puede drenar la sustancia a medida que penetra, este factor se convierte en el factor limitante de la absorción del fármaco (*Barry, BW., 1983*). De esta forma la utilización de vasoconstrictores puede reducir la absorción de otras sustancias administradas conjuntamente (*Riviere, JE. y col., 1991*).

Otro factor importante, también sujeto a posibles variaciones es la **hidratación** del estrato córneo, que tiene como consecuencia un incremento en la permeabilidad, particularmente importante cuando se trata de moléculas polares (*Williams, AC. y Barry, BW., 2004; Sugibayashi, K. y col., 1992*).

como el glicerol (Nguyen BC., 2003; Fluhr JW. y col., 2003; Taylor, LJ. y col., 2003; Hara, M. y Yverkman, AS., 2003).

Un incremento de la **temperatura** de la piel también tiene como consecuencia una mayor penetración de las moléculas del fármaco, debido al aumento del coeficiente de difusión de las mismas (Chang, SK. y Riviere, JE., 1991).

Con todo, cabe recordar que determinadas **patologías** (como ocurre en algunas dermatitis, eczemas, psoriasis...) cursan con modificaciones de las propiedades de la piel y, por tanto, también ocasionan alteraciones en el grado de permeabilidad de la misma (Blank, IH., 1964). En algunas enfermedades metabólicas, como la diabetes, que originan alteraciones en las membranas basales epidérmicas y en los capilares cutáneos, la difusión de sustancias se encuentra favorecida (Braverman, IM. y Keh-Yen, A., 1984).

- Factores físicoquímicos

De los aspectos relacionados con el permeante, cabe resaltar como más relevantes en el proceso de absorción: el coeficiente de difusión, el coeficiente de reparto y, en el caso de fármacos ionizables, también debe considerarse la influencia del pH.

**Coefficiente de difusión:**

La difusión de una molécula a través de una membrana viene determinada por la resistencia que oponga el medio a su migración. Esta resistencia depende fundamentalmente de las características del penetrante, de las posibles interacciones con moléculas del vehículo o de la membrana, y de la viscosidad y de la temperatura del medio.

Si se asume que las moléculas del penetrante son similares entre sí en cuanto a tamaño, y que adoptan una conformación más o menos esférica, el

coeficiente de difusión, **D**, se puede calcular aplicando la ley de Stokes-Einstein (*Flynn, GL. y Yalkowsky, SH., 1972*):

$$D = \frac{K \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

donde **K** es la constante de Boltzman, **T** la temperatura absoluta, **r** el radio de la molécula y **η** la viscosidad del medio.

A partir de esta ecuación se puede deducir, como demuestran los estudios realizados por Marzulli, que a medida que aumenta el tamaño o peso molecular de la sustancia, la difusión tendrá lugar con una mayor dificultad (*Marzulli, FN. y col., 1965*). Sin embargo, esto no es cierto en todos los casos, ya que generalmente un incremento del peso molecular se traduce en un aumento del carácter lipófilo de la molécula, y es este factor el de mayor influencia en la capacidad de la difusión de la sustancia a través de una membrana; como demuestran los resultados obtenidos por Scheuplein para la serie homóloga de los alcoholes alifáticos (*Scheuplein, RJ. y Blank, IH., 1973*).

Por otro lado, moléculas que presentan grupos polares, como es el caso de los esteroides antiinflamatorios, pueden formar enlaces con los componentes de la membrana, que conduce a la obtención de constantes de difusión pequeñas (*Hadgraft, J., 1979*).

#### **Coefficiente de reparto:**

La lipofilia de un compuesto es un factor relevante en la absorción transdérmica del mismo.

Se trata de un parámetro de gran importancia, ya que a la hora de establecer correlaciones absorción-lipofilia, la afinidad relativa que presenta un soluto por el medio acuoso que lo rodea y la membrana cutánea marca su paso a través de la piel (*Diez, O. y col., 1993; Beetge, E. y col., 2000*).

Para la determinación del coeficiente de reparto (**P**) se recurre a un sistema bifásico, de modo que:

$$P = C_d / C_a \quad \text{Ecuación 1.2}$$

en donde  $C_d$  y  $C_a$  es la concentración de la sustancia en el disolvente orgánico y en el agua, respectivamente.

Existen estudios que demuestran que cuanto mayor lipofilia presenta el compuesto mayor será su permeabilidad a través de la piel (*Cordero, JA. y col., 1997; Modamio, P. y col., 2000*). Sin embargo, un coeficiente de reparto elevado no siempre es indicativo de una mayor permeabilidad, ya que sustancias altamente lipófilas pueden acumularse en el estrato córneo, con lo que se ve dificultada su posterior absorción (*Wepierre, J., 1967; Cross, SE. y col. 2003*).

#### **pH:**

Puesto que muchos medicamentos son ácidos y bases débiles, es importante tener en cuenta la influencia del pH, ya que la proporción en la que se encuentran ionizados depende tanto del  $pK_a$  del compuesto como del pH del líquido biológico en el que se encuentra el fármaco (*Grouthamel, WG. y col., 1971*). Se ha podido observar que la forma no ionizada de un fármaco presenta un mayor coeficiente de reparto lípido-agua que la correspondiente forma ionizada, por lo que cabría esperar una mayor permeabilidad en el estrato córneo para la fracción no ionizada.

Sin embargo, la penetración de las especies ionizadas a través de la piel es posible y, por tanto, no se puede considerar despreciable (*López, A. y col., 1996*).

#### **1.4 MODELOS MATEMÁTICOS DE APLICACIÓN A LA ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA.**

Resulta complicado establecer un modelo matemático capaz de definir, de modo general, la absorción percutánea de xenobióticos. Ello se debe a la variabilidad biológica inherente en la piel, los procesos patológicos de los que pueda verse afectada, así como otras alteraciones que puedan variar su permeabilidad (*Xu, P. y Chien, YW., 1991*).

Dado que el transporte de moléculas a través de la piel, bien a través del estrato córneo o de los órganos anexos, ocurre por difusión pasiva (*Scheuplein, R.J. y Blank, IH., 1971*) es posible aplicar las leyes de Fick para estudiar el proceso.

- **Leyes de Fick**

La difusión de compuestos apolares a través de una membrana o cualquier barrera homogénea se describe mediante la primera y segunda Ley de Fick. La primera ley, (Ecuación 1.3) indica que el flujo de un compuesto, **J**, por unidad de longitud recorrida, **x**, es proporcional al gradiente de concentración, **ΔC** y al coeficiente de difusión, **D**:

$$J = -D \frac{\Delta C}{\Delta x} \qquad \text{Ecuación 1.3}$$

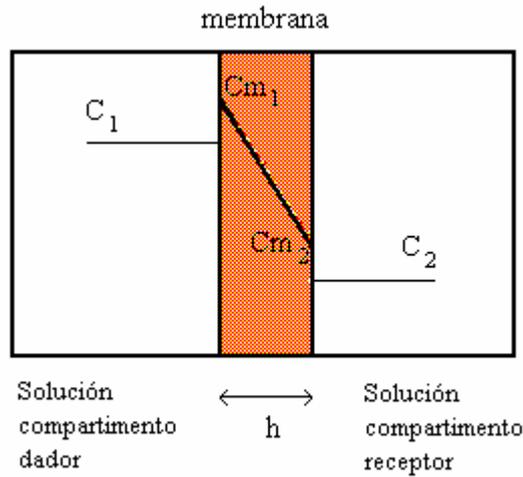
En la ecuación, el signo negativo indica que el flujo neto transcurre en dirección de mayor a menor concentración. Esta ecuación se cumple para procesos mediados por la difusión en medios isotrópicos bajo las condiciones

del estado estacionario, es decir, un gradiente de concentración constante en el interior de la membrana.

En un proceso difusional (Figura 1.7), en el cual una membrana de espesor  $h$ , separa dos compartimentos que contienen dos soluciones de un soluto de concentraciones  $C_1$  y  $C_2$ , respectivamente, en el estado estacionario de la difusión se establece un gradiente de concentración constante en el interior de la membrana. Las concentraciones del soluto en las zonas límite de la membrana, no son iguales que las concentraciones de las soluciones adyacentes a la misma. Ello es debido a que se produce un reparto preferencial del soluto en la membrana.  $C_{m1}$  y  $C_{m2}$  son las concentraciones de soluto en las interfases membrana/solución. Este reparto preferencial puede ser analizado aplicando la primera ley de Fick (Ecuación 1.3) y se puede expresar del siguiente modo:

$$J = D \cdot \frac{C_{m1} - C_{m2}}{h} \quad \text{Ecuación 1.4}$$

En los ensayos difusionales, los valores que generalmente se determinan son  $C_1$  y  $C_2$ , es decir, las concentraciones de las soluciones existentes en contacto con la membrana en los compartimentos dador y receptor, en lugar de  $C_{m1}$  y  $C_{m2}$ , que corresponden a las concentraciones de soluto existentes en las capas más superficiales de la membrana.



**Figura 1.7.** Perfil de concentraciones a través de una membrana ideal en el estado estacionario.

Por otra parte, en la mayoría de los casos, las capas superficiales de la membrana se equilibran rápidamente con las fases adyacentes. Este equilibrio puede expresarse en términos de distribución o de coeficiente de reparto, cuando las fases adyacentes son líquidas, semisólidas o sólidas mediante las siguientes relaciones de concentraciones:

$$C_{m1} = C_1 \cdot P_1 \quad \text{Ecuación.1.5}$$

$$C_{m2} = C_2 \cdot P_2 \quad \text{Ecuación 1.6}$$

en las que  $P_1$  y  $P_2$  son los coeficientes de reparto del soluto entre la membrana y las soluciones que la bañan.

Sustituyendo en la ecuación 1.4, se obtiene:

$$J = D \cdot \frac{C_1 \cdot P_1 - C_2 \cdot P_2}{h} \quad \text{Ecuación 1.7}$$

Si se consideran las soluciones de ambos compartimentos similares y de naturaleza acuosa, y la membrana homogénea:

$$P_1 \cong P_2 \cong P \quad \text{Ecuación 1.8}$$

siendo P, el coeficiente de reparto del soluto en la membrana. Simplificando la ecuación anterior:

$$J = D \cdot \frac{(C_1 - C_2) \cdot P}{h} \quad \text{Ecuación 1.9}$$

Los experimentos difusionales deben plantearse de modo que el fluido receptor permita que se cumplan las condiciones de “gradiente máximo” para el permeante. Con fines prácticos se acepta que cuando la concentración del soluto en el compartimento receptor no alcanza el 10% de su solubilidad en el medio líquido de dicho compartimento, el estado estacionario de la difusión no sufre modificaciones apreciables (*Barry, BW., 1983*). Si se cumple esta condición  $C_2$  puede considerarse despreciable, y la ecuación anterior, puede expresarse como:

$$J = \frac{D \cdot P \cdot C}{h} \quad \text{Ecuación 1.10}$$

donde C es la concentración del soluto en el compartimento dador y h la longitud del camino difusional.

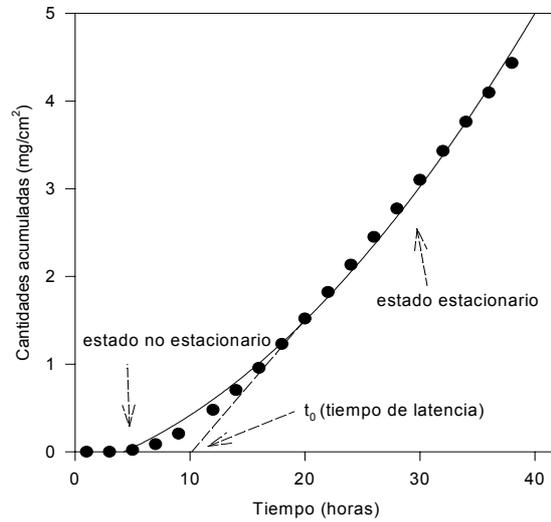
Si se considera que se ha alcanzado el *estado de equilibrio estacionario*, la cantidad de soluto que atraviesa la membrana por unidad de tiempo es

constante, lo que equivale a considerar que el fenómeno de la difusión se desarrolla de acuerdo con un proceso de orden cero. Por analogía con los procesos de cinética química la ecuación 1.10 representa, un proceso de este orden con un coeficiente de permeabilidad,  $K_p$ , que es independiente de la concentración en el compartimento dador (*Flynn, GL. y col., 1974*).

$$K_p = \frac{J}{C} = \frac{D \cdot P}{h} \quad \text{Ecuación 1.11}$$

Así, si se representa la cantidad de soluto que atraviesa una sección de membrana, de área igual a la unidad, en función el tiempo (Figura 1.8), en el estado estacionario obtenemos una línea recta, cuya pendiente es el flujo ( $J$ ), y el coeficiente de permeabilidad  $K_p$ , es un parámetro fácil de determinar a partir de dichos valores de flujo.

El período de tiempo necesario para que se alcance el estado estacionario del proceso de difusión se relaciona con el tiempo de latencia,  $t_0$ , (Figura 1.8). El tiempo de latencia se puede determinar gráficamente mediante extrapolación al eje de abcisas del tramo recto de la curva que representa las cantidades acumuladas en el compartimento receptor en función del tiempo.



**Figura 1.8.** Perfil representativo de las cantidades acumuladas en el compartimento receptor en función del tiempo.

La segunda ley de Fick permite predecir el flujo de compuestos tanto en el estado no estacionario como en el estacionario. La cantidad de fármaco ( $Q_{(t)}$ ) que aparece en el receptor a un tiempo ( $t$ ) viene dada mediante la siguiente expresión:

$$Q_{(t)} = A \cdot P \cdot h \cdot C \cdot \left[ D \cdot \frac{t}{h^2} - \frac{l}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \cdot \exp\left(\frac{-D \cdot n^2 \cdot \pi^2 \cdot t}{h^2}\right) \right] \text{ Ec.1.12}$$

donde **A** es el área de difusión, **P** es el coeficiente de reparto del fármaco entre el vehículo y la piel, **h** el espesor de la membrana, **C** la concentración inicial de principio activo en el vehículo y **D** es el coeficiente de difusión del fármaco en la piel.

Los términos  $P \cdot h$  y  $D/h^2$  son sustituidos en la ecuación 1.12 por  $P_1$  y  $P_2$ , respectivamente y calculados utilizando un programa no lineal por mínimos cuadrados (*Okamoto, R. y col., 1988*). El uso de la ecuación 1.12 mediante la regresión no lineal de las cantidades de soluto que difunden en función del tiempo, proporciona una visión global del proceso, desde el tiempo cero hasta el último punto experimental.

El coeficiente de permeabilidad ( $K_p$ ) puede ser determinado mediante la siguiente expresión:

$$K_p = P_1 \cdot P_2 \quad \text{Ecuación 1.13}$$

En la ecuación 1.12 cuando  $t \rightarrow \infty$ , se obtiene una expresión que define una línea recta, correspondiente al estado estacionario de la difusión.

$$Q_{(t)} = A \cdot P \cdot h \cdot C \cdot \left[ D \cdot \frac{t}{h^2} - \frac{l}{6} \right] \quad \text{Ecuación 1.14}$$

Por otra parte, a partir de la ecuación anterior (Ecuación 1.14), es posible determinar el periodo de latencia cuando  $Q$  es igual a cero,

$$t_0 = \frac{h^2}{6 \cdot D} \quad \text{Ecuación 1.15}$$

## 2. HEMOSTASIA

La sangre circula en un sistema cerrado de alta presión. La rotura de la integridad de este frágil lecho capilar puede ocasionar desde una lesión capilar tisular sin importancia hasta un traumatismo tisular masivo. Para minimizar y prevenir la pérdida de sangre después de la lesión tisular se activan componentes del sistema hemostático: plaquetas, células endoteliales y factores de coagulación plasmática (*Rhoades, RA. y col., 1997*).

La hemostasia (control de la hemorragia) comprende tres fases: hemostasia primaria (respuesta vascular y plaquetaria), coagulación (factores de coagulación, vía intrínseca y extrínseca) y fibrinólisis (papel de la plasmina). Puesto que el fármaco objeto de estudio actúa sobre la coagulación, la revisión bibliográfica se ha centrado en este aspecto.

La coagulación de la sangre está mediada por la activación secuencial de una serie de factores de coagulación, proteínas sintetizadas en el hígado que se encuentran en el plasma de forma inactiva. La activación secuencial de los factores de la coagulación que resulta en la conversión de fibrinógeno a fibrina se conoce como cascada de coagulación, de la que forman parte tres etapas esquematizadas en la Figura 1.9:

- Formación del activador de protrombina (factor Xa).
- Conversión de protrombina en trombina por el activador de protrombina.
- Conversión del fibrinógeno soluble en fibrina insoluble gracias a la trombina.

VÍA INTRÍNSECA

VÍA EXTRÍNSECA

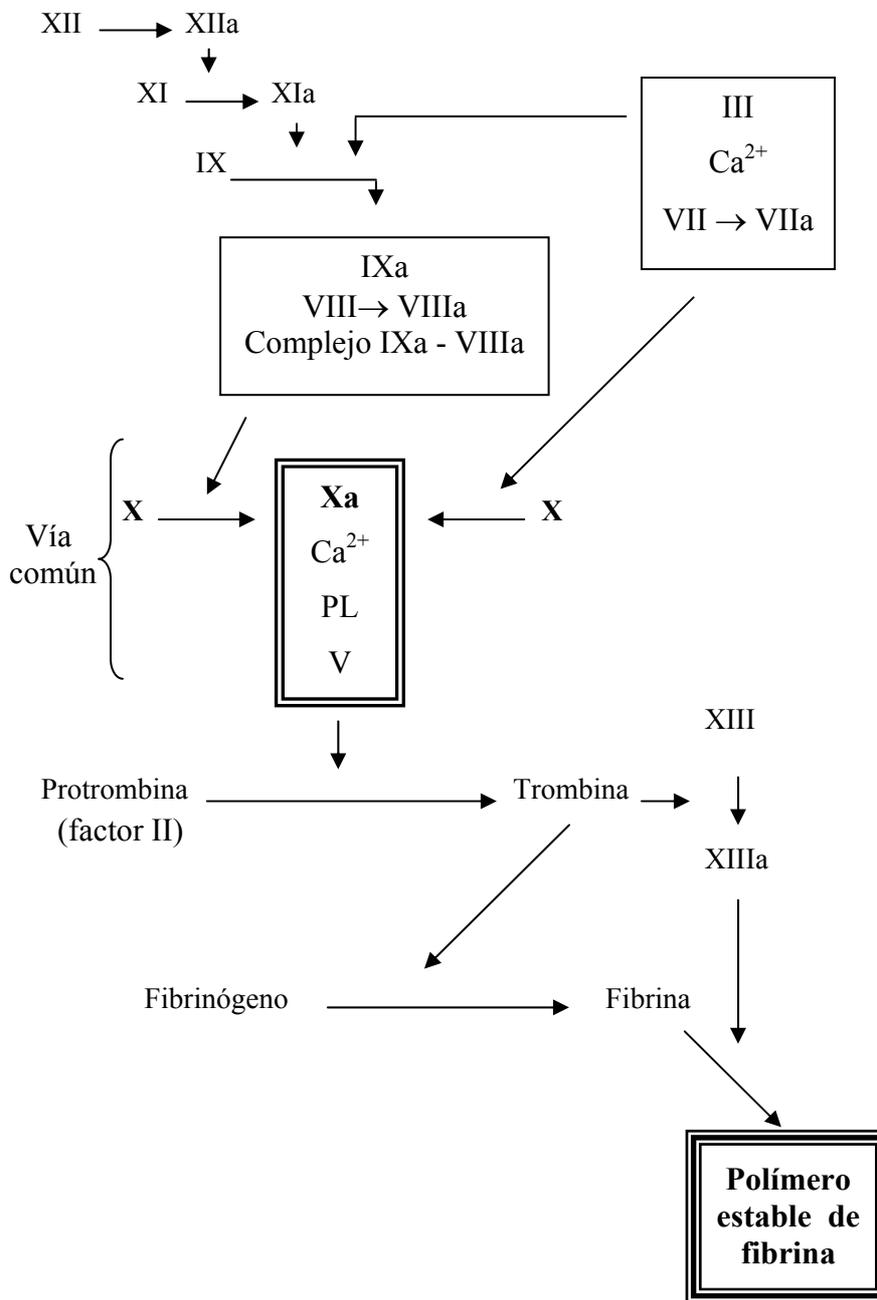


Figura 1.9. Cascada de coagulación (Ganong, WF., 2000)

Existen dos vías para la formación de trombina (Figura 1.9): vía de coagulación intrínseca y vía de coagulación extrínseca, aunque no está muy clara la frontera entre ellas en cuanto a acciones fisiológicas se refiere.

En la vía intrínseca los factores requeridos para la coagulación están presentes en la circulación y se inicia cuando una “superficie extraña” entra en contacto con componentes de la sangre, dando lugar a la formación del trombo en cuestión de minutos. La reacción inicial es la conversión del factor XII inactivo a factor XII activo (XIIa). Éste activa al factor XI, y el factor XI activo activa al factor IX. El factor IX activado forma un complejo con el factor VIII activo, el cual es activado cuando se separa del factor de Willebrand. El complejo IXa-VIIIa activa al factor X. Para la activación completa del factor X son necesarios fosfolípidos de plaquetas (PL) agregadas y  $Ca^{2+}$  (Ganong WF., 2000).

La vía extrínseca es más rápida puesto que se produce en segundos, se desencadena por la liberación y exposición de tromboplastina tisular (factor tisular de tejidos dañados, factor III); éste y el factor VII activan a los factores IX y X. (Ganong WF., 2000).

El resto es común a ambas vías, obteniéndose trombina y finalmente fibrina insoluble. Estas reacciones se aceleran por el *feedback positivo* provocado por la trombina.

## **2.1. TROMBOSIS**

La trombosis es un proceso clínico en el que los mecanismos de la hemostasia se ponen en marcha ante estímulos de carácter no fisiológico, es decir, con una finalidad no reparadora, produciendo la obstrucción coagulativa de un vaso sanguíneo. En estos casos, estímulos como una placa de ateroma, una denudación endotelial, un exceso de lípidos en sangre, etc., activan el

sistema plaquetario o el sistema plasmático de la coagulación, de forma que se inicia el proceso hemostático, pero dentro del torrente sanguíneo. En la Figura 1.10 se observa la imagen de un trombo tomada por microscopia electrónica.



**Figura 1.10.** Imagen de un trombo tomada a través de un microscopio electrónico

Asimismo, en otros casos, ciertas patologías producen una disminución de los mecanismos antitrombóticos endógenos, por lo que la balanza hemostática se inclina hacia la trombosis y es, en este caso, en el que se han de administrar los anticoagulantes.

En la trombosis venosa el trombo se forma en las venas, generalmente en la red profunda de las extremidades inferiores (trombosis venosa profunda, TVP), causada por mecanismos relacionados con la estasis sanguínea o con discrasias en la fase plasmática de coagulación (hepatopatías, toma de anticonceptivos hormonales,...). El primer elemento afectado en la hemostasia es la coagulación plasmática, siendo ésta la que secundariamente afecta a las

plaquetas. Son trombos de escasa fijación a la pared venosa, de ahí que la principal consecuencia sea su embolización hacia otro territorio venoso que generalmente, es el árbol venoso pulmonar (embolismo o embolia pulmonar, EP).

La causa más frecuente de TVP en medio hospitalario es la cirugía, siendo la general (digestiva, cirugía menor, etc.) de bajo riesgo (10 % de incidencia de TVP y 0.1 % de EP) y la traumatológica, oncológica, cerebral o cirugía que conlleve larga estancia hospitalaria de alto riesgo (40-70 % de TVP y 10 % de EP). En estos casos, la inmovilidad y la propia técnica quirúrgica, entre otros, son las causantes de estos eventos, de ahí que el esfuerzo principal se destine a su prevención.

### **3. ANTICOAGULANTES**

#### **3.1. ANTICOAGULANTES ORALES**

Los dos anticoagulantes orales disponibles en España son acenocumarol y warfarina, pertenecientes al grupo de las cumarinas, no existiendo ningún representante del menos deseable grupo de las indanodionas. Son dos medicamentos parecidos en sus características farmacocinéticas, desarrollando su acción máxima en 1-2 días, manteniéndose los efectos anticoagulantes tras dos días de la suspensión del tratamiento con acenocumarol y de dos a cinco días con warfarina.

Los anticoagulantes orales se usan en tratamientos largos. En caso de precisar acción rápida se debe comenzar el tratamiento con heparina al mismo tiempo que el derivado cumarínico y retirar después, progresivamente, la heparina. (*Catálogo de Especialidades Farmacéuticas del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacia, 2003*).

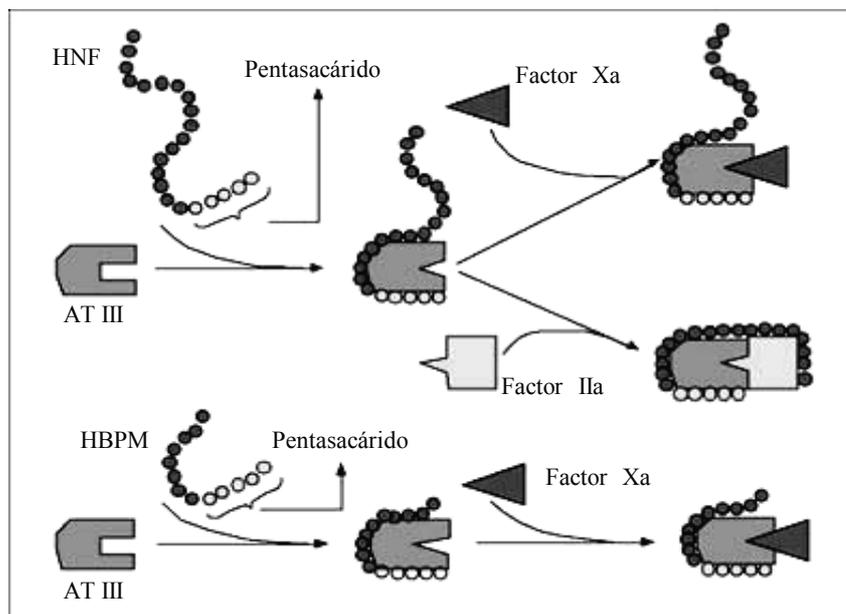
### **3.2. ANTICOAGULANTES INYECTABLES (VÍA SUBCUTÁNEA)**

A este grupo pertenecen las hirudoinas, junto con sus derivados y las heparinas. Las primeras, son un conjunto de polipéptidos de una sola cadena con diferentes aminoácidos en el extremo N-terminal, obtenidos de la saliva de la sanguijuela (*Hirudo medicinalis*). Son potentes inhibidores de la trombina, tanto de la libre como de la ligada a los coágulos, con la que forman complejos equimoleculares, lo que conduce a una inhibición directa de todas las acciones de la trombina, lo cual la diferencia de la heparina. Son poco utilizadas, dado que su principal efecto secundario es la hemorragia, de difícil manejo debido al carácter prácticamente irreversible de su unión a la trombina y a que carece de antídoto para su neutralización; no obstante, en aquellos pacientes que presenten sensibilización a heparinas (erupciones cutáneas ecematosas), caso de precisar anticoagulación urgente y a la espera de las pruebas alérgicas, las hirudoinas recombinantes pueden constituir una alternativa segura (*Vega, JM., y col., 2001*).

Las heparinas son polisacáridos sulfatados que se obtienen de pulmón de bovino o de mucosa intestinal de cerdo. Son mezclas de cadenas de diferentes longitudes y la potencia anticoagulante depende del origen animal. En la práctica estas consideraciones no son importantes porque los preparados comerciales vienen estandarizados en Unidades Internacionales.

La principal acción anticoagulante de las heparinas, tanto de la heparina no fraccionada como de las heparinas de bajo peso molecular, se debe a su unión a través de un pentasacárido, distribuido al azar entre sus cadenas, a la antitrombina III (AT III), proteasa circulante que hace aumentar 1000 veces su capacidad de inhibir a las serin-proteasas procoagulantes, factor IIa (trombina), IXa, Xa, XIa y XIIa. Pero existen diferencias en la unión de la AT III con estos factores activados. Para la unión e inhibición de la trombina se forma un

complejo ternario heparina, trombina y ATIII y la cadena heparínica ha de tener al menos 18 sacáridos, mientras que la unión con el resto de los factores activados se puede realizar sólo con la secuencia elemental pentasacárida (Figura 1.11) (Martínez, C. y col, 2000).



**Figura 1.11.** Esquema representativo de los diferentes lugares de unión de la heparina no fraccionada (HNF) y de las heparinas de bajo peso molecular (HBPM).

### 3.2.1. HEPARINAS DE BAJO PESO MOLECULAR

Las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) son sustancias heterogéneas obtenidas a partir de la heparina clásica o no fraccionada (HNF), mediante distintos métodos de despolimerización química o enzimática, consiguiéndose

productos estructuralmente diferentes y con distinta capacidad anticoagulante/antitrombótica (*Barrowcliffe TW, 1995*). En el Cuadro 1.1 se muestran los métodos de obtención de las HBPM comercializadas en nuestro país (*Fernández, A., 2002*).

<b>Métodos de obtención de las distintas HBPM</b>	
<b>Dalteparina</b>	Despolimerización con Ácido Nítrico + Cromatografía de intercambio iónico (gel filtración)
<b>Enoxaparina</b>	Benzilación + Despolimerización alcalina
<b>Nadroparina</b>	Despolimerización con Ácido Nítrico + Precipitación con etanol
<b>Tinzaparina</b>	Despolimerización enzimática con heparinasa
<b>Bemiparina</b>	Despolimerización beta eliminación en medio no acuoso

**Cuadro 1.1.** Métodos de obtención de las distintas heparinas de bajo peso molecular (HBPM).

Los fragmentos obtenidos presentan diferencias estructurales y diferente porcentaje de pesos moleculares con un ámbito entre 3.000 y 9.000 daltons, lo que supone entre 7 y 30 sacáridos, con un valor medio de 5.000 daltons (17 sacáridos). Las porciones con peso molecular entre 2.000 y 8.000 daltons se encuentran, en los preparados de HBPM, en porcentajes superiores al 60 % mientras que en la heparina no fraccionada (HNF) no representan más del 15%.

Con los conocimientos actuales no se puede relacionar el peso molecular con una mejor o peor eficacia del preparado lo que, además de ser un razonamiento simplista, no se corresponde con la eficacia clínica demostrada por los diferentes productos (*Fernández, A., 2002*).

### Mecanismos de Acción

La acción antitrombótica de las HBPM, como ocurre en la heparina clásica, no es propia de su molécula, sino que necesita la presencia de uno de los inhibidores fisiológicos más importantes de la coagulación, la antitrombina, capaz de neutralizar a diversas serín-proteasas de la coagulación y, dentro de las mismas fundamentalmente a la trombina y al factor X activado (Xa). Cuando existe heparina circulante, la antitrombina sufre un cambio en su forma que hace más accesible su centro activo lo que acelera su actividad inhibitoria de forma importante (*Hirsh, J., 1993*). La heparina se une a la antitrombina mediante un pentasacárido específico que se encuentra sólo en un tercio de las cadenas de la HNF.

La longitud de la cadena de heparina no influye en la inhibición del factor Xa, lo que importa es que exista el pentasacárido. Esta inhibición es conocida como acción antitrombótica (Figura 1.11). Por el contrario, la neutralización de la trombina requiere la formación de un complejo ternario para lo que necesitan, al menos, 18 sacáridos, lo que se denomina acción anticoagulante.

Por esto, las HBPM, con una gran proporción de cadenas de menos de 18 sacáridos, poseen una mayor capacidad de inhibición de la función anti-Xa que de la función anti-IIa, con un cociente de actividad anti-Xa / anti-IIa siempre mayor de 1, pero con diferencias entre los distintos productos (Cuadro 1.2).

	<b>Ámbito de pesos moleculares</b>	<b>% (2.000-6.000 D)</b>	<b>Relación Anti Xa / Anti IIa</b>
<b>Dalteparina</b>	2.000-9.000	56 %	2.3 : 1
<b>Enoxaparina</b>	3.000-8.000	64 %	3.3 : 1
<b>Nadroparina</b>	2.000-8.000	65 %	3.0 : 1
<b>Tinzaparina</b>	3.000-6.000	42 %	1.9 : 1
<b>Bemiparina</b>	3.000-4.200	75 %	8 : 1

**Cuadro 1.2.** HBPM: Relación de pesos moleculares y acción antitrombótica/anticoagulante

Existe la tendencia de utilizar este cociente de actividad anti-Xa/anti-IIa como hecho diferencial entre las HBPM, pero no hay evidencia que diferentes cocientes se relacionen con mayor o menor eficacia clínica (*Rosenberg, RD., 1997*).

Dado que varían los métodos utilizados para la preparación de las distintas heparinas, resulta difícil consensuar la unidad internacional a elegir. Ya que todas poseen actividad anti-Xa se ha escogido esta propiedad para definir las unidades de heparina, pero este término se halla sujeto a variaciones por el método usado en su determinación. En la práctica se debe tener en cuenta que a pesar de que se proporcionan actividades equivalentes, los productos son distintos entre sí y no pueden ser intercambiados. Es importante conocer la relación anti-Xa/anti-IIa del producto a utilizar; así esta relación es de 1 en la heparina estándar e infinito en el pentasacárido sintético. La nadroparina (Fraxiparina<sup>®</sup>) y la enoxiparina (Clexane<sup>®</sup>) poseen pesos moleculares similares (4500 D) y presentan prácticamente el mismo cociente anti-Xa/anti-IIa, aunque

difieren en el método usado para su obtención despolimerizando la heparina tradicional. Asimismo, varía su dosificación: la nadroparina cálcica se expresa en unidades propias (Choay), mientras que la enoxiparina sódica lo hace en miligramos.

Hoy día existe un estándar internacional, una Unidad Internacional (UI) anti-Xa, al que se refieren las dos heparinas según la siguiente tabla:

1 Unidad Instituto Choay (Unidades Fraxiparina) = 0.41 UI

1 mg de enoxiparina (Clexane) = 100 UI

Así se pueden asimilar las dosis a emplear de estas heparinas en tratamiento curativo de trombosis venosas al usar 150-200 UI /Kg /día. En cambio su uso en profilaxis no puede extrapolarse dado que las dosis y frecuencia de administración varía considerablemente entre los estudios utilizados para validar los resultados e indicaciones del factor Xa, diferencias en hallar un estándar y la falta de contribución de la longitud de la cadena al efecto anticoagulante.

### **3.2.2. DIFERENCIAS ENTRE LAS HEPARINAS NO FRACCIONADAS Y LAS DE BAJO PESO MOLECULAR**

Las diferencias entre las HBPM con la HNF no sólo son estructurales, sino que, al acortar sus cadenas, su carga aniónica es menos potente lo que tiene como consecuencia una menor afinidad por las proteínas plasmáticas, por la células endoteliales y por los macrófagos, afinidad que es muy intensa para la HNF, adquiriendo de esta manera nuevas e interesantes características

biológicas (Bara, L. y Samama, M., 1990; Fareed, J. y Hoppensteadt, DA., 1996).

Las cadenas cortas de heparina además de presentar una unión disminuida a proteínas plasmáticas y a proteínas de la pared vascular, se absorben mejor por vía subcutánea, y como consecuencia de ello, las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) presentan una biodisponibilidad del 90 al 96% frente al 15 – 29% de biodisponibilidad de la heparina no fraccionada (HNF).

En cuanto al metabolismo, la HNF presenta dos mecanismos de eliminación: uno rápido y saturable de unión a células endoteliales y macrófagos, y otro más lento, renal con una cinética de eliminación de primer orden, dosis dependiente. En las HBPM el metabolismo es independiente de la dosis, fundamentalmente renal, lento y prácticamente completo a las 24 horas. Su aclaramiento depende del preparado del que se trate.

El efecto antitrombótico es más eficaz y más seguro en las HBPM ya que la interacción con plaquetas, productos de la activación plaquetar y proteínas con acción en la hemostasia primaria está disminuida. Así pues, las HBPM presentan también un mayor efecto anti-Xa por la elevada concentración de cadenas de menos de 18 sacáridos.

En las HBPM, la respuesta antitrombótica es predecible cuando son utilizadas por vía subcutánea, según el peso del paciente, en una o dos dosis diarias. Además no es necesario control de laboratorio excepto en los casos de insuficiencia renal importante, obesidad mórbida y embarazo.

La menor longitud de la cadena de sacáridos de las HBPM con respecto a la HNF, hace que su carga negativa sea también menor, por lo que también presentan menor reactividad frente a las plaquetas, y como consecuencia existe una menor incidencia de trombopenia inducida por heparina.

Las complicaciones hemorrágicas de la heparina están ligadas a su acción antitrombótica y son dosis dependiente, por lo que la presencia de hemorragias mayores, con el uso de HBPM es mucho menos frecuente.

Tanto la acción de la HNF como de las HBPM se puede neutralizar con la administración de sulfato de protamina, aunque para estas últimas dicha neutralización es parcial porque la actividad anti-Xa se neutraliza sólo parcialmente.

Estudios bioquímicos confirman que las HBPM difieren en la intensidad de sus efectos antitrombóticos mediados o no por la antitrombina. Por ello han sido reconocidas como diferentes tanto por la OMS como por la FDA y por tanto no son intercambiables.

Se puede decir que en el caso del tratamiento de la enfermedad tromboembólica existen ya suficientes estudios que demuestran que las HBPM son al menos, igual de eficaces que la HNF, con mayor comodidad y seguridad (*Fernández, A., 2002*).

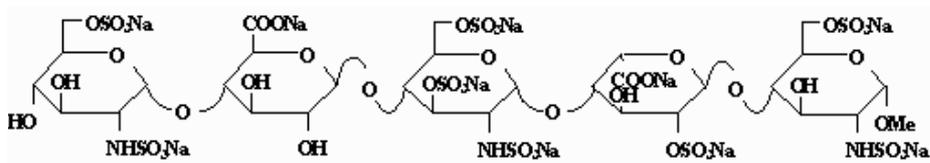
### **3.3. NOVEDADES EN TERAPIA ANTITROMBÓTICA**

Se han desarrollado derivados estrictamente sintéticos de la heparina, basados en el hecho de que la activación de la antitrombina III (AT III) por la heparina se produce mediante una secuencia específica de cinco monosacáridos de ésta, suficiente para producir un cambio estructural que aumenta la capacidad de la AT III para inactivar el factor Xa de coagulación. Así se ha desarrollado el fondaparinux, *Arixtra*® (Figura 1.12), el primero de una nueva serie de derivados de polisacáridos polisulfatados, de cadena corta (pentasacárido) y de origen completamente sintético. Tiene un peso molecular de 1728 daltons, muy inferior al de la heparina (PM. 30.000 D) y también

sustancialmente menor al de la HBPM más pequeña, la Bemiparina (PM. 3.600 D).

Actúa inhibiendo selectivamente el factor Xa de la cascada de coagulación. Su actividad antitrombótica proviene de la activación selectiva de la antitrombina III (AT III), potenciando hasta 300 veces el proceso natural de neutralización del factor Xa, el cual interrumpe la cascada de coagulación sanguínea y por tanto la formación de trombos.

Carece de efectos directos sobre la trombina y sobre la agregación plaquetaria. Tampoco ha sido relacionado con la aparición de trombocitopenia inducida por anticuerpos (*Bauer, KA y col., 2002; Keam, SJ. y Goa, KL., 2002*).



**Figura 1.12.** Fondaparinux (Arixtra®)

En fase III de investigación se encuentra el Ximelagatran (H 376/95), producto de síntesis, un nuevo inhibidor directo de trombina, que se absorbe rápidamente por vía oral y transformado en su forma activa, melagatran, que a su vez puede también administrarse por vía subcutánea. Los resultados de las investigaciones en fase II muestran una dosis-dependencia en la disminución del riesgo de tromboembolismo con administración subcutánea de melagatran inmediatamente después de la intervención, seguido de ximelagatran en el postoperatorio, confirmando que esta secuencia es efectiva y segura en la

profilaxis de la enfermedad tromboembólica (*Eriksson BI, y col., 2002*). Por otra parte, la eficacia del melagatran administrado por vía subcutánea (3 mg dos veces al día) seguido de ximelagatran por vía oral (24 mg dos veces al día) fue superior a la de la dalteparina por vía subcutánea (5000 UI una vez al día) (*Eriksson BI, y col., 2002*).

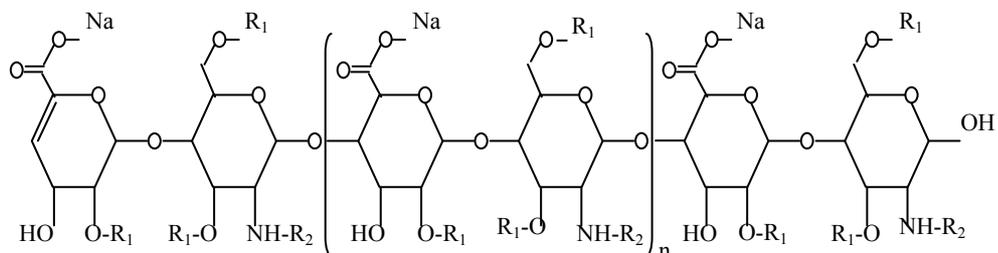
Otro profármaco, también inhibidor directo de la trombina, para administración oral, que se encuentra en fase de desarrollo clínico es el BIBR 1048 que pasa a BIBR 953 (forma activa), cuya biodisponibilidad estimada es del 5% frente al 20% que presenta el Ximelagatran (*Gustafsson, D., 2003*).

El SSR182289A es un potente y selectivo inhibidor de trombina, también en ensayo clínico, que puede ser administrado por vía oral, y que presenta buenas expectativas en la terapia antitrombótica (*Lorrain, J. y col., 2003*).

#### **3.4. BEMIPARINA**

La sustancia empleada en este trabajo de investigación ha sido la bemiparina sódica (BMP), *BEMIPARINA HIBOR*<sup>®</sup> de 3500 UI/0.2 ml, lote S-25, del Laboratorios Farmacéuticos Rovi, S.A.

Se trata de una heparina de bajo peso molecular y se obtiene por despolimerización química de la heparina de la mucosa intestinal porcina. Su peso molecular medio es de 3.600 daltons y se caracteriza por poseer un grupo 4-enopiranosil uronato no reducido final (Figura 1.13).

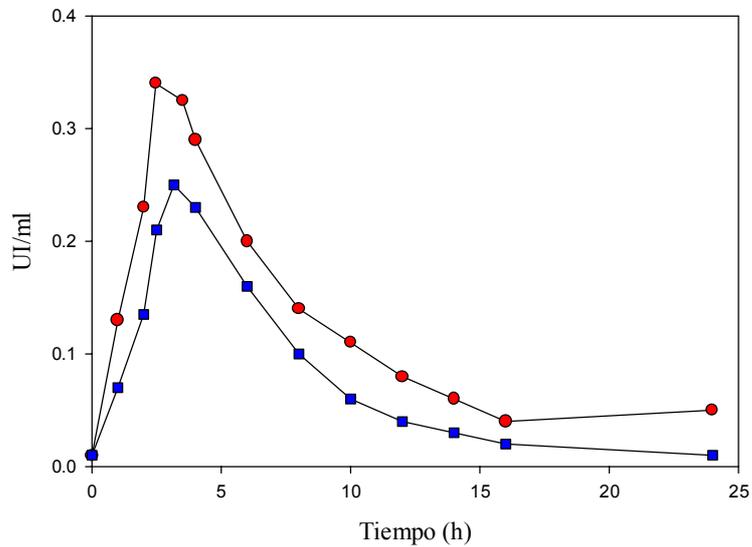


**Figura 1.13.** Estructura química de la Bemiparina  
sódica ( $n=0-12$ ;  $R_1=H$  ó  $SO_3Na$ ;  $R_2=SO_3Na$  ó  $COCH_3$ ).

*In vitro*, la actividad anti-Xa de la BMP (80-110 UI/mg) es aproximadamente ocho veces mayor que la anti-IIa (10 UI/mg) (Canovas M, y col., 1994).

La absorción de la BMP por vía subcutánea se ha determinado en ratón blanco de Nueva Zelanda. Comparada con la ruta intravenosa, la administración subcutánea a dosis de 1, 2 y 5 mg/kg revelan una biodisponibilidad del 100 % (Canovas, M. y col., 1992).

Depase, F. y col., (2003) establecieron los perfiles farmacocinéticos de dos heparinas de bajo peso molecular (Bemiparina y Tinzaparina) determinando en voluntarios sanos, el  $C_{max}$  y el  $T_{max}$ , observándose un  $T_{max}$  menor y  $C_{max}$  superior para la BMP (Figura 1.14). El mecanismo de la actividad antitrombótica de las heparinas de bajo peso molecular es complejo y multifactorial, por ello, los autores señalan que la dosis expresada como UI anti-Xa (indicada en los viales de las distintas preparaciones ensayadas) puede ser erróneamente interpretada cuando se desea predecir la respuesta terapéutica en voluntarios sanos.



**Figura 1.14.** Perfiles farmacocinéticos de la Bemiparina (●) ( $C_{\max}$ = 0.34 UI/ml;  $T_{\max}$ = 2.47 horas) y de la Tinzaparina (■) ( $C_{\max}$ = 0.25 UI/ml;  $T_{\max}$ = 3.17 horas).

#### Posología y forma de administración

Se utiliza en la prevención de la enfermedad tromboembólica en pacientes sometidos a cirugía general con riesgo moderado o a cirugía ortopédica de alto riesgo.

#### *Cirugía general (riesgo moderado de tromboembolismo venoso):*

El día de la intervención, se administran 2.500 UI anti-Xa por vía subcutánea (SC), 2 horas antes de la misma. Los días siguientes, 2.500 UI anti-Xa SC, cada 24 horas.

*Cirugía ortopédica (alto riesgo de tromboembolismo venoso):*

El día de la intervención, se administran 3.500 UI anti-Xa SC, 2 horas antes de la intervención. Los días siguientes, 3.500 UI anti-Xa SC, cada 24 horas.

El tratamiento profiláctico debe seguirse según criterio del médico, durante el período de riesgo o hasta la completa movilización del paciente.

Contraindicaciones

Está contraindicada en casos de hemorragia activa o incremento del riesgo de sangrado debido a alteraciones de la hemostasia, salvo en caso de coagulación intravascular diseminada (CID) no atribuible a una heparina; trombopenia en pacientes que presenten un test de agregación positivo in vitro en presencia de bemparina sódica; endocarditis bacteriana aguda; lesiones orgánicas susceptibles de sangrar (úlceras gastroduodenal, colitis ulcerosa,...) y accidentes vasculares cerebrales (salvo en el caso de embolia sistémica).

Reacciones adversas

Pueden producirse manifestaciones hemorrágicas, pequeños hematomas en el punto de inyección, raramente manifestaciones alérgicas cutáneas o generales. En casos excepcionales, riesgo de trombopenia.

Sobredosificación

La sobredosificación accidental puede conducir a complicaciones hemorrágicas, signo clínico mayor. El efecto anticoagulante inducido por la bemparina sódica se neutraliza con la protamina. La prolongación del tiempo de coagulación se neutraliza completamente, pero la actividad anti-Xa se neutraliza en un 25%, lo que permite la persistencia de una actividad antitrombótica. Debe administrarse 1 mg de protamina para neutralizar el efecto de 100 UI de Bemiparina. Las hemorragias menores rara vez requieren

tratamiento específico. Puesto que la protamina inhibe la hemostasia primaria solo debe utilizarse como medida de emergencia.

#### Precauciones especiales de empleo

La Bemiparina no debe administrarse por vía intramuscular.

No hay experiencia clínica disponible sobre el uso de Bemiparina en mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.

En caso de insuficiencia hepática o renal, hipertensión arterial no controlada, antecedentes de úlcera gastroduodenal o cualquier otra lesión orgánica susceptible de sangrar, en caso de enfermedad vascular de coroides y retina o anestesia espinal o epidural es necesario administrar la Bemiparina con prudencia.

En el tratamiento con heparinas de bajo peso molecular también existe la posibilidad de una trombopenia inducida por heparina, a veces de pronóstico grave. Por ello, se recomienda un control regular del recuento de plaquetas durante el tratamiento con Bemiparina. Debe considerarse este diagnóstico si aparece trombocitopenia o reducción significativa de las plaquetas (30-50%) respecto al recuento de plaquetas basal, empeoramiento de la trombosis inicial, una nueva trombosis o una coagulación intravascular diseminada durante el tratamiento con Bemiparina.

No se aconseja la asociación con: ácido acetilsalicílico y otros salicilatos, antiinflamatorios no esteroideos y ticlopidina. Todos estos medicamentos aumentan el riesgo hemorrágico ya que inhiben las funciones plaquetarias.

Es necesario tomar precauciones de empleo en asociación con: anticoagulantes orales (antagonistas de la vitamina K), glucocorticoides por vía sistémica y dextrano.

***Capítulo 2:***  
***Materiales y Métodos***

## **2.1. ESTUDIO DE ABSORCIÓN DE BEMIPARINA**

Se han llevado a cabo estudios de absorción de Bemiparina *in vitro* a través de epidermis humana e *in vivo* en rata Wistar.

Los ensayos fueron realizados a partir de cinco geles elaborados por los Laboratorios Farmacéuticos ROVI S.A. con un contenido en Bemiparina de 0.1; 0.15; 0.25; 0.5 y 1% (p/p). El resto de componentes de la formulación no fue facilitado por el laboratorio elaborador.

### **2.1.1. ENSAYOS DE PERMEABILIDAD “*IN VITRO*”**

Los ensayos de absorción percutánea *in vitro* se han realizado en epidermis humana.

#### **2.1.1.1. Obtención de la membrana**

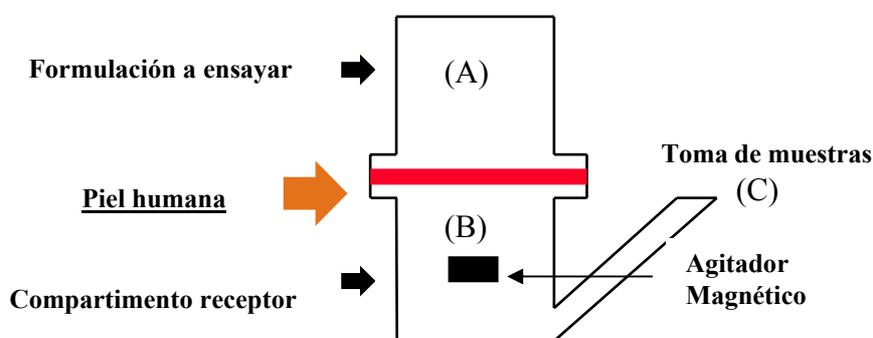
Para la realización de los ensayos de permeabilidad se ha utilizado epidermis de mama procedente de intervenciones quirúrgicas de resección. Para eliminar la dermis se procede según el método establecido por Scott (*Scott PC. y col., 1986*). La piel completa obtenida se extiende sobre una lámina de silicona con la dermis hacia arriba y se fija por medio de unas agujas dispuestas por todo su contorno. Seguidamente se introduce en el interior de un baño de agua bidestilada a 62°C durante 45 segundos. La elevada temperatura provoca un debilitamiento en las uniones existentes entre las capas dérmica y epidérmica. De este modo se favorece la posterior separación de la dermis con unas pinzas de punta fina.

La piel, ya desprovista de la dermis, se conserva a -40°C. En el momento de la realización del ensayo se introduce en solución fisiológica en una placa Petri. Aproximadamente una hora después se procede al montaje del sistema. De este modo se consigue hidratar de forma adecuada la piel.

### 2.1.1.2. Montaje del sistema

Para los ensayos de permeabilidad se ha utilizado una célula de difusión diseñada en el laboratorio y elaborada en el servicio de soporte técnico a la investigación de la Universitat de València. El material de la célula es de vidrio neutro y transparente, lo que permite detectar la posible formación de cámaras de aire, adosadas a la membrana, que reducirían la superficie útil de difusión y en consecuencia deben evitarse.

Las células (Figura 2.1) constan de dos compartimentos: el compartimento dador (A) en donde se dispone el gel, y el compartimento receptor (B) que contiene la solución receptora. La capacidad aproximada de ambos compartimentos es de 2 y 6 ml, respectivamente. El compartimento receptor posee una tubuladura (C) para realizar la toma de muestra y la reposición del volumen del líquido extraído en cada muestreo. Durante los ensayos la agitación se mantiene constante y uniforme en el compartimento receptor.



**Figura 2.1.** Esquema de una célula de difusión.

Entre ambos compartimentos se coloca la membrana, en posición horizontal, de manera que el estrato córneo quede orientado hacia el compartimento dador. El conjunto de elementos se fija con la ayuda de una pinza para evitar pérdidas de solución o de gel. La superficie útil de difusión es de  $0.79 \text{ cm}^2$ .

Una vez ensamblada la célula se procede a llenar el compartimento receptor con una solución de NaCl 0.9% (p/V).

La operación se realiza inclinando convenientemente la célula para evitar la formación de una cámara de aire en la vecindad de la membrana. Por último se depositan 200 mg del gel objeto de estudio en el compartimento dador. El compartimento dador y la tubuladura para la toma de muestras se cubren adecuadamente para evitar la evaporación. Las células se colocan en el baño a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  que se encuentra sobre un multiagitador magnético. A partir de este momento se comienza a contar el tiempo de ensayo.

#### 2.1.1.3. Toma de muestras

La duración de los ensayos fue de 8 horas. Transcurrido este tiempo se procedió a tomar la muestra del compartimento receptor de las células de difusión y se retiró la epidermis para su valoración posterior.

#### 2.1.1.4. Extracción de la Bemiparina de las muestras de piel

Para cuantificar la cantidad de Bemiparina presente en las muestras de epidermis se procedió en primer lugar a la extracción de la misma. La extracción se realizó según el método descrito a continuación.

Se preparó una solución al 1% (p/p) de HCl en agua y se adicionó 25 ml de ésta a la muestra de piel, independientemente del peso de la misma. La extracción se realizó en frascos de topacio y la agitación fue magnética. La

duración del proceso de extracción fue de 20 horas. Transcurrido este tiempo se tomó una alícuota y se filtró, primero sobre papel de filtro y en segundo lugar a través de un filtro de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro. Puesto que el pH es un factor crítico para la reacción de valoración posterior por medio de la determinación de la actividad anti-Xa, la solución resultante se neutralizó con la cantidad de NaOH 1N necesaria para aproximar el pH de la solución extractiva de carácter ácido, hacia el valor alcalino requerido en la reacción. Una vez neutralizada la solución se valoró con el método que se indica en epígrafe 2.1.2.5.

#### 2.1.2. ENSAYOS DE PERMEABILIDAD “*IN VIVO*”

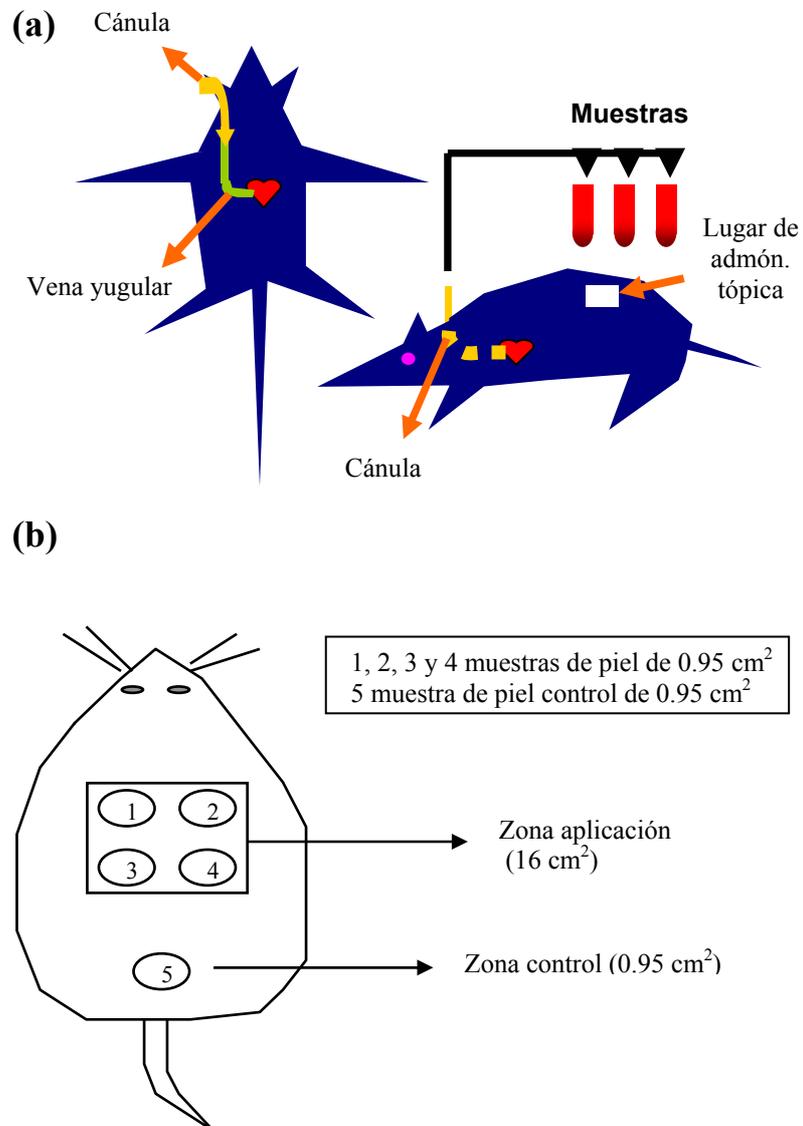
En los ensayos “*in vivo*” de absorción percutánea de Bemiparina, el animal utilizado ha sido la rata Wistar, de peso comprendido entre 260-300 g.

##### 2.1.2.1. Preparación de los animales y administración

El día anterior a la aplicación de la formulación, a los animales se les implanta mediante una técnica quirúrgica validada en el Departamento (*Torres F y col., 1996*), una cánula de silicona en la vena yugular (Figura 2.2(a)), que permitirá la toma de muestras de sangre durante la realización del ensayo. Una vez implantada la cánula se rasura una superficie ligeramente superior a 16  $\text{cm}^2$  en el lomo del animal (Figura 2.2(b)).

Finalizada la intervención, los animales permanecen “*ad libitum*”, 24 horas, hasta el momento de la administración del gel.

El día del ensayo se toma una muestra de sangre inmediatamente antes de la aplicación del gel, muestra blanco o basal. A continuación a cada animal se le aplica una cantidad conocida (800 mg) de la formulación a ensayar, en una superficie de 16  $\text{cm}^2$  de la zona dorsal y se fricciona durante un minuto.



**Figura 2.2.** Esquema de la canulación (a) y de las zonas de aplicación de gel, así como de la zona control en la parte dorsal de la rata (b).

#### 2.1.2.2. Absorción a las 4–8 horas post-administración

Transcurridas 4 y 8 horas de la aplicación del gel, se extrae una muestra de sangre. Se sacrifica el animal y se toman 4 muestras de piel, de 0.95 cm<sup>2</sup> de superficie cada una, correspondientes a la zona en la que se ha aplicado el gel. Además se toma una muestra de piel de superficie equivalente (control) de una zona dorsal del animal alejada de la zona de aplicación del gel, tal como se muestra en el esquema de la Figura 2.2(b).

#### 2.1.2.3. Procesado de las muestras de sangre

Las muestras de sangre se recogen en tubos que contienen citrato sódico 3.8% y se centrifugan 5 min a 6000 rpm. Se separa el plasma y se conserva a -40 °C hasta su valoración (no más de tres meses).

#### 2.1.2.4. Procesado de las muestras de piel

Las muestras de piel se someten al proceso de extracción en medio ácido descrito en el epígrafe 2.1.1.4 y se conservan a 4 °C. Posteriormente se valoran las muestras de la zona de aplicación y la muestra control.

#### 2.1.3. Cuantificación de Bemiparina en las muestras

Para calcular las cantidades de Bemiparina en los ensayos *in vitro*, (en la epidermis y en el compartimento receptor) e *in vivo* (plasma y epidermis) se utilizó un método *in vitro* que valora la inhibición del factor Xa por parte de la antitrombina III (ensayo anti-Xa), con la técnica puesta a punto por los Laboratorios Farmacéuticos ROVI S.A., adaptada de la Real Farmacopea Española (*Heparinas de bajo peso molecular, Real Farmacopea Española, 2002*).

En este ensayo se preparan dos series independientes, de cuatro diluciones cada una, a partir de la preparación de referencia de la heparina de baja masa molecular (103.6 UI anti-Xa/ml), de forma que el ámbito de concentraciones sea 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 UI anti-Xa/ml, ya que es en este ámbito de concentraciones donde se observa una relación lineal entre la absorbancia y el logaritmo de la concentración. La preparación de referencia o estándar es una heparina de baja masa molecular para ensayo, BRP, calibrada en Unidades Internacionales anti-Xa por comparación con un Patrón Internacional.

Con objeto de determinar la concentración en UI anti-Xa/ml de las muestras es necesario trabajar en un ámbito de concentraciones similar al anterior. En el caso de las muestras a ensayar o problemas, es difícil conseguir ese intervalo de concentraciones, porque se desconoce la concentración de Bemiparina. Así pues, para valorar las muestras generadas en nuestros ensayos, se prepararon las diluciones convenientes, y se asumió que el primer tubo a valorar contenía alrededor de 0.2 UI anti-Xa/ml, a partir de él se prepararon tres diluciones de concentraciones teóricas 0.1, 0.05 y 0.025 UI anti-Xa/ml.

Para determinar la concentración de Bemiparina en las muestras, se supone que la concentración es de 0.2 UI anti-Xa/ml, pero esta concentración supuesta puede coincidir o no con la que existe realmente en las muestras de partida. Cuando la concentración supuesta se aleja de la real, las diluciones de la muestra también se alejan del intervalo en el cual la absorbancia y el logaritmo de la concentración presentan una relación lineal. Por este motivo, para el tratamiento de los datos generados en la valoración se llevó a cabo un ajustado conjunto mediante las ecuaciones 2.1 y 2.2 que se detallan a continuación. La ecuación 2.1 se ajustó a los valores de absorbancia obtenidos para el estándar y la ecuación 2.2 a los valores de absorbancia obtenidos para el problema.

$$A = A_0 - \frac{A_0 \cdot c^b}{c_{50}^b + c^b}$$

Ecuación 2.1

$$A = A_0 - \frac{A_0 \cdot (c \cdot h)^b}{c_{50}^b + (c \cdot h)^b}$$

Ecuación 2.2

En estas ecuaciones, **A** es la absorbancia experimental, **A<sub>0</sub>** es la absorbancia cuando la concentración de heparina es cero, **b** es el coeficiente de Hill (este coeficiente es representativo de la facilidad con que las moléculas de fármaco se unen al sustrato cuando ya se ha unido la primera molécula), **C<sub>50</sub>** es la concentración de heparina necesaria para que la absorbancia sea el 50% de **A<sub>0</sub>** y **h** es el factor por el cual hay que multiplicar la concentración de partida supuesta (0.2 UI anti-Xa/ml) para obtener la real. El programa informático utilizado para estos ajustados ha sido el SIGMAPLOT 2000.

#### 2.1.3.1. Validación del método analítico

Para asegurar la calidad de los resultados, se ha determinado, en primer lugar la exactitud y precisión del método analítico empleando tres patrones de concentración conocida: 0.35, 0.035y 0.0175 UI/ml, respectivamente.

La *precisión* se expresa a través del coeficiente de variación de la media de las concentraciones estimadas, tanto en los ensayos intradía como en los realizados en días distintos.

La *exactitud* viene dada por el error relativo de la media, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$E_r(\%) = \frac{x_i - \hat{x}_i}{\hat{x}_i} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Donde  $x_i$  es la concentración teórica, y  $\hat{x}_i$  es la concentración estimada del patrón.

#### 2.1.3.2. Valoración de las muestras: determinación de la actividad anti-Xa

Como se ha indicado anteriormente, para valorar las muestras generadas en nuestros ensayos, se prepararon las diluciones convenientes, y se asumió que el primer tubo a valorar contenía alrededor de 0.2 UI anti-Xa/ml, a partir de él se prepararon tres diluciones de concentraciones teóricas 0.1, 0.05 y 0.025 UI anti-Xa/ml.

Junto con cada batería de tubos se valora un blanco que en lugar de Bemiparina contiene el mismo volumen de tampón de pH 8.4 que las soluciones a valorar.

Para realizar la determinación de la actividad anti-Xa son necesarios los siguientes reactivos: Tampón de pH 8.4, Antitrombina III, Factor Xa, Sustrato 2222, de los que obtendremos las soluciones de trabajo. Estas soluciones se detallan a continuación.

Tampón de pH 8.4: Es una disolución acuosa que contiene 6.057 g/l de tris(hidroximetil)aminometano, 2.192 g/l de EDTA ácido y 9.935 g/l de NaCl. Una vez adicionados los reactivos se ajusta el pH a 8.4 si es necesario con ácido clorhídrico.

El vial de antitrombina III (Chromogenix AB) que contiene 10 UI, se reconstituye con 1 mililitro de agua desionizada. Para preparar la solución de trabajo una alícuota de 0.4 ml se diluye hasta 10 ml con el tampón de pH 8.4 obtenido anteriormente.

Para obtener la solución de trabajo del factor Xa (Chromogenix AB) se reconstituye el vial, de 25 mg, con 10 mililitros de agua desionizada.

El sustrato S-2222 (Chromogenix AB), 25 mg por vial, es diluido con 16.6 mililitros de agua desionizada. La solución de trabajo se obtiene al hacer una dilución 50:50 con agua bidestilada de cada alícuota.

A continuación, se realiza la reacción colorimétrica para cada uno de los tubos de ensayo anteriores, para posteriormente valorar por espectrofotometría de absorción UV-VIS, a una longitud de onda de 405 nm, en un espectrofotómetro modelo U-2000 (HITACHI). Es importante que las cantidades añadidas de cada uno de los reactivos sean exactas así como que todo el ensayo se realice a una temperatura constante de 37 °C, de ahí que los tubos de ensayo se dispongan dentro de un incubador a esta temperatura. La metodología a seguir se detalla a continuación:

1. Se parte de 100 µl de muestra (bien patrón, bien solución problema), que se atemperan a 37 °C.
2. A cada uno de los tubos se le añade 100 µl de antitrombina III (AT III) y se incuba 120 segundos.
3. Se adicionan otros 100 µl de factor Xa y se espera 30 segundos más.
4. A continuación se adicionan 200 µl de sustrato (S-2222) y se deja reaccionar durante 180 segundos.
5. Por último, para detener la reacción se añaden 300 µl de ácido acético glacial.

## **2.2. DETERMINACIÓN DE BEMIPARINA SÓDICA MEDIANTE CLAE**

Como alternativa a la cuantificación de Bemiparina sódica mediante la determinación de la actividad anti Xa de las muestras se han desarrollado dos métodos cromatográficos. El primero de ellos consiste en la valoración directa de la Bemiparina por espectrometría de absorción en ultravioleta. El segundo se basa en la valoración de uno de los disacáridos ( $\alpha$ - $\delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 4]-GlcNAc (PM.= 401.3 D)) obtenido a partir de la digestión de la Bemiparina. Los métodos propuestos se describen en los siguientes epígrafes. Una vez puestos a punto estos métodos se ha procedido a su validación por medio de la determinación de los parámetros que se detallan en el epígrafe 2. 3.

### **2.2.1. DETERMINACIÓN DE BEMIPARINA SÓDICA POR ABSORCIÓN EN UV**

Con este método de valoración se determina la Bemiparina sódica mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAE) en fase reversa y detección por ultravioleta.

#### ***Elementos cromatográficos***

El equipo utilizado consta de:

- bomba isocrática Waters 1515
- inyector automático Perkin-Elmer
- detector UV Waters, modelo 2487, Dual  $\lambda$  Absorbance Detector
- equipo GPC Software Breeze Waters

Las condiciones cromatográficas empleadas se detallan a continuación:

- fase móvil: agua bidestilada a pH 3, acidificada con ácido acético glacial
- flujo: 1 ml/minuto
- volumen de inyección: 100 microlitros
- longitud de onda ( $\lambda$ ): 232 nm

La fase estacionaria consta de:

- Columna “ $\mu$ bondapak” de 300 mm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno, rellena de gel de sílice silanizado con radicales alifáticos de 18 átomos de carbono, con un tamaño de partícula de 10  $\mu$ m y 125 Å de tamaño de poro.

- Precolumna “Tecnokroma”, con 2 filtros de 2  $\mu$ m de poro y un relleno pelicular análogo al de la columna pero con un tamaño de partícula de 40  $\mu$ m. Su función es la de proteger la columna de las partículas de mayor tamaño.

La fase móvil, antes de su uso, se hace pasar a través de un filtro “Millipore GVWP” de 0.22  $\mu$ m de diámetro de poro, con ayuda de un dispositivo de filtración de vacío. Esta operación permite desgasificarla y eliminar la presencia de partículas sólidas susceptibles de dañar la columna.

En estas condiciones el tiempo de retención de la Bemiparina es de 3.7 minutos.

#### ***Preparación de las muestras***

A partir de una jeringuilla de Bemiparina sódica Hibor® de 3500 UI/0.2 ml se preparan soluciones de concentración: 0.0125, 0.025, 0.05, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 y 12.8 UI/ml, por dilución con agua bidestilada.

## **2.2.2. DETERMINACIÓN DE BEMIPARINA: DIGESTIÓN ENZIMÁTICA PREVIA**

La digestión enzimática de la BMP genera, entre otros, el disacárido  $\alpha$ - $\delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 4]-GlcNAc. Este disacárido seleccionado se valoró directamente por UV. Paralelamente, se decidió valorar este compuesto por fluorescencia. Dado que por sí solo no emite fluorescencia, para su análisis se ha de formar un complejo que presente esta característica y para ello se procedió a una reacción de derivatización, siguiendo los pasos que se indican en el epígrafe 2.2.2.3.

Para la digestión enzimática y posterior reacción de derivatización del producto obtenido se ha seguido el método propuesto por Toyoda, H. y col (*Toyoda, H. y col, 1997*).

### 2.2.2.1. Digestión enzimática

#### ***Muestras de Bemiparina***

Partiendo de la jeringuilla de Bemiparina de 3500 UI/0.2 ml se preparan las siguientes diluciones con agua bidestilada: 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 25 y 50 UI/ml.

#### ***Enzimas utilizadas***

Por encontrarse liofilizadas, las distintas heparinasas empleadas (enzimas liasas), obtenidas de laboratorios SIGMA, han de ser reconstituidas, cada una de ellas, con un volumen determinado de agua bidestilada:

- Heparin liasa I (50mU), se reconstituye con 250  $\mu$ l
- Heparin liasa II (10 mU), se reconstituye con 125  $\mu$ l
- Heparin liasa III (5 mU), se reconstituye con 125  $\mu$ l

### ***Soluciones de trabajo***

Para su elaboración se procede del modo siguiente:

- *Solución A:*

Acetato sódico trihidratado ---13.61 g

Agua bidestilada c.s.p. ----- 1000 ml

- *Solución B:*

Acético glacial ----- 3 g

Agua bidestilada c.s.p. ----- 500 ml

- *Solución C:*

900 ml de la *solución A* más 100 ml de  
la *solución B*

- *Tampón acetato (pH 7):*

Acetato cálcico ----- 1.76 g

Solución C c.s.p. ----- 1000 ml

Se ajusta el pH de la solución tamponada a 7.00 con NaOH 1 N.

### ***Digestión***

Para la realización de la digestión propiamente dicha, en viales de 100  $\mu$ l de capacidad se colocan los siguientes componentes:

- 10  $\mu$ l de muestra (dilución Bemiparina)
- 10  $\mu$ l de tampón acetato (pH 7)
- 20  $\mu$ l de Heparin liasa I (4 mU)

- 5 µl de Heparin liasa II (0.4 mU)
- 5 µl de Heparin liasa III (0.4 mU)

Estos viales se llevan a incubación en estufa a 37°C durante 12 horas. Después se congelan (-40°C) con el fin de detener la reacción enzimática. Se mantienen en estas condiciones hasta su posterior valoración.

#### **2.2.2.2. VALORACIÓN DEL DISACÁRIDO POR ABSORCIÓN UV**

El disacárido, producto de la digestión de Bemiparina, se valoró a partir de los valores de absorbancia en ultravioleta.

##### ***Elementos cromatográficos***

El equipo utilizado es el descrito en el Epígrafe 2.2.1.

Las condiciones cromatográficas empleadas se detallan a continuación:

- fase móvil: agua bidestilada (pH 6)
- flujo: 1 ml/minuto
- volumen de inyección: 40 microlitros
- longitud de onda ( $\lambda$ ): 232 nm

La fase estacionaria se ha descrito en el Epígrafe 2.2.1.

En estas condiciones el tiempo de retención del disacárido es de 1.9 minutos.

### *Validación del método analítico*

Previamente a la valoración de las muestras digeridas de Bemiparina se validó el método analítico. Para ello se valoraron cuatro rectas preparadas a partir del disacárido patrón  $\alpha$ - $\delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 4]-GlcNAc, de los laboratorios Sigma. Cada recta consta de 6 puntos correspondientes a las concentraciones de disacárido siguientes: 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05 y 0.01  $\mu$ g/ml.

Los parámetros empleados para la validación se describen en el epígrafe 2.2.3.

### **2.2.2.3. VALORACIÓN DEL DISACÁRIDO POR FLUORESCENCIA**

El disacárido, producto de la digestión enzimática de la Bemiparina, se valoró mediante detección por fluorescencia.

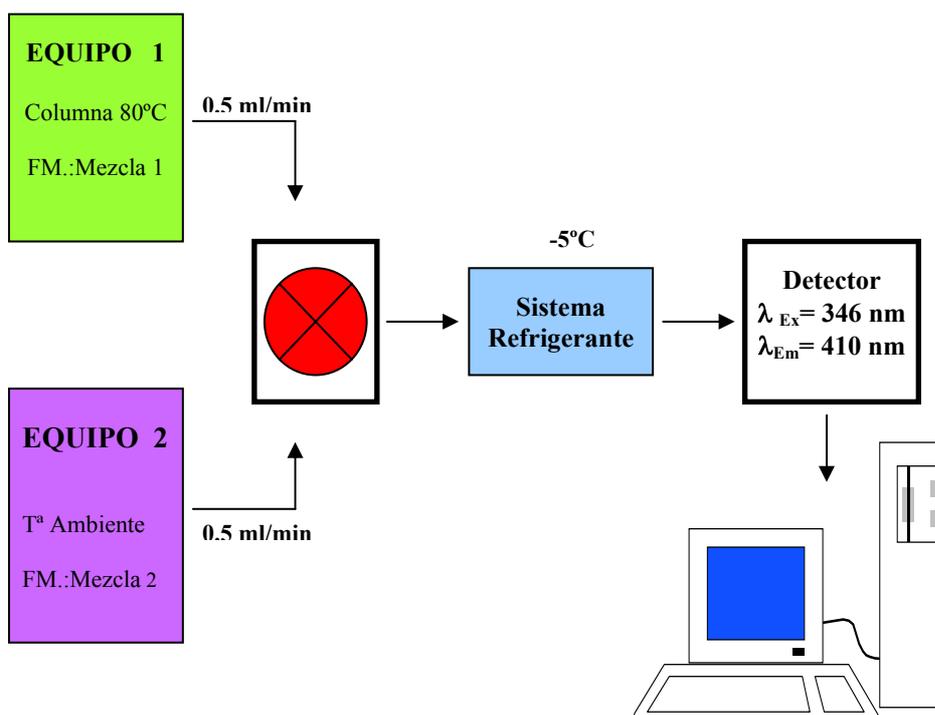
#### *Equipos cromatográficos*

El equipo empleado consta de los siguientes componentes:

- Dos bombas cuaternarias HP Series 1100 G1311A
- Inyector automático HP Series 1100 G1313A
- Detector fluorescencia Agilent Series 1100
- Equipo Software HP Chemstation, versión A.06.01
- Horno Análisis Vínicos, modelo Estela-01

### *Determinación analítica*

Se dispone de dos equipos, 1 y 2, funcionando simultáneamente (Figura 2.3), y conectados a un horno a 110 °C en el cual se encuentra un bucle de acero inoxidable de 10 m de longitud y 0.5 mm de diámetro interno. La salida de éste se encuentra conectada al sistema refrigerante y finalmente al detector de fluorescencia (longitud onda de Excitación: 346 nm; longitud de onda de Emisión: 410 nm). En el Equipo 1 se dispone la columna empleada (TSK gel Amide-80 de 150 mm de longitud por 2 mm de diámetro) a la temperatura de 80°C.



**Figura 2.3.** Esquema del sistema empleado para la valoración de las muestras de BMP mediante fluorescencia.

En el horno, la fase móvil 1 (0.5ml/min) junto con la muestra procedente del Equipo 1, se encontrará con la fase móvil 2 del Equipo 2 (0.5 ml/min).

Dentro del horno tiene lugar la reacción de derivatización, produciéndose el complejo fluorescente que será determinado por fluorescencia. Tras la salida del horno y previa a la entrada en el detector la muestra debe enfriarse en el sistema refrigerante ( $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Figura 2.3).

- **Preparación de la fase móvil 1:**

- a) Solución tamponada de pH 7

Esta solución reguladora de fosfatos se prepara a partir de soluciones de fosfato monopotásico 1/15 M ( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ ) (Solución A) y fosfato monosódico dihidratado 1/15 M ( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Solución B).

-Solución A:

fosfato monopotásico ----- 9.073 g

agua bidestilada c.s.p. ----- 1000 ml

-Solución B:

fosfato monosódico dihidratado ----- 11.87 g

agua bidestilada c.s.p. ----- 1000 ml

La composición final de la solución tamponada es de 200 ml de Solución A más 800 ml de Solución B.

b) Cloruro de amonio (3M)

NH<sub>4</sub>Cl ----- 160.47 g

Agua bidestilada c.s.p. ---- 1000 ml

La composición final de la fase móvil 1 es una mezcla de Acetonitrilo:  
Agua: Solución tamponada de pH=7 : Cloruro de amonio 3M (32:10:1:1).

• **Preparación de la fase móvil 2:**

Está formada por una mezcla de Cyanoacetamida (1%) y NaOH 0.5M  
(50:50).

Cyanoacetamida ----- 1 g

Agua bidestilada c.s.p. ----- 100 ml

Hidróxido sódico ----- 2 g

Agua bidestilada c.s.p.---- 100 ml

El tiempo de retención para el disacárido en estas condiciones es de 3.5 minutos.

**Validación del método analítico**

Previamente a la valoración de las muestras digeridas de Bemiparina se validó el método analítico. Para ello se valoraron tres rectas preparadas a partir del disacárido patrón  $\alpha$ - $\delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 4]-GlcNAc, (laboratorios Sigma). Cada recta

consta de 6 puntos correspondientes a las siguientes concentraciones de disacárido: 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05 y 0.01 µg/ml.

Los parámetros empleados para la validación se describen en el epígrafe siguiente.

### **2.2.3. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS MEDIANTE CLAE**

El análisis mediante regresión lineal permite estimar de una forma rápida la calidad del calibrado de los métodos cromatográficos empleados. A partir de este análisis es posible deducir los parámetros que determinan la linealidad, sensibilidad y precisión de cada método analítico e incluso estimar de forma aproximada los límites de detección y determinación.

Esta metodología implica registrar los cromatogramas correspondientes a cuatro ó cinco patrones de concentración conocida realizando al menos tres inyecciones para cada uno de ellos. A partir de cada cromatograma se obtiene el área del pico correspondiente y estos valores se usan de forma individual para deducir la ecuación de la recta de calibrado por aplicación del método de mínimos cuadrados. La ecuación representativa es la siguiente:

$$R = a + m \cdot x \qquad \text{Ecuación 2.4}$$

en la que R es la respuesta del instrumento (áreas o alturas de pico), a la ordenada en el origen, m la pendiente y x la concentración:

A partir de ésta, puede calcularse la desviación estándar de la regresión R sobre x, S(R,x), por la ecuación:

$$S(R, x) = \sqrt{\frac{1}{n-2} \cdot \sum (R_i - R_i(x))^2} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

donde  $R_i$  representa el valor de la señal del instrumento,  $R_i(x)$  es el valor que tendría la señal calculado sobre la recta de regresión correspondiente a la concentración  $x$ , y  $n$  es el número total de puntos utilizados para calcular la recta de regresión.

Este valor de la  $S(R, x)$  permite calcular las correspondientes desviaciones estándar de la pendiente  $S(m)$  y de cualquiera de los patrones de concentración conocida  $S(x_i)$  a partir de las siguientes expresiones:

$$S(m) = S(R, x) \sqrt{\frac{1}{\sum (x_i - x_m)^2}} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

$$S(x_i) = \frac{S(R, x)}{m} \sqrt{\frac{1}{t} - \frac{1}{n} + \frac{(R - \bar{R})^2}{m^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

donde  $t$  es el número de inyecciones para cada patrón,  $R$  representa el valor medio de las  $t$  señales correspondientes a la concentración  $x$  y  $\bar{R}$  y  $\bar{x}$  son los valores medios de todos los datos.

A partir de estos valores se pueden determinar las siguientes características o atributos necesarios para la validación del método analítico:

Linealidad.- La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado. Se calcula a través de la desviación estándar relativa de la pendiente, generalmente expresada como porcentaje.

$$\text{Linealidad} = \frac{S(m)}{m} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2.8}$$

Sensibilidad.- Puede definirse como capacidad de discriminar entre concentraciones semejantes de analito ó capacidad para poder detectar (análisis cualitativo) o determinar (análisis cuantitativo) pequeñas concentraciones de analito en la muestra. Matemáticamente se determina por el cociente entre la desviación estándar de regresión y la pendiente.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{S(R, x)}{m} \quad \text{Ecuación 2.9}$$

La sensibilidad representa el mínimo intervalo de confianza discernible en todo el rango de concentraciones estudiadas.

Límite de detección.- Es la concentración de analito que origina una señal que puede diferenciarse estadísticamente del blanco. Se puede calcular un límite de detección de forma aproximada por la ecuación:

$$\text{Límite de detección} = 3 \cdot \frac{S(R, x)}{m} \cdot \sqrt{\frac{n-2}{n-1}} \quad \text{Ecuación 2.10}$$

Límite de determinación.- También llamado límite de cuantificación. Se define como la concentración de analito que origina una señal que puede considerarse el límite inferior del rango lineal. Se puede calcular un límite de determinación de forma aproximada por la ecuación:

$$\text{Límite de determinación} = 10 \cdot \frac{S(R, x)}{m} \cdot \sqrt{\frac{n-2}{n-1}} \quad \text{Ecuación 2.11}$$

Precisión.- Es el grado de concordancia entre un grupo de resultados obtenidos al aplicar repetitiva e independientemente el mismo método analítico a alícuotas de la misma muestra. Se calcula a partir de la desviación estándar relativa de los valores de concentración medidos en el ensayo de calibración:

$$\text{Precisión} = \frac{S(x_i)}{x_i} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2.12}$$

Estos parámetros son característicos de cada calibrado y pueden ser utilizados como criterio de comparación.

## **2.3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS**

### **2.3.1. ANÁLISIS DE REGRESIÓN**

Para la realización de los ajustados y determinación de sus parámetros se ha empleado el análisis de regresión por mínimos cuadrados. Se ha empleado el programa SIGMAPLOT 2000.

#### ***Coefficiente de correlación lineal “r”***

El coeficiente de correlación lineal,  $r$ , se ha utilizado como criterio estadístico para determinar la fiabilidad de los ajustados lineales por mínimos cuadrados en la recta de calibración.

Cuanto más próximo a la unidad sea el valor absoluto de “ $r$ ” más fiable será el ajustado (*Balan, LP. y Garret, ER., 1983*). Para su cálculo se ha empleado el programa SIGMAPLOT 2000.

### **2.3.2. COMPARACIÓN DE MEDIAS**

#### **2.3.2.1. Pruebas paramétricas**

En el presente trabajo se han empleado distintas pruebas paramétricas de comparación entre medias de los distintos grupos; para ello se ha utilizado el programa SPSS 10.0 para Windows:

- Prueba de comparación de dos medias: “ $t$ ” de Student
- Análisis de varianza global: ANOVA de un factor

Las condiciones que deben cumplirse para poder aplicar pruebas paramétricas (*Saunders, BD. y Trapp, RG., 1994*) son: distribución normal, homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) e independencia en las observaciones. Como paso previo al análisis comparativo, por tanto, se ha realizado un ensayo de homogeneidad de varianzas (Test de Levène con un grado de significación  $p < 0.05$ ).

El análisis de varianza de una vía (ANOVA de un factor) se utiliza para establecer la existencia o no de diferencias significativas entre los distintos grupos de datos, debido a la existencia de un factor de variación. En todos los casos se ha tomado un nivel de confianza del 95% de modo que se asumen diferencias significativas cuando el valor de probabilidad  $p$  es menor de 0.05. Posteriormente, las diferencias entre grupos se detectaron con la prueba de Scheffé.

#### 2.3.2.2. Pruebas no paramétricas

Se ha recurrido a ellas cuando las varianzas de las medias no son homogéneas según la prueba de Levène. En estos casos, se ha llevado a cabo el ANOVA y en caso de poner de manifiesto diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones, se ha realizado la comparación entre grupos mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

## ***Capítulo 3: Resultados***

### **3.1. ABSORCIÓN PERCUTÁNEA DE BEMIPARINA**

Las muestras obtenidas en los experimentos realizados para el estudio de la absorción de Bemiparina a partir de formulaciones en forma de gel, tanto *in vitro* (a través de epidermis humana) como *in vivo* (a través de piel de rata Wistar), se han valorado mediante la determinación de la actividad anti-Xa.

#### **3.1.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO: ACTIVIDAD ANTI-XA**

En el Cuadro 3.1 se indican los resultados obtenidos en la validación del método analítico empleado. El ámbito de concentraciones utilizado abarca, en todos los casos, las concentraciones de los solutos en las muestras de ensayo. La precisión se ha expresado mediante el coeficiente de variación (CV%) tanto intra como interensayo. En la segunda parte del cuadro se expresan estos resultados como  $\mu\text{g}$  valorados en cada una de las muestras alícuotas de 100  $\mu\text{l}$ .

CONC. TEÓRICA BMP (UI/ml)	CONCENTRACIÓN ESTIMADA				
	Ensayo 1 ± EE (CV %)	Ensayo 2 ± EE (CV %)	Ensayo 3 ± EE (CV%)	Media ± DE	CV(%) Interensayo
<b>0.35</b>	0.38 ± 0.05 (13.16 %)	0.39 ± 0.03 (7.69 %)	0.38 ± 0.05 (13.16 %)	0.38 ± 0.006	1.57 %
<b>0.035</b>	0.064 ± 0.02 (31.25 %)	0.045 ± 0.008 (17.77 %)	0.048 ± 0.006 (12.50 %)	0.052 ± 0.01	19.20 %
<b>0.0175</b>	0.020 ± 0.01 (50 %)	0.025 ± 0.006 (24 %)	0.025 ± 0.005 (20 %)	0.023 ± 0.003	13.04 %
µg BMP	µg ESTIMADOS				
	Ensayo 1 ± EE (CV %)	Ensayo 2 ± EE (CV %)	Ensayo 3 ± EE (CV%)	Media ± DE	CV(%) Interensayo
<b>0.4</b>	0.43 ± 0.06 (13.16 %)	0.45 ± 0.03 (7.69 %)	0.43 ± 0.06 (13.16 %)	0.43 ± 0.01	1.57 %
<b>0.04</b>	0.07 ± 0.02 (31.25 %)	0.05 ± 0.01 (17.77 %)	0.05 ± 0.01 (12.5 %)	0.06 ± 0.01	19.20 %
<b>0.02</b>	0.02 ± 0.01 (50 %)	0.03 ± 0.01 (24 %)	0.03 ± 0.01 (20 %)	0.03 ± 0.003	13.04 %

**Cuadro 3.1.** Validación de la determinación de la Bemiparina mediante el cálculo de la actividad anti-Xa. Se indican las concentraciones teóricas y estimadas. Asimismo, se muestran los errores estándar (EE) y el coeficiente de variación (CV%) intraensayo e interensayo, el valor medio y la desviación estándar (DE).

### **3.1.2. ESTUDIOS DE ABSORCIÓN “*IN VITRO*”**

Tal como se detalla en el apartado de *Materiales y Métodos* se ensayó un gel con distintas concentraciones de Bemiparina: 0.1; 0.15; 0.25; 0.5 y 1% (m/m) y el mismo carente de BMP (control).

Para cada uno de los geles se ha determinado:

#### a) Cantidad de Bemiparina en epidermis humana:

En los cuadros 3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 3.10 y 3.12 se muestran las UI aplicadas y los resultados, con su error estándar, obtenidos tras la valoración de las muestras de epidermis (UI anti-Xa) correspondientes a los ensayos de permeabilidad de los distintos geles de Bemiparina utilizados (8 h). Asimismo se han calculado las UI anti-Xa/cm<sup>2</sup> y los porcentajes de Bemiparina acumulados en piel. Se detalla igualmente el valor medio con la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).

#### b) Cantidad de Bemiparina en el compartimento receptor.

En los Cuadros 3.3, 3.5, 3.7, 3.9, 3.11 y 3.13 se muestran los valores individuales y su error estándar (EE), obtenidos tras la valoración de las muestras tomadas del compartimento receptor de las células de difusión, tras 8 h de aplicación de los distintos geles. Asimismo se han calculado los porcentajes de Bemiparina acumulada en el receptor. También se indica el valor medio con la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV).

➤ **GEL DE BEMIPARINA (0.1%).**

a) Cantidad de Bemiparina en epidermis.

<b>Ensayo número</b>	<b>UI aplicadas</b>	<b>UI anti-Xa totales en piel (EE)</b>	<b>UI anti-Xa /cm<sup>2</sup> (EE)</b>	<b>Porcentaje en piel (EE)</b>
1	24.03	0.87 (0.11)	1.10 (0.14)	3.62 (0.46)
2	21.88	0.80 (0.08)	1.02 (0.11)	3.67 (0.40)
3	22.16	0.49 (0.08)	0.61 (0.10)	2.19 (0.35)
4	18.61	0.69 (0.08)	0.88 (0.10)	3.73 (0.20)
5	23.47	0.65 (0.08)	0.82 (0.11)	2.78 (0.36)
6	18.61	0.81 (0.09)	1.03 (0.11)	4.38 (0.47)
7	18.79	0.78 (0.10)	0.99 (0.13)	4.15 (0.55)
8	18.05	0.68 (0.08)	0.87 (0.10)	3.80 (0.43)
9	19.17	0.74 (0.09)	0.93 (0.11)	3.84 (0.47)
10	19.17	0.82 (0.11)	1.04 (0.14)	4.28 (0.56)
<b>Media(DE)</b>	20.39 (2.24)	0.74 (0.11)	0.93 (0.14)	3.64 (0.68)
<b>(CV%)</b>	10.99 %	14.86 %	15.05 %	18.68 %

**Cuadro 3.2.** Estudios de penetración *in vitro* de BMP. UI de BMP aplicadas sobre la piel y cantidades acumuladas en la misma tras 8 horas de aplicación del gel de Bemiparina 0.1%.

b) Cantidad de Bemiparina en el compartimento receptor.

Ensayo número	UI aplicadas	UI anti-Xa totales en receptor (EE)	Porcentaje en receptor (EE)
1	24.03	0.05 (0.02)	0.20 (0.07)
2	21.88	0.03 (0.02)	0.12 (0.10)
3	22.16	0.0001 (1.10)*	0.0005 (5.30)*
4	18.61	0.008 (0.03)*	0.04 (0.14)*
5	23.47	0.04 (0.02)	0.17 (0.07)
6	18.61	0.04 (0.02)	0.19 (0.10)
7	18.79	0.0003 (0.48)*	0.001 (2.54)*
8	18.05	0.06 (0.02)	0.35 (0.08)
9	19.17	0.04 (0.02)	0.19 (0.09)
10	19.17	0.03 (0.04)	0.17 (0.21)
<b>Media (DE)</b>	20.39 (2.24)	0.04 (0.01)	0.19 (0.07)
<b>(CV%)</b>	10.99 %	25.80 %	36.13 %

**Cuadro 3.3.** Estudios de penetración in vitro de BMP. UI de BMP aplicadas sobre la piel y cantidades acumuladas en el compartimento receptor tras 8 horas de aplicación del gel de Bemiparina 0.1%. Los valores señalados (\*) no se incluyeron para calcular la media.

➤ **GEL DE BEMIPARINA (0.15 %).**

a) Cantidad de Bemiparina en epidermis.

<b>Ensayo número</b>	<b>UI aplicadas</b>	<b>UI anti-Xa totales en piel (EE)</b>	<b>UI anti-Xa /cm<sup>2</sup> (EE)</b>	<b>Porcentaje en piel (EE)</b>
1	33.52	1.20 (0.16)*	1.52 (0.20)*	3.59 (0.48)*
2	31.70	0.36 (0.06)	0.46 (0.08)	1.14 (0.19)
3	28.89	0.37 (0.11)	0.47 (0.14)	1.29 (0.37)
4	35.48	0.31 (0.07)	0.40 (0.08)	0.88 (0.19)
5	26.79	1.22 (0.16)*	1.54 (0.20)*	4.55 (0.60)*
6	32.12	1.17 (0.17)*	1.48 (0.21)*	3.63 (0.52)*
7	28.33	0.42 (0.06)	0.53 (0.07)	1.47 (0.20)
<b>Media (DE) (CV%)</b>	30.98(3.09) 9.99 %	0.37 (0.05) 12.35 %	0.47 (0.05) 11.45 %	1.20 (0.25) 20.89 %

**Cuadro 3.4.** Estudios de penetración *in vitro* de BMP. UI de BMP aplicadas sobre la piel y cantidades acumuladas en la misma tras 8 horas de aplicación del gel de Bemiparina 0.15%. Los valores señalados (\*) no se incluyeron para calcular la media.

b) Cantidad de Bemiparina en el compartimento receptor.

Ensayo número	UI aplicadas	UI anti-Xa totales en receptor (EE)	Porcentaje en receptor $\pm$ (EE)
1	33.52	0.02 (0.03)	0.10 (0.14)
2	29.73	0.03 (0.03)	0.14 (0.13)
3	31.70	0.04 (0.02)	0.20 (0.09)
4	28.89	0.08 (0.02)	0.45 (0.10)
5	35.48	0.11 (0.16)	0.47 (0.07)
6	28.33	$2.3 \cdot 10^{-5}$ (1.46)*	$1.24 \cdot 10^{-4}$ (7.73)*
<b>Media (DE)</b> <b>(CV%)</b>	31.28 (2.82) 9 %	0.05 (0.04) 67.53 %	0.27 (0.17) 64.49 %

**Cuadro 3.5.** Estudios de penetración *in vitro* de BMP. UI de BMP aplicadas sobre la piel y cantidades acumuladas en el compartimento receptor tras 8 horas de aplicación del gel de Bemiparina 0.15%. Los valores señalados (\*) no se incluyeron para calcular la media.

➤ **GEL DE BEMIPARINA (0.25 %).**

a) Cantidad de Bemiparina en epidermis.

Ensayo Número	UI aplicadas	UI anti-Xa totales en piel (EE)	UI anti-Xa /cm <sup>2</sup> (EE)	Porcentaje en piel (EE)
1	61.48	1.5·10 <sup>-4</sup> (4.33)*	2·10 <sup>-4</sup> (5.66)	3·10 <sup>-4</sup> (7.04)*
2	60.54	0.05 (0.50)	0.070 (0.63)	0.09 (0.8)
3	64.98	1.3·10 <sup>-3</sup> (2.53)*	1·10 <sup>-3</sup> (3.16)	2·10 <sup>-3</sup> (3.9)*
4	65.45	0.62 (0.27)	0.797 (0.35)	0.96 (0.41)
5	54.70	0.50 (0.35)	0.625 (0.45)	0.90 (0.64)
6	44.88	0.80 (0.27)	1.005 (0.35)	1.77 (0.60)
7	51.42	0.40 (0.10)	0.473 (0.14)	0.73 (0.2)
8	45.58	0.55 (0.08)	0.694 (0.10)	1.20 (0.16)
9	49.09	0.35 (0.08)	0.435 (0.09)	0.58 (0.15)
10	59.61	0.28 (0.13)	0.351 (0.16)	0.59 (0.21)
<b>Media (DE)</b>	55.77 (7.72)	0.44 (0.23)	0.55 (0.29)	0.85 (0.94)
<b>(CV%)</b>	13.84 %	51.46 %	51.90 %	51.52 %

**Cuadro 3.6.** Estudios de penetración *in vitro* de BMP. UI de BMP aplicadas sobre la piel y cantidades acumuladas en la misma tras 8 horas de aplicación del gel de Bemiparina 0.25%. Los valores señalados (\*) no se incluyeron para calcular la media.

b) Cantidad de Bemiparina en el compartimento receptor.

<b>Ensayo número</b>	<b>UI aplicadas</b>	<b>UI anti-Xa totales en receptor (EE)</b>	<b>Porcentaje en receptor ± (EE)</b>
1	61.48	0.12 (0.06)	0.20 (0.10)
2	60.54	0.53 (0.06)	0.88 (0.10)
3	64.98	0.09 (0.10)	0.13 (0.15)
4	65.45	0.19 (0.02)	0.30 (0.04)
5	54.70	0.04 (0.04)	0.07 (0.07)
6	44.88	0.21 (0.02)	0.48 (0.06)
7	51.42	2·10 <sup>-4</sup> (0.70)*	4·10 <sup>-4</sup> (1.46)*
8	45.58	2·10 <sup>-4</sup> (0.63)*	5·10 <sup>-4</sup> (1.38)*
9	49.09	2·10 <sup>-4</sup> (1.08)*	4·10 <sup>-4</sup> (2.20)*
10	59.61	18.92 (27.20)*	31.74* (45.63)*
<b>Media (DE)</b>	55.77 (7.72)	0.19 (0.17)	0.34 (0.29)
<b>(CV%)</b>	13.8 %	88.98 %	87.31 %

**Cuadro 3.7.** Estudios de penetración *in vitro* de BMP. UI de BMP aplicadas sobre la piel y cantidades acumuladas en el compartimento receptor tras 8 horas de aplicación del gel de Bemiparina 0.25%. Los valores señalados (\*) no se incluyeron para calcular la media.

➤ **GEL DE BEMIPARINA (0.5%).**

a) Cantidad de Bemiparina en epidermis.

Ensayo número	UI aplicadas	UI anti-Xa totales en piel (EE)	UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> (EE)	Porcentaje en piel (EE)
1	127.63	0.14 (0.10)	0.18 (0.01)	0.11 (0.08)
2	118.74	0.14 (0.11)	0.18 (0.14)	0.12 (0.09)
3	66.80	0.21 (0.10)	0.26 (0.13)	0.31 (0.15)
4	100.98	0.61 (0.10)	0.78 (0.13)	0.60 (0.10)
5	89.76	0.36 (0.08)	0.45 (0.10)	0.40 (0.09)
6	94.90	0.04 (0.11)	0.05 (0.14)	0.04 (0.12)
7	80.88	0.09 (0.22)	0.12 (0.28)	0.12 (0.27)
8	74.80	0.08 (0.22)	0.10 (0.27)	0.11 (0.29)
9	115.01	0.46 (0.16)	0.59 (0.21)	0.41 (0.14)
10	111.73	0.46 (0.16)	0.58 (0.21)	0.41 (0.14)
<b>Media (DE)</b>	98.12 (20.21)	0.26 (0.20)	0.33 (0.25)	0.26 (0.19)
<b>(CV%)</b>	20.60 %	76.90 %	75.76 %	73.0 %

**Cuadro 3.8.** Estudios de penetración *in vitro* de BMP. UI de BMP aplicadas sobre la piel y cantidades acumuladas en la misma tras 8 horas de aplicación del gel de Bemiparina 0.5%.

b) Cantidad de Bemiparina en el compartimento receptor.

Ensayo número	UI aplicadas	UI anti-Xa totales en receptor (EE)	Porcentaje en receptor (EE)
1	127.62	0.02 (0.39)	0.01 (0.31)
2	118.74	0.04 (0.03)	0.03 (0.02)
3	66.85	0.05 (0.03)	0.08 (0.04)
4	100.98	$8.7 \cdot 10^{-5}$ (0.20)*	$8.6 \cdot 10^{-5}$ (0.20)*
5	89.76	0.06 (0.03)	0.07 (0.03)
6	94.90	0.07 (0.02)	0.08 (0.02)
7	80.88	$4.5 \cdot 10^{-4}$ (0.61)*	$5.5 \cdot 10^{-4}$ (0.75)*
8	74.80	$6.2 \cdot 10^{-4}$ (0.37)*	$8.3 \cdot 10^{-4}$ (0.50)*
9	115.01	0.39 (0.04)	0.34 (0.03)
10	111.73	0.07 (0.04)	0.06 (0.03)
11	136.51	0.27 (0.03)	0.20 (0.02)
12	230.01	0.11 (0.01)	0.05 ( $4.35 \cdot 10^{-3}$ )
13	61.71	$1.44 \cdot 10^{-5}$ ( $4.37 \cdot 10^{-4}$ )*	$2.3 \cdot 10^{-5}$ ( $7.08 \cdot 10^{-4}$ )*
14	104.25	0.12 (0.03)	0.12 (0.03)
<b>Media (DE)</b>	108.12(41.61)	0.12 (0.12)	0.10 (0.09)
<b>(CV%)</b>	38.50 %	98.36 %	94.34 %

**Cuadro 3.9.** Estudios de penetración *in vitro* de BMP. UI de BMP aplicadas sobre la piel y cantidades acumuladas en el compartimento receptor tras 8 horas de aplicación del gel de Bemiparina 0.5%. Los valores señalados (\*) no se incluyeron para calcular la media.

➤ **GEL DE BEMIPARINA (1%).**

a) Cantidad de Bemiparina en epidermis.

Ensayo número	UI aplicadas	UI anti-Xa totales en piel (EE)	UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> (EE)	Porcentaje en piel (EE)
1	266.48	4.87·10 <sup>-4</sup> (1.02*)	6·10 <sup>-4</sup> (1.30)*	1.8·10 <sup>-4</sup> (0.38)
2	234.68	0.65 (0.10)	0.82 (0.14)	0.27 (0.04)
3	200.08	0.38 (0.13)	0.50 (0.18)	0.20 (0.06)
4	174.84	0.17 (0.12)	0.21 (0.17)	0.09 (0.07)
5	208.50	0.67 (0.07)	0.86 (0.10)	0.33 (0.03)
6	187.92	0.53 (0.05)	0.67 (0.06)	0.28 (0.03)
7	194.48	0.65 (0.05)	0.82 (0.08)	0.34 (0.03)
8	198.22	0.13 (0.07)	0.18 (0.10)	0.07 (0.04)
9	250.58	0.48 (0.05)	0.60 (0.06)	0.18 (0.02)
10	225.34	0.30 (0.12)	0.38 (0.14)	0.13 (0.05)
11	195.42	0.03 (2.30)	0.04 (0.03)	0.02 (1.17)
12	157.08	0.25 (0.10)	0.33 (0.14)	0.16 (0.06)
<b>Media(DE)</b>	207.8(31.40)	0.38 (0.22)	0.49 (0.28)	0.19 (0.11)
<b>(CV%)</b>	15.11 %	58.84 %	58.00 %	58.44 %

**Cuadro 3.10.** Estudios de penetración *in vitro* de BMP. UI de BMP aplicadas sobre la piel y cantidades acumuladas en la misma tras 8 horas de aplicación del gel de Bemiparina 1%. Los valores señalados (\*) no se incluyeron para calcular la media.

b) Cantidad de Bemiparina en el compartimento receptor.

Ensayo número	UI aplicadas	UI anti-Xa totales en receptor (EE)	Porcentaje en receptor (EE)
1	266.48	0.04 (0.02)	0.02 (0.01)
2	234.68	0.11 (0.02)	0.04 (0.01)
3	200.08	0.44 (0.02)	0.22 (0.01)
4	174.84	0.55 (0.03)	0.32 (0.01)
5	208.50	0.02 (0.03)	0.01 (0.01)
6	187.92	$2.03 \cdot 10^{-4}$ (0.15)*	$1.1 \cdot 10^{-4}$ (0.08)*
7	194.48	0.16 (0.02)	0.08 (0.01)
8	198.22	0.09 (0.03)	0.05 (0.01)
9	250.58	0.52 (0.02)	0.21 (0.01)
10	225.34	$9.21 \cdot 10^{-5}$ (0.52)*	$4 \cdot 10^{-5}$ (0.23)*
11	195.42	1.45 (0.13)	0.74 (0.07)
12	157.08	0.75 (0.15)	0.48 (0.09)
<b>Media (DE)</b>	207.80 (31.40)	0.41 (0.44)	0.21 (0.24)
<b>(CV%)</b>	15.10 %	107.48 %	110.02 %

**Cuadro 3.11.** Estudios de penetración *in vitro* de BMP. UI de BMP aplicadas sobre la piel y cantidades acumuladas en el compartimento receptor tras 8 horas de aplicación del gel de Bemiparina 1%. Los valores señalados (\*) no se incluyeron para calcular la media.

➤ **GEL SIN BEMIPARINA.**

Con el fin de poder establecer la posible interferencia de los excipientes utilizados en la elaboración de los geles o de algún componente de la piel en la valoración, se procedió a realizar un ensayo de difusión control empleando un gel sin Bemiparina.

Se montaron seis células de difusión con el gel sin BMP, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

a) Cantidad de Bemiparina en epidermis

<b>Ensayo número</b>	<b>UI aplicadas</b>	<b>UI anti-Xa totales en piel (EE)</b>	<b>UI anti-Xa/cm<sup>2</sup> (EE)</b>
1	0.00	0.29 (0.09)	0.36 (0.11)
2	0.00	0.25 (0.05)	0.31 (0.06)
3	0.00	0.17 (0.04)	0.21 (0.05)
4	0.00	0.26 (0.07)	0.33 (0.09)
5	0.00	0.24 (0.04)	0.30 (0.06)
6	0.00	0.28 (0.05)	0.35 (0.06)
<b>Media (DE) (CV%)</b>	---	0.25 (0.04) 16 %	0.31 (0.05) 16.01 %

**Cuadro 3.12.** Estudios de penetración *in vitro* de BMP. UI de BMP aplicadas sobre la piel, UI anti-Xa valoradas en ella tras 8 horas de aplicación del gel sin Bemiparina

b) Cantidad de Bemiparina en el compartimento receptor

Receptor número	UI aplicadas	UI anti-Xa totales en receptor (EE)
1	0.00	0.05 (0.02)
2	0.00	0.06 (0.03)
3	0.00	0.04 (0.03)
4	0.00	0.0004 (0.80)
5	0.00	0.03 (0.03)
6	0.00	$3 \cdot 10^{-5}$ (1.4)
<b>Media (DE) (CV%)</b>	---	0.03 (0.03) 100 %

**Cuadro 3.13.** Estudios de penetración *in vitro* de BMP. UI de BMP aplicadas sobre la piel y cantidades acumuladas en el compartimento receptor tras 8 horas de aplicación del gel sin Bemiparina.

En el Cuadro 3.14 se resumen los valores medios y desviaciones estándar (DE) obtenidos para los distintos geles ensayados.

% Bemiparina en gel	UI anti-Xa totales en compartimento receptor Media (DE)	UI anti-Xa totales en piel Media (DE)	UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> piel Media (DE)
0.1	0.04 (0.01)	0.74 (0.11)	0.93 (0.14)
0.15	0.05 (0.04)	0.37 (0.05)	0.47 (0.05)
0.25	0.19 (0.17)	0.44 (0.23)	0.55 (0.29)
0.50	0.12 (0.12)	0.26 (0.20)	0.33 (0.25)
1	0.41 (0.44)	0.38 (0.22)	0.49 (0.28)
Blanco (0)	0.03 (0.03)	0.25 (0.04)	0.31 (0.05)

**Cuadro 3.14.** Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de difusión *in vitro* para los distintos geles estudiados.

### **3.1.3. ESTUDIOS DE ABSORCIÓN “*IN VIVO*”**

Tal y como se detalla en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos, se han ensayado dos concentraciones distintas de gel de Bemiparina: 0.25 y 0.5%.

#### **➤ GEL DE BEMIPARINA ( 0.25%).**

En el Cuadro 3.15 y 3.16 se muestran los resultados individuales de actividad anti-Xa de las muestras de plasma y de piel (tanto en la zona de aplicación como en la zona control) a las 4 y 8 horas, respectivamente, tras la administración del gel de Bemiparina de concentración 0.25%.

Los resultados se expresan en términos de UI anti-Xa/ml, UI anti-Xa/cm<sup>2</sup> y UI anti-Xa/g.

Rata n°	UI aplicadas	Concentración en plasma 4 h postadministración	Concentración en piel en la zona de aplicación		Concentración en piel en la zona control	
		Media (EE) (UI anti-Xa/ml)	Media (EE) (UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> )	Media (EE) (UI anti-Xa/g)	Media (EE) (UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> )	Media (EE) (UI anti-Xa/g)
1	187.50	0.08 (0.03)	0.51 (0.11)	2.48 (0.37)	0.26 (0.05)	1.70 (0.32)
2	189.61	4·10 <sup>-5</sup> (0.04)*	0.76 (0.10)	3.33 (0.15)	0.49 (0.28)	2.93 (1.38)
3	183.65	0.06 (0.03)	0.51 (0.10)	2.76 (0.62)	---	---
4	196.58	0.05 (0.04)	0.54 (0.02)	2.72 (0.30)	---	---
5	187.42	0.11 (0.05)	0.72 (0.04)	3.47 (0.35)	0.46 (0.01)	2.95 (0.62)
6	190.00	0.18 (0.07)	0.61 (0.08)	2.32 (0.36)	---	---
7	179.99	0.05 (0.05)	0.74 (0.10)	3.06 (0.10)	---	---
8	184.32	0.12 (0.06)	0.66 (0.14)	2.58 (0.47)	---	---
9	181.32	0.09 (0.05)	0.85 (0.03)	3.20 (0.04)	---	---
<b>Media (DE)</b>	186.71 (5.09)	0.09 (0.04)	0.66 (0.12)	2.88 (0.40)	0.40 (0.13)	2.53 (0.72)
<b>CV %</b>	2.72%	47.56 %	18.51 %	13.93 %	30.99 %	28.33%

**Cuadro 3.15.** Resultados individuales de actividad anti-Xa de las muestras de plasma y de piel (zona de aplicación y zona control) a las 4 horas, tras la administración del gel de BMP de concentración 0.25%. Los valores señalados (\*) no se incluyeron para calcular la media.

Rata n°	UI aplicadas	Concentración en plasma 8 h postadministración	Concentración en piel en la zona de aplicación		Concentración en piel en la zona control	
		Media (EE) (UI anti-Xa/ml)	Media (EE) (UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> )	Media (EE) (UI anti-Xa/g)	Media (EE) (UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> )	Media (EE) (UI anti-Xa/g)
1	187.50	0.08 (0.02)	0.74 (0.14)	3.66 (0.75)	---	---
2	189.61	0.09 (0.03)	0.68 (0.02)	3.11 (0.11)	---	---
3	183.65	0.05 (0.04)	0.57 (0.02)	2.65 (0.11)	0.37 (0.11)	1.62 (0.46)
4	196.58	0.08 (0.04)	0.57 (0.02)	2.10 (0.28)	---	---
5	187.42	3·10 <sup>-4</sup> (0.36)*	0.61 (0.04)	2.43 (0.46)	0.65 (0.04)	1.68 (0.21)
6	190.00	0.05 (0.02)	0.70 (0.16)	2.87 (0.56)	---	---
7	179.99	0.07 (0.02)	0.31 (0.02)	1.63 (0.18)	---	---
8	184.32	0.07 (0.04)	0.39 (0.10)	1.68 (0.60)	0.58 (0.07)	2.64 (0.32)
9	181.32	0.07 (0.04)	0.55 (0.20)	2.43 (0.81)	---	---
<b>Media (DE)</b>	186.71 (5.09)	0.07 (0.01)	0.57 (0.14)	2.51 (0.66)	0.53 (0.15)	1.98 (0.57)
<b>CV %</b>	2.72%	20.20%	24.85 %	26.29 %	27.32 %	28.90 %

**Cuadro 3.16.** Resultados individuales de actividad anti-Xa de las muestras de plasma y de piel (zona de aplicación y zona control) a las 8 horas, tras la administración del gel de BMP de concentración 0.25%. Los valores señalados (\*) no se incluyeron para calcular la media.

➤ **GEL DE BEMIPARINA (0.5%).**

En el Cuadro 3.17 y Cuadro 3.18 se muestran los resultados individuales de actividad anti-Xa de las muestras de plasma y de piel (tanto en la zona de aplicación como en la zona control) a las 4 y 8 horas, respectivamente, tras la administración del gel de BMP de concentración 0.5%.

Los resultados se expresan en términos de UI anti-Xa/ml, UI anti-Xa/cm<sup>2</sup> y UI anti-Xa/g.

Rata n°	UI aplicadas	Concentración en plasma 4 h postadministración Media (EE) (UI anti-Xa/ml)	Concentración en piel en la zona de aplicación Media (EE)		Concentración en piel en la zona control Media (EE)	
			(UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> )	(UI anti-Xa/g)	(UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> )	(UI anti-Xa/g)
1	383.35	0.04 (0.03)	2.99 (0.01)	8.55 (0.34)	0.25 (0.07)	1.10 (0.33)
2	379.26	0.005 (0.01)	0.42 (0.18)	1.74 (0.82)	0.42 (0.05)	1.95 (0.27)
3	369.63	0.03 (0.02)	0.82 (0.32)	3.29 (0.97)	0.37 (0.05)	2.21 (0.30)
4	321.98	4·10 <sup>-9</sup> (0.001)*	0.44 (0.39)	2.01 (1.58)	0.32 (0.04)	1.56 (0.22)
5	349.30	0.07 (0.03)	0.30 (0.16)	1.45 (0.69)	0.29 (0.08)	1.68 (0.47)
6	395.55	0.12 (0.03)	1.17 (0.46)	4.88 (1.87)	0.49 (0.09)	2.22 (0.43)
7	301.87	0.02 (0.06)	0.72 (0.13)	3.07 (0.68)	0.34 (0.10)	1.85 (0.56)
8	369.24	0.12 (0.02)	1.18 (0.13)	5.81 (0.78)	---	---
9	345.98	0.08 (0.05)	1.37 (0.29)	6.68 (1.28)	---	---
10	312.98	0.10 (0.02)	1.21 (0.20)	5.23 (1.25)	---	---
11	342.03	0.06 (0.05)	0.72 (0.04)	2.55 (0.54)	---	---
12	375.00	0.14 (0.04)	1.72 (0.18)	8.15 (0.83)	---	---
<b>Media (DE) CV %</b>	353.52 (29.85) 8.43 %	0.07 (0.04) 62.98 %	1.09 (0.74) 67.61 %	4.45 (2.47) 55.56 %	0.35 (0.08) 22.86 %	1.80 (0.39) 21.94 %

**Cuadro 3.17.** Resultados individuales de actividad anti-Xa de las muestras de plasma y de piel (zona de aplicación y zona control) a las 4 horas, tras la administración del gel de BMP de concentración 0.5%. Los valores señalados (\*) no se incluyeron para calcular la media.

Rata n°	UI aplicadas	Concentración en plasma 8 h postadministración	Concentración en piel en la zona de aplicación		Concentración en piel en la zona control	
		Media (EE) (UI anti-Xa/ml)	Media (EE)		Media (EE)	
			(UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> )	(UI anti-Xa/g)	(UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> )	(UI anti-Xa/g)
1	383.35	0.03 (0.02)	0.98 (0.08)	4.80 (0.01)	0.70 (0.13)	4.43 (0.79)
2	379.26	6·10 <sup>-7</sup> (8·10 <sup>-6</sup> )*	1.16 (0.22)	5.37 (0.93)	0.49 (0.06)	2.69 (0.32)
3	369.63	2·10 <sup>-6</sup> (1·10 <sup>-3</sup> )*	1.18 (0.27)	5.43 (1.37)	0.50 (0.06)	2.70 (0.31)
4	321.98	4·10 <sup>-7</sup> (4·10 <sup>-4</sup> )*	1.03 (0.31)	4.90 (1.68)	0.43 (0.06)	2.55 (0.34)
5	349.30	2·10 <sup>-6</sup> (5·10 <sup>-3</sup> )*	0.93 (0.08)	3.99 (0.43)	---	---
6	395.55	1·10 <sup>-3</sup> (2·10 <sup>-2</sup> )*	0.87 (0.27)	2.84 (1.02)	---	---
7	301.87	2·10 <sup>-6</sup> (5·10 <sup>-3</sup> )*	0.32 (0.14)	1.15 (0.70)	---	---
8	369.24	7·10 <sup>-7</sup> (1·10 <sup>-5</sup> )*	0.58 (0.09)	1.46 (0.28)	---	---
9	345.98	0.03 (0.02)	0.67 (0.22)	2.06 (0.73)	---	---
10	312.98	0.07 (0.03)	3.39 (0.98)	13.25 (3.90)	---	---
11	342.03	0.08 (0.03)	1.94 (0.51)	7.86 (3.00)	---	---
<b>Media (DE)</b>	353.52 (29.85)	0.05 (0.03)	1.19 (0.84)	4.83 (3.43)	0.53 (0.12)	3.09 (0.89)
<b>CV %</b>	8.43 %	50.09 %	70.73 %	71.13 %	22.16 %	28.91 %

**Cuadro 3.18.** Resultados individuales de actividad anti-Xa de las muestras de plasma y de piel (zona de aplicación y zona control) a las 8 horas tras la administración del gel de BMP de concentración 0.5%. Los valores señalados (\*) no se incluyeron para calcular la media.

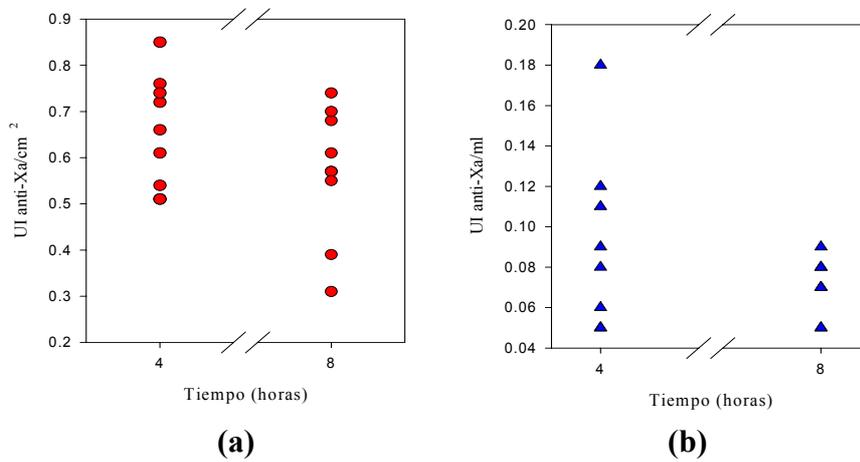
En el Cuadro 3.19 se muestran los valores medios y desviaciones estándar (DE) de BMP (UI anti-Xa/cm<sup>2</sup> y UI anti-Xa/ml) para las dos concentraciones ensayadas a las 4 y 8 horas.

Muestra	GEL BMP 0.25% (m/m)		GEL BMP 0.5% (m/m)	
	PIEL UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> Media (DE)	PLASMA UI anti-Xa/ml Media (DE)	PIEL UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> Media (DE)	PLASMA UI anti-Xa/ml Media (DE)
<b>4h tras la aplicación</b>	0.66 (0.12)	0.09 (0.04)	1.09 (0.74)	0.07 ( 0.04)
<b>8h tras la aplicación</b>	0.57 (0.14)	0.07 (0.02)	1.19 (0.84)	0.05 (0.02)

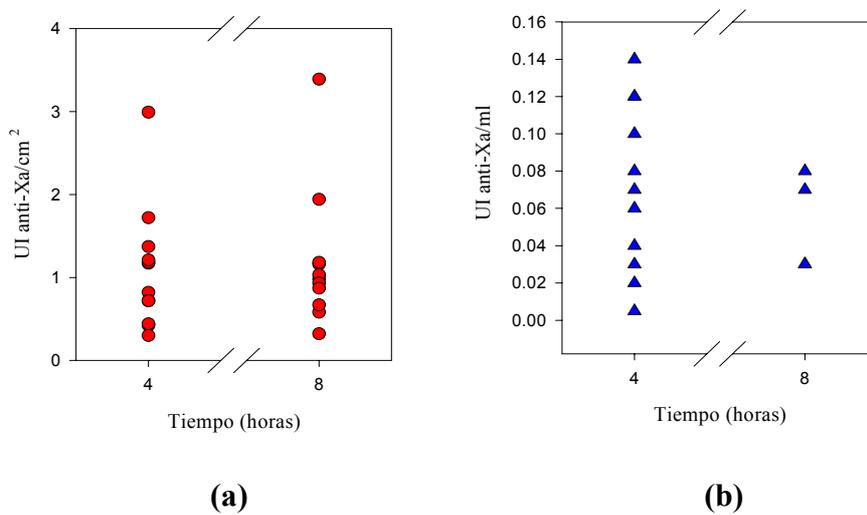
**Cuadro 3.19.** Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo*. Los resultados se expresan en valor de media y desviación estándar (DE).

En la Figura 3.1(a) se muestra la actividad anti-Xa/cm<sup>2</sup> cuantificada en las muestras de piel procedentes de los ensayos de absorción a las 4 y 8 horas, respectivamente (●) para el gel 0.25%. Asimismo, en la Figura 3.1(b) se representan los valores de concentraciones plasmáticas obtenidos tras 4 y 8 h de la aplicación del gel 0.25% (▲).

En la Figura 3.2(a) se muestra la actividad anti-Xa/cm<sup>2</sup> cuantificada en las muestras de piel procedentes de los ensayos de absorción a las 4 y 8 horas, respectivamente (●) para el gel 0.5%. Asimismo, en la Figura 3.2(b) se representan los valores de concentraciones plasmáticas obtenidos tras 4 y 8 h de la aplicación del gel 0.5% (▲).



**Figura 3.1.** Actividad anti-Xa/ $\text{cm}^2$  (a) y niveles plasmáticos de BMP (UI anti-Xa/ml) (b) obtenidos tras la aplicación del gel con concentración de BMP de 0.25%, a las 4 y 8 horas de ensayo.



**Figura 3.2.** Actividad anti-Xa/ $\text{cm}^2$  (a) y niveles plasmáticos de BMP (UI anti-Xa/ml) (b) obtenidos tras la aplicación del gel con concentración de BMP de 0.5%, a las 4 y 8 horas de ensayo.

## **3.2. VALORACIÓN MEDIANTE CLAE: DETECCIÓN UV**

### **3.2.1. VALORACIÓN DE BEMIPARINA MEDIANTE ABSORCIÓN EN ULTRAVIOLETA**

Se valoraron por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) tres rectas patrón con concentraciones de Bemiparina sódica de 0.4; 0.8; 1.6; 3.2; 6.4 y 12.8 UI/ml. Para la validación del método analítico cada punto de la recta se valoró por triplicado.

Las áreas obtenidas se sometieron a análisis matemático con objeto de obtener la precisión, expresada mediante el coeficiente de variación (CV%), tanto intra como interdía, y la exactitud ( $E_r$  max, %) en la detección de cada concentración (Cuadro 3.20). Se determinó la pendiente (m), ordenada en el origen (a) y coeficiente de correlación (r) de cada una de las rectas obtenidas, así como la linealidad, límite de detección y límite de cuantificación con el fin de establecer la calidad del método de valoración (Cuadro 3.21). Los resultados se expresan en  $\mu\text{g}$  de Bemiparina.

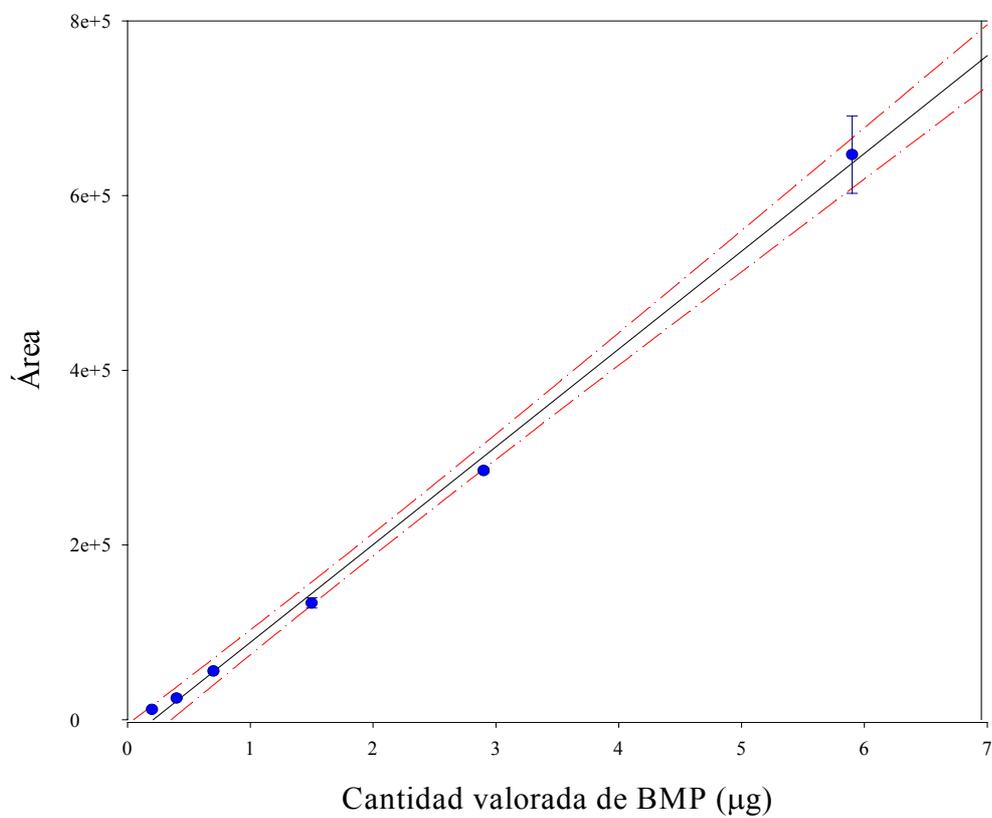
CANTIDADES ESTIMADAS ( $\mu\text{g BMP}$ ). VALORACIÓN BMP POR UV							
INTRADÍA						INTERDÍA	
$\mu\text{g BMP valorados}$ (UI/ml BMP)	$Q_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)	$Q_{\text{estim}} \pm$ DE (CV%)	$Q_{\text{estim}} \pm$ DE (CV%)	$E_{r \text{ max}}$	$E_{r \text{ max}}$	$E_{r \text{ max}}$	$Q_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)
<b>0.2</b> (0.4)	$0.31 \pm 1 \cdot 10^{-5}$ (0.0018)	$0.42 \pm 1 \cdot 10^{-5}$ (0.0020)	$0.52 \pm 1.5 \cdot 10^{-6}$ (0.0003)	74.93	132.88	183.44	$0.42 \pm 0.11$ (25.21)
<b>0.4</b> (0.8)	$0.43 \pm 1 \cdot 10^{-5}$ (0.0019)	$0.53 \pm 1 \cdot 10^{-5}$ (0.0020)	$0.54 \pm 1 \cdot 10^{-5}$ (0.0014)	19.47	49.43	50.42	$0.50 \pm 0.06$ (12.17)
<b>0.7</b> (1.6)	$0.71 \pm 1 \cdot 10^{-5}$ (0.0012)	$0.64 \pm 8 \cdot 10^{-5}$ (0.0125)	$0.62 \pm 1 \cdot 10^{-5}$ (0.0015)	-4.50	-20.09	-15.72	$0.66 \pm 0.05$ (7.20)
<b>1.5</b> (3.2)	$1.40 \pm 5 \cdot 10^{-5}$ (0.0037)	$1.6 \pm 7 \cdot 10^{-5}$ (0.0054)	$1.26 \pm 6 \cdot 10^{-5}$ (0.0049)	-6.76	-11.87	-17.28	$1.34 \pm 0.07$ (5.38)
<b>2.9</b> (6.4)	$2.76 \pm 2 \cdot 10^{-5}$ (0.0008)	$2.52 \pm 6 \cdot 10^{-5}$ (0.0024)	$2.50 \pm 6 \cdot 10^{-5}$ (0.0025)	-5.53	-16.16	-16.14	$2.59 \pm 0.14$ (5.58)
<b>5.9</b> (12.8)	$5.98 \pm 4 \cdot 10^{-4}$ (0.0066)	$6.09 \pm 1.4 \cdot 10^{-4}$ (0.0023)	$6.13 \pm 1 \cdot 10^{-5}$ (0.0001)	6.23	5.76	4.79	$6.07 \pm 0.08$ (1.28)

**Cuadro 3.20.** Cantidades teóricas valoradas y estimadas ( $Q_{\text{estim}}$ ) de BMP. Se muestra la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV %) intradía e interdía, así como el error relativo máximo ( $E_{r \text{ max}}$ ) para cada muestra.

<b>VALORACIÓN BMP POR UV (0.4-12.8 UI/ml)</b>			
	<b>R 1</b>	<b>R 2</b>	<b>R 3</b>
<b>m (pendiente) ± EE</b>	$1.12 \cdot 10^8 \pm 3 \cdot 10^6$	$1.13 \cdot 10^8 \pm 6 \cdot 10^6$	$1.24 \cdot 10^8 \pm 8 \cdot 10^6$
<b>a (ordenada origen) ± EE</b>	$-23469.33 \pm 8491.02$	$-40530.38 \pm 18208.45$	$-62238.86 \pm 23608.30$
<b>r (coef.correl.)</b>	0.999	0.994	0.992
<b>Linealidad (%)</b>	2.16	3.03	3.47
<b>Sensibilidad (µg)</b>	0.2	0.3	0.3
<b>L. Detección (µg)</b>	0.5	0.7	0.8
<b>L. Cuantificación (µg)</b>	1.8	2.5	2.8

**Cuadro 3.21.** Pendiente, ordenada en origen, coeficiente de correlación, linealidad, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación para cada una de las rectas patrón de BMP (0.4-12.8 UI/ml) valorada por UV.

En las Figuras 3.3, 3.4 y 3.5 se representan gráficamente los ajustados entre la cantidad de Bemiparina y el área obtenida de las tres rectas en el ámbito de concentraciones ensayado (12.8-0.4 UI/ml) determinadas mediante UV, así como el intervalo de confianza (95%).

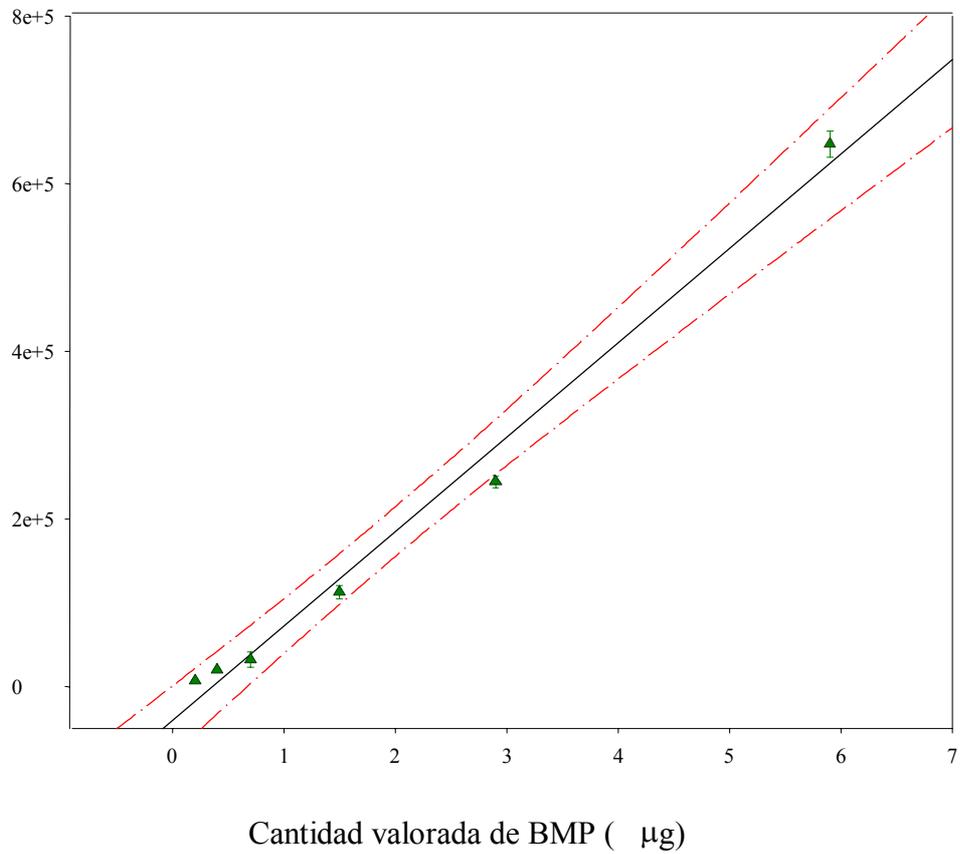


**Figura 3.3. Valoración de BMP por UV**

Representación gráfica de los ajustados entre la cantidad de Bemiparina (x) y el área (y).

La ecuación del ajustado es (recta 1):

$$\text{Área} = -23469.33 + 111944.94 \cdot \mu\text{g BMP} \quad (r=0.999)$$

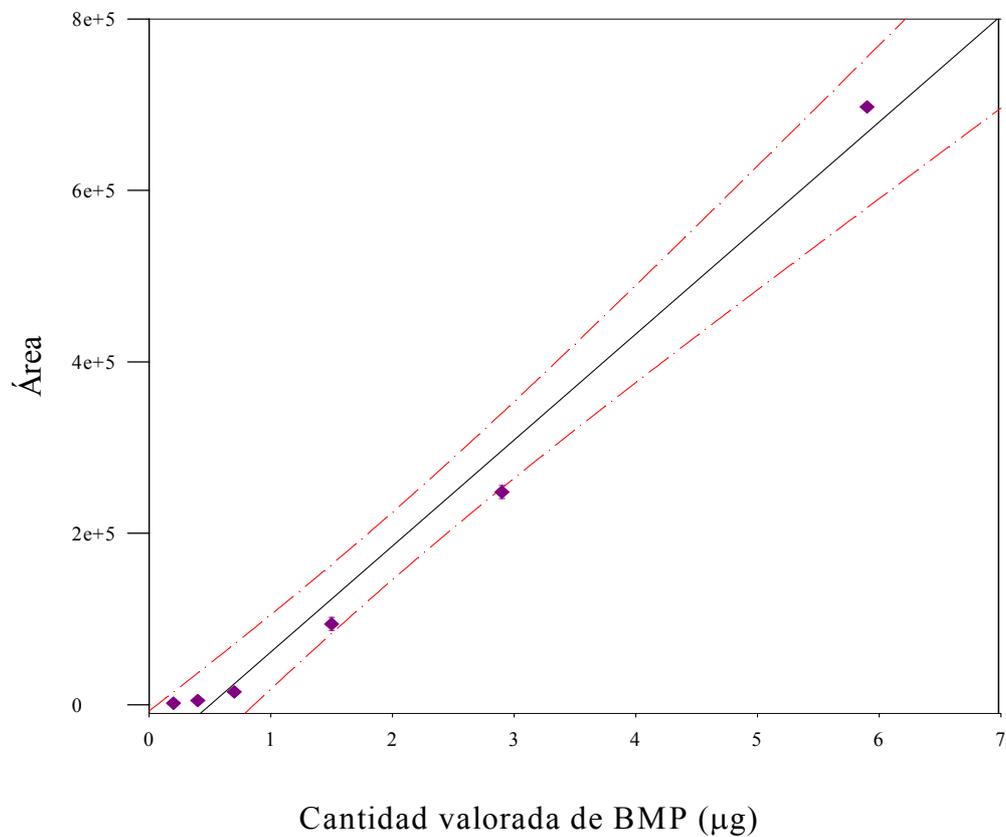


**Figura 3.4. Valoración de BMP por UV**

Representación gráfica de los ajustados entre la cantidad de Bemiparina (x) y el área (y).

La ecuación del ajustado es (recta 2):

$$\text{Área} = -40530.38 + 112601.49 \cdot \mu\text{g BMP} \quad (r = 0.994)$$



**Figura 3.5. Valoración de BMP por UV**

Representación gráfica de los ajustados entre la cantidad de Bemiparina (x) y el área (y).

La ecuación del ajustado es (recta 3):

$$\text{Área} = -62238.86 + 123707.83 \cdot \mu\text{g BMP} \quad (r = 0.992)$$

Asimismo se prepararon tres nuevas rectas patrón con las siguientes concentraciones de Bemiparina sódica: 0,0125; 0,025; 0,05; 0,01; 0,02 y 0,04 UI/ml.

En la Cuadro 3.22 se detallan la precisión, expresada mediante el coeficiente de variación (CV%), tanto intra como interdía, y la exactitud (Er max, %) en la detección para cada uno de los puntos de las nuevas rectas de calibrado.

En la Cuadro 3.23 se muestra la pendiente (m), ordenada en el origen (a) y coeficiente de correlación (r), así como la linealidad expresada en tanto por cien (%), sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación, éstos tres últimos expresados en  $\mu\text{g}$ , para las tres nuevas rectas.

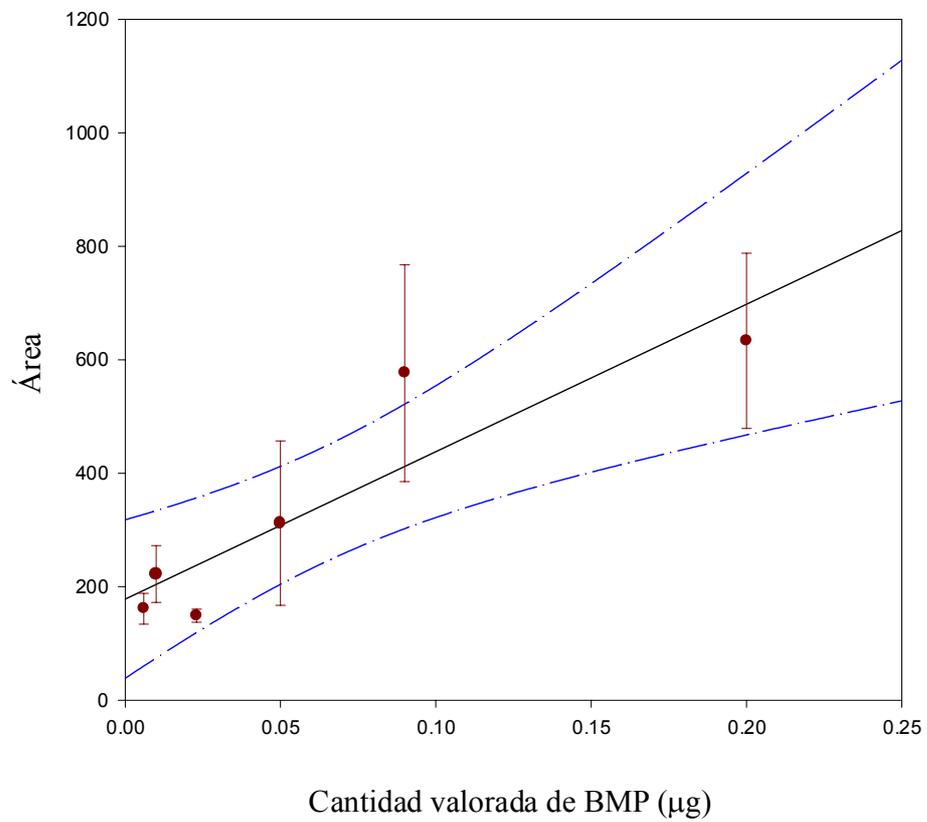
CANTIDADES ESTIMADAS ( $\mu\text{g}$ BMP). VALORACIÓN BMP POR UV							
INTRADIA							INTERDIA
$\mu\text{g}$ BMP valorados (UI/ml BMP)	$Q_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)	$Q_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)	$Q_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)	$E_{r \text{ max}}$	$E_{r \text{ max}}$	$E_{r \text{ max}}$	$Q_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)
<b><math>6 \cdot 10^{-3}</math></b> (0.0125)	$0.004 \pm 9.33 \cdot 10^{-6}$ (0.21)	$0.03 \pm 1.17 \cdot 10^{-5}$ (0.04)	$0.054 \pm 2.96 \cdot 10^{-5}$ (0.05)	-328.52	-597.46	-1299.68	$0.03 \pm 0.03$ (85.25)
<b>0.01</b> (0.025)	$0.016 \pm 1.71 \cdot 10^{-5}$ (0.10)	$0.016 \pm 3.20 \cdot 10^{-5}$ (0.19)	$0.026 \pm 1.47 \cdot 10^{-5}$ (0.06)	218.72	-242.12	202.67	$0.02 \pm 0.01$ (29.86)
<b>0.023</b> (0.05)	$0.006 \pm 5.81 \cdot 10^{-6}$ (0.09)	$0.027 \pm 2.81 \cdot 10^{-5}$ (0.10)	$0.082 \pm 1.73 \cdot 10^{-5}$ (0.02)	-106.77	-77.79	175.15	$0.03 \pm 0.02$ (83.81)
<b>0.05</b> (0.1)	$0.056 \pm 5.31 \cdot 10^{-5}$ (0.09)	$0.10 \pm 6.23 \cdot 10^{-5}$ (0.06)	$0.051 \pm 4.09 \cdot 10^{-6}$ (0.007)	107.47	159.83	22.44	$0.07 \pm 0.03$ (39.08)
<b>0.09</b> (0.2)	$0.13 \pm 6.55 \cdot 10^{-5}$ (0.05)	$0.15 \pm 8.18 \cdot 10^{-5}$ (0.05)	$0.07 \pm 1.58 \cdot 10^{-5}$ (0.02)	74.77	112.64	-42.90	$0.12 \pm 0.04$ (36.96)
<b>0.2</b> (0.4)	$0.16 \pm 5.30 \cdot 10^{-5}$ (0.03)	$0.14 \pm 8.75 \cdot 10^{-6}$ (0.006)	$0.18 \pm 1.00 \cdot 10^{-5}$ (0.005)	37.04	-27.26	6.27	$0.16 \pm 0.02$ (12.63)

**Cuadro 3.22.** Cantidades teóricas valoradas y estimadas ( $Q_{\text{estim}}$ ) de BMP. Se muestra la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV %), intradía e interdía, así como el error relativo máximo ( $E_{r \text{ max}}$ ) para cada muestra.

<b>VALORACIÓN BMP POR UV (0.0125-0.4 UI/ml)</b>			
	<b>R 1</b>	<b>R 2</b>	<b>R 3</b>
<b>m (pendiente) ± EE</b>	$2.91 \cdot 10^6 \pm 6 \cdot 10^5$	$1.97 \cdot 10^6 \pm 7 \cdot 10^5$	$1.59 \cdot 10^6 \pm 4 \cdot 10^5$
<b>a (ordenada origen) ± EE</b>	$174 \pm 51.36$	$404 \pm 64.83$	$228 \pm 40.54$
<b>r (coef.correl.)</b>	0.90	0.77	0.82
<b>Linealidad (%)</b>	17.43	24.82	15.92
<b>Sensibilidad (µg)</b>	0.05	0.07	0.04
<b>L. Detección (µg)</b>	0.13	0.2	0.1
<b>L. Cuantificación (µg)</b>	0.44	0.6	0.4

**Cuadro 3.23.** Pendiente, ordenada en origen, coeficiente de correlación, linealidad, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación para cada una de las rectas patrón de BMP (0.0125-0.4 UI/ml), valoradas por UV.

En las Figuras 3.6, 3.7 y 3.8 se representan gráficamente los ajustados entre la cantidad de Bemiparina y el área obtenida para cada una de las rectas en el ámbito de concentraciones ensayado (0.4-0.0125 UI/ml), asimismo el intervalo de confianza (95%).

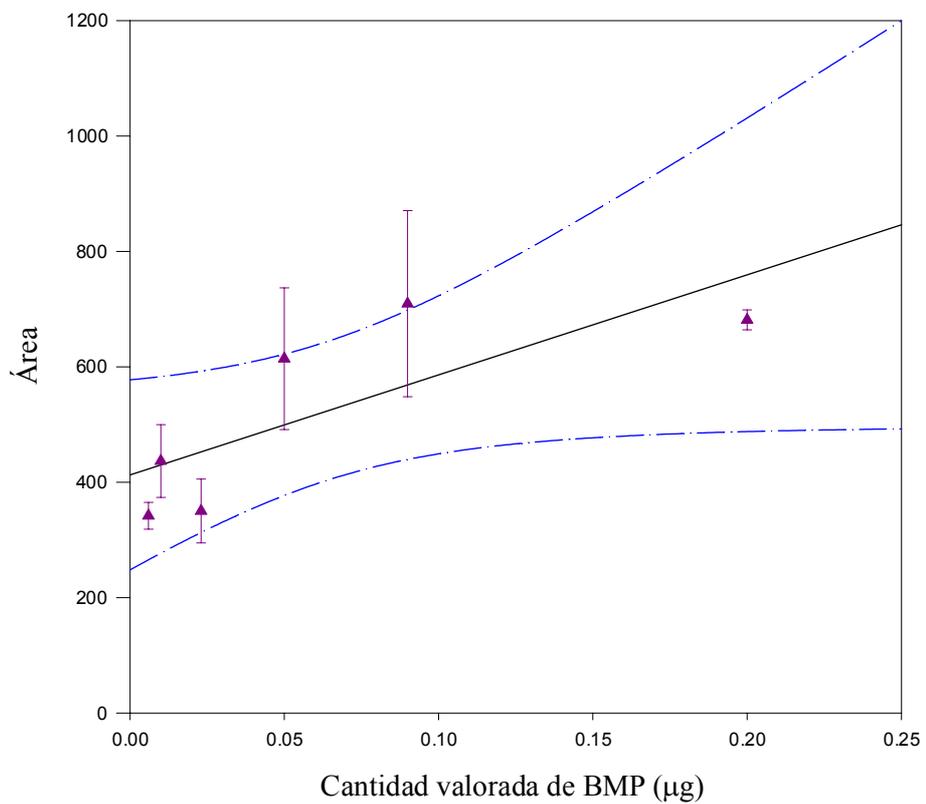


**Figura 3.6. Valoración de BMP por UV**

Representación gráfica de los ajustados entre la cantidad de Bemiparina (x) y el área (y).

La ecuación del ajustado es (recta 1):

$$\text{Área} = 128 + 2597.98 \cdot \mu\text{g BMP} \quad (r = 0.90)$$

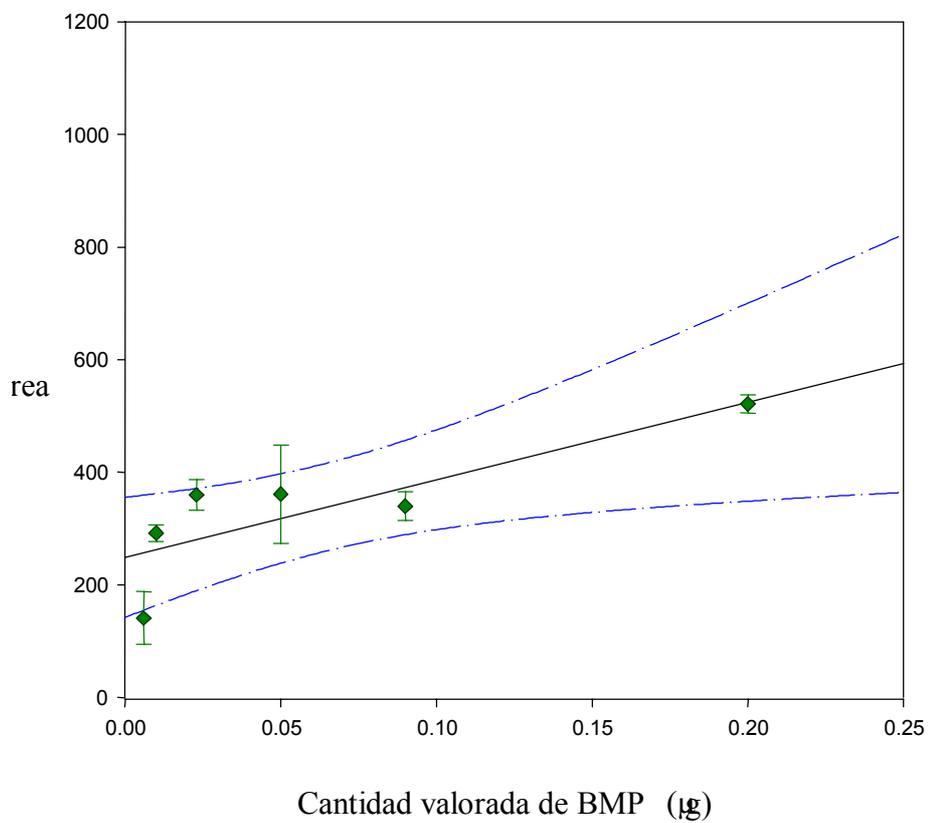


**Figura 3.7. Valoración de BMP por UV**

Representación gráfica de los ajustados entre la cantidad de Bemiparina (x) y el área (y) .

La ecuación del ajustado es (recta 2):

$$\text{Area} = 412 + 1733.63 \cdot \mu\text{g BMP} \quad (r = 0.77)$$



**Figura 3.8. Valoración de BMP por UV**

Representación gráfica de los ajustados entre la cantidad de Bemiparina (x) y el área (y).

La ecuación del ajustado es (recta 3):

$$\text{Area} = 248.71 + 1378.40 \cdot \mu\text{g BMP} \quad (r = 0.82)$$



### **3.2.2. VALORACIÓN DEL DISACÁRIDO MEDIANTE ABSORCIÓN EN ULTRAVIOLETA**

En primer lugar se prepararon 4 rectas patrón de disacárido con las concentraciones: 2, 1,  $5 \cdot 10^{-1}$ ,  $1 \cdot 10^{-1}$ ,  $5 \cdot 10^{-2}$  y  $1 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{g/ml}$ .

En la Cuadro 3.24 se detallan la precisión, expresada mediante el coeficiente de variación (CV%), tanto intra como interdía y la exactitud ( $E_{\text{max}}$ , %) en la detección para cada uno de los puntos de las rectas de disacárido patrón.

En el Cuadro 3.25 se detalla la pendiente, ordenada en origen, coeficiente de correlación, linealidad, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación respectivamente, para cada una de las rectas patrón de disacárido valoradas mediante los valores de absorbancia en el UV ( $\lambda = 232$  nm).

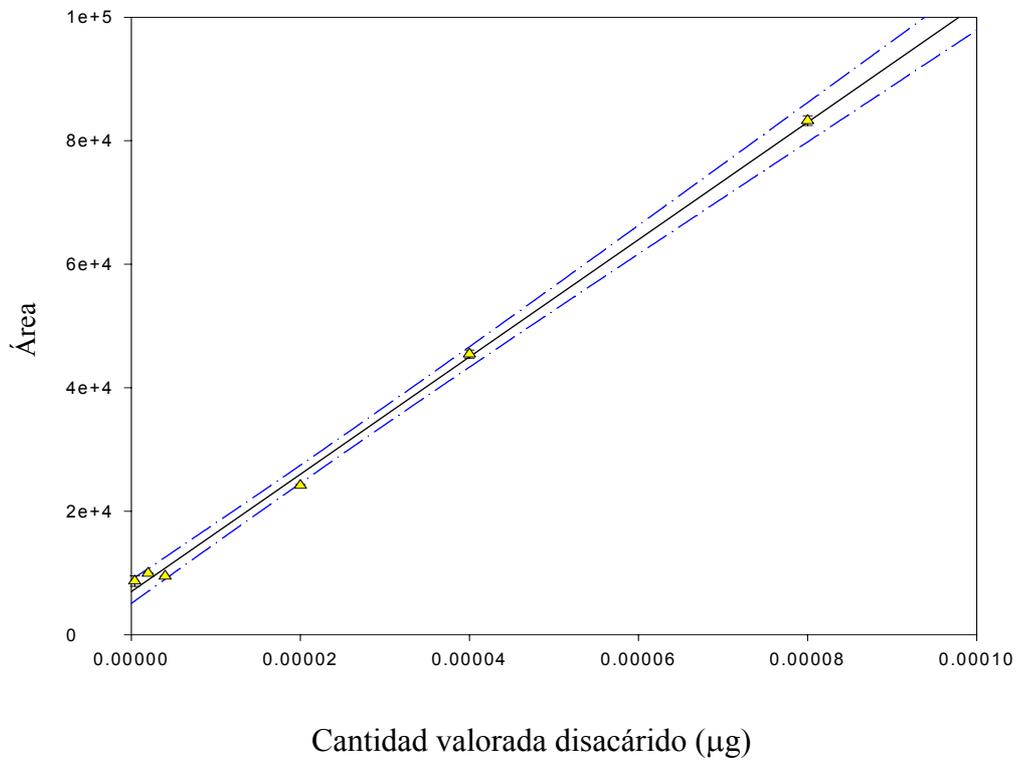
CONCENTRACIONES ESTIMADAS DISACÁRIDO ( $\mu\text{g/ml}$ ). VALORACIÓN POR UV									
INTRADIA									INTERDIA
$\mu\text{g/ml}$ Disac.	$C_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)	$C_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)	$C_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)	$C_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)	$E_{r \text{ max}}$	$E_{r \text{ max}}$	$E_{r \text{ max}}$	$E_{r \text{ max}}$	$C_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)
0.01	$0.04 \pm 2.25 \cdot 10^{-5}$	$0.04 \pm 4.15 \cdot 10^{-6}$	$0.004 \pm 9.42 \cdot 10^{-6}$	$0.02 \pm 4.37 \cdot 10^{-6}$	234.47	310.39	-152.47	106.12	$0.03 \pm 0.02$
	(0.05)	(0.01)	(0.21)	(0.02)					(70.67)
0.05	$0.07 \pm 1.23 \cdot 10^{-6}$	$0.06 \pm 1.80 \cdot 10^{-6}$	$0.02 \pm 2.32 \cdot 10^{-5}$	$0.07 \pm 1.33 \cdot 10^{-5}$	57.99	30.99	-102.74	75.50	$0.06 \pm 0.03$
	(0.001)	(0.002)	(0.14)	(0.02)					(55.53)
0.1	$0.07 \pm 2.25 \cdot 10^{-6}$	$0.11 \pm 6.00 \cdot 10^{-6}$	$0.09 \pm 1.22 \cdot 10^{-5}$	$0.13 \pm 1.25 \cdot 10^{-5}$	-36.42	18.65	-19.26	19.23	$0.10 \pm 0.03$
	(0.05)	(0.005)	(0.01)	(0.01)					(30.17)
0.5	$0.45 \pm 4.12 \cdot 10^{-6}$	$0.42 \pm 2.82 \cdot 10^{-5}$	$0.58 \pm 1.36 \cdot 10^{-5}$	$0.44 \pm 1.52 \cdot 10^{-5}$	-10.38	-22.07	20.27	-10.90	$0.47 \pm 0.07$
	(0.001)	(0.006)	(0.002)	(0.003)					(15.40)
1	$1.01 \pm 1.76 \cdot 10^{-5}$	$0.99 \pm 2.72 \cdot 10^{-6}$	$1.02 \pm 9.68 \cdot 10^{-6}$	$0.95 \pm 6.68 \cdot 10^{-6}$	2.67	-0.76	3.24	-5.58	$0.99 \pm 0.03$
	(0.002)	(0.0002)	(0.001)	(0.0007)					(3.12)
2	$2.00 \pm 2.03 \cdot 10^{-5}$	$2.02 \pm 5.07 \cdot 10^{-5}$	$1.97 \pm 3.11 \cdot 10^{-5}$	$2.03 \pm 2.72 \cdot 10^{-5}$	0.97	-2.13	-2.21	1.86	$2.00 \pm 0.02$
	(0.001)	(0.002)	(0.001)	(0.001)					(1.55)

**Cuadro 3.24.** Concentraciones teóricas valoradas y estimadas ( $C_{\text{estim}}$ ) de disacárido. Se muestra la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV %) intradía e interdía, así como el error relativo máximo ( $E_{r \text{ max}}$ ) para cada muestra.

<b>VALORACIÓN DEL DISACÁRIDO POR UV (0.01-2 µg/ml)</b>				
	<b>R 1</b>	<b>R 2</b>	<b>R 3</b>	<b>R 4</b>
<b>m (pendiente) ± EE</b>	$9.50 \cdot 10^5 \pm 2 \cdot 10^4$	$9.34 \cdot 10^5 \pm 2 \cdot 10^4$	$8.51 \cdot 10^5 \pm 2 \cdot 10^4$	$1.00 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^4$
<b>a (ordenada origen) ± EE</b>	$6984.91 \pm 768.60$	$4084.80 \pm 871.35$	$6404.78 \pm 1065.66$	$5453.07 \pm 1024.04$
<b>r (coef.correl.)</b>	0.999	0.996	0.997	0.998
<b>Linealidad (%)</b>	1.16	1.46	1.75	1.43
<b>Sensibilidad (µg)</b>	0.001	0.002	0.002	0.002
<b>L. Detección (µg)</b>	0.004	0.005	0.006	0.005
<b>L. Cuantificación (µg)</b>	0.01	0.02	0.02	0.02

**Cuadro 3.25.** Pendiente, ordenada en origen, coeficiente de correlación, linealidad, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación para cada una de las rectas patrón del disacárido, (0.01-2 µg/ml), valoradas por UV.

En las Figuras 3.9, 3.10, 3.11 y 3.12 se representan gráficamente los ajustados entre la cantidad de disacárido y el área obtenida para cada una de las rectas, junto con el intervalo de confianza del 95%.

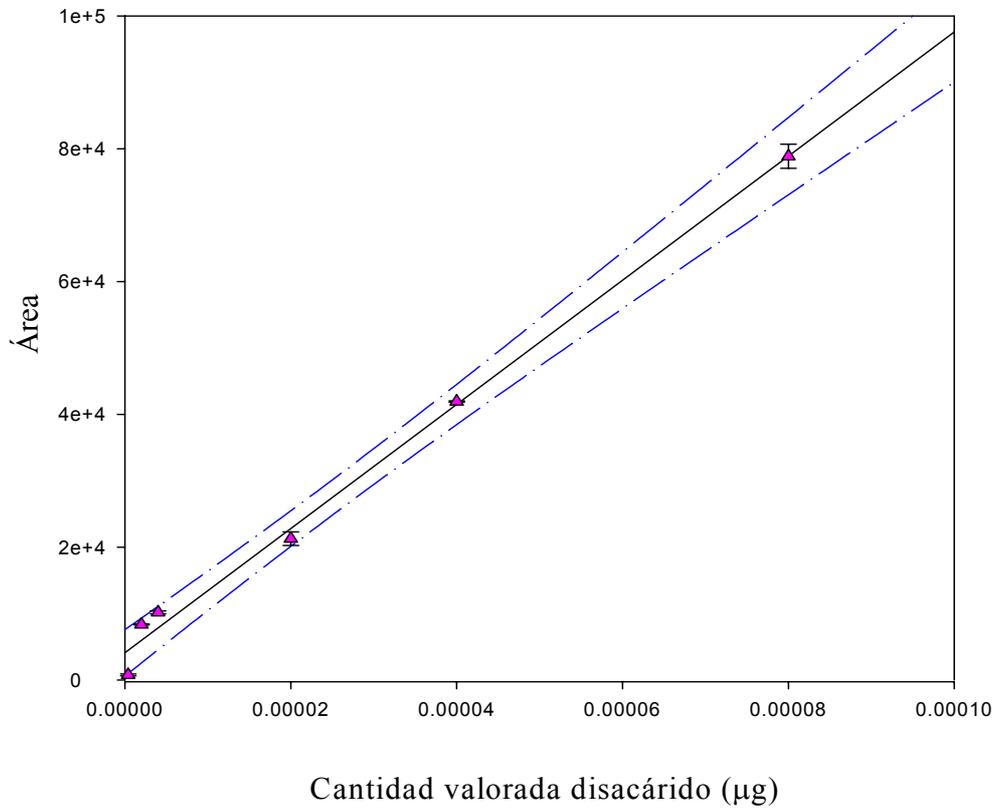


**Figura 3.9. Valoración del disacárido por UV**

Representación gráfica de los ajustados entre el área (y) y la cantidad de disacárido (x).

La ecuación del ajustado es (recta 1):

$$\text{Área} = 6984.91 + 950060584 \cdot \mu\text{g disacárido} \quad (r=0.999)$$

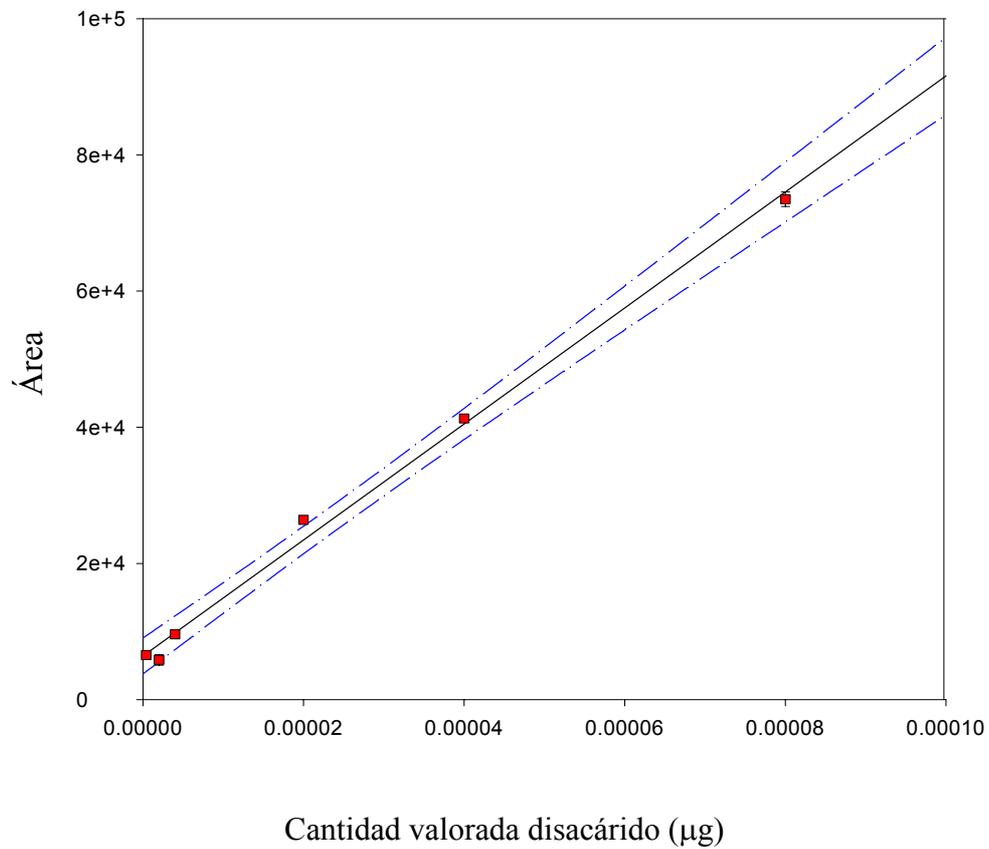


**Figura 3.10. Valoración del disacárido por UV**

Representación gráfica de los ajustados entre el área (y) y la cantidad de disacárido (x).

La ecuación del ajustado es (recta 2):

$$\hat{\text{Área}} = 4084.80 + 934835115 \cdot \mu\text{g disacárido} \quad (r=0.994)$$

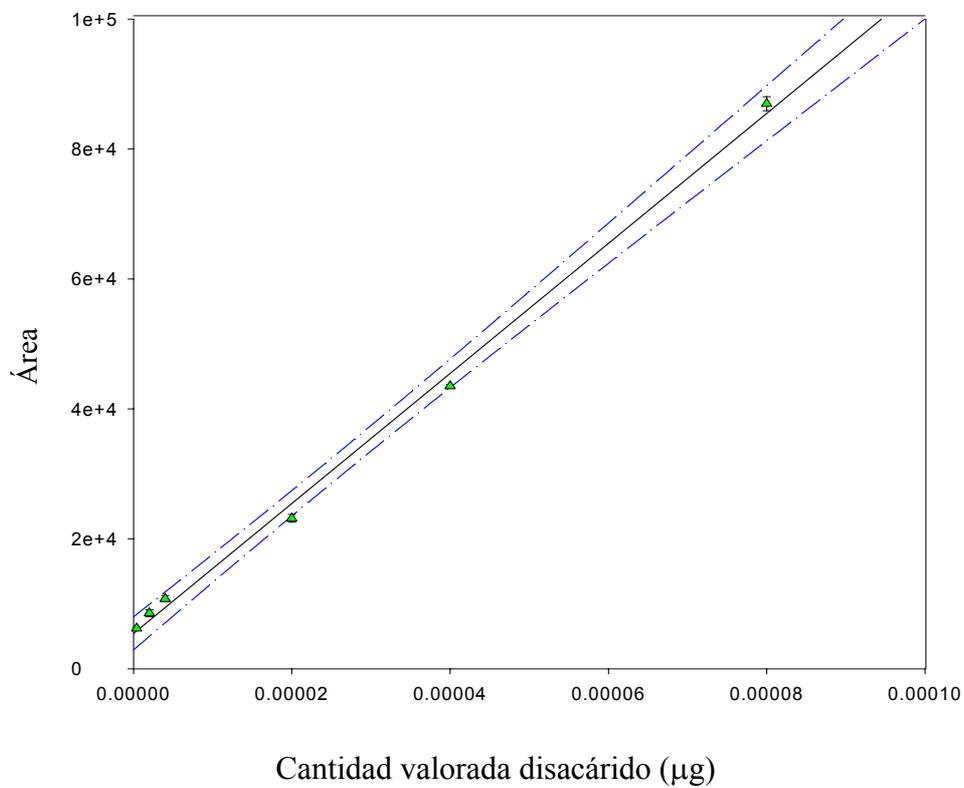


**Figura 3.11. Valoración del disacárido por UV**

Representación gráfica de los ajustados entre el área (y) y la cantidad de disacárido (x).

La ecuación del ajustado es (recta 3):

$$\text{Área} = 6404.78 + 851905278 \cdot \mu\text{g disacárido} \quad (r=0.996)$$



**Figura 3.12. Valoración el disacárido por UV**

Representación gráfica de los ajustados entre el área (x) y la cantidad de disacárido (x).

La ecuación del ajustado es (recta 4):

$$\text{Área} = 5453.07 + 1000511608 \cdot \mu\text{g disacárido} \quad (r=0.997)$$

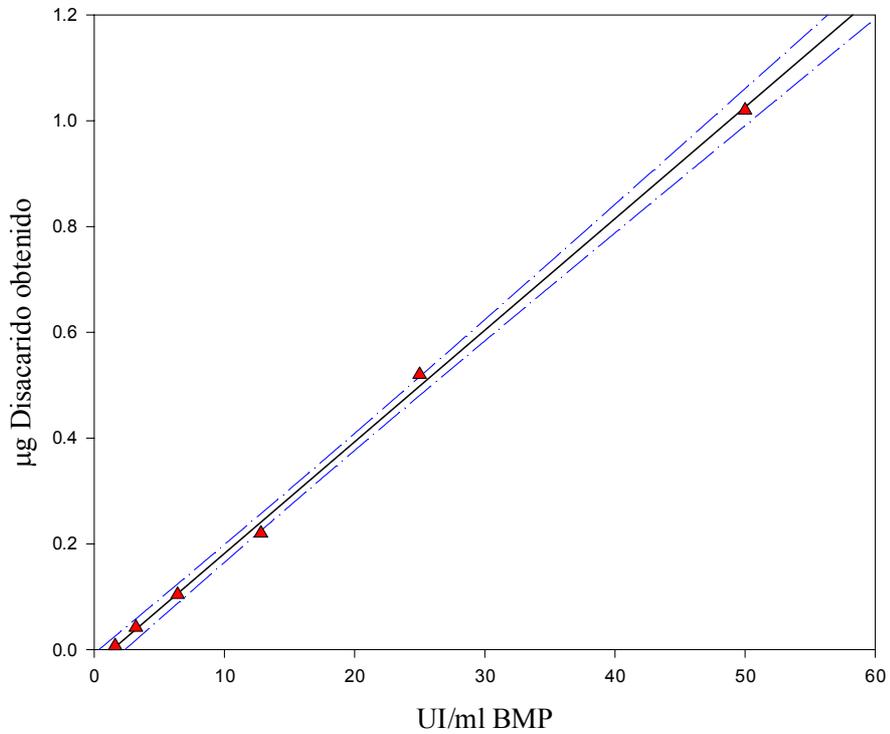
En segundo lugar, se valoró mediante detección ultravioleta, el disacárido resultante de la digestión de distintas concentraciones de Bemiparina sódica.

Interpolando las áreas obtenidas del disacárido producto de la digestión enzimática de la Bemiparina, en la recta patrón del disacárido se determinó la cantidad de disacárido obtenido. En la Figura 3.13 se ha representado la relación lineal entre la cantidad de disacárido obtenida y la concentración de BMP de las muestras de partida.

En el Cuadro 3.26 se detallan las UI/ml de partida, las UI valoradas y la cantidad correspondiente de BMP ( $\mu\text{g}$ ), así como los  $\mu\text{g}$  de disacárido producido por la digestión de las distintas concentraciones de Bemiparina. Como se observa, los  $\mu\text{g}$  de disacárido producido por cantidades de Bemiparina inferiores a 0.3  $\mu\text{g}$  son inferiores al límite de detección.

<b>UI/ml BMP</b>	<b>UI BMP Valoradas</b>	<b><math>\mu\text{g}</math> BMP</b>	<b><math>\mu\text{g}</math> Disacárido obtenido</b>
0.4	0.0064	0.07	---
0.8	0.013	0.15	---
1.6	0.026	0.3	$7 \cdot 10^{-3}$
3.2	0.051	0.6	0.04
6.4	0.10	1.2	0.11
12.8	0.21	2.3	0.22
25	0.4	5	0.52
50	0.8	9	1.02

**Cuadro 3.26.** UI/ml BMP de partida, cantidad de BMP valorada, expresada como UI y  $\mu\text{g}$ , y disacárido producido ( $\mu\text{g}$ ), determinado mediante detección por UV.



**Figura 3.13. Cálculo de la cantidad de BMP a partir de la valoración por UV del disacárido producto de la digestión**

Representación gráfica del ajustado entre la cantidad de disacárido ( $\mu\text{g}$ ) obtenido, producto de la digestión, y las UI/ml de Bemiparina de las muestras.

La ecuación del ajustado es:

$$\mu\text{g Disacárido obtenido} = -0.029 + 0.021 \cdot \text{UI/ml BMP} \quad (r = 0.999)$$

### **3.3. VALORACIÓN DEL DISACÁRIDO POR FLUORESCENCIA**

A partir del disacárido patrón,  $\alpha$ - $\delta$ UA-[1 $\rightarrow$ 4]-GlcNAc, se elaboraron tres rectas, con seis puntos de concentraciones conocidas (2, 1,  $5 \cdot 10^{-1}$ ,  $1 \cdot 10^{-1}$ ,  $5 \cdot 10^{-2}$  y  $1 \cdot 10^{-2}$   $\mu$ g/ml) y se valoraron mediante este método.

En la Cuadro 3.27 se detallan la precisión, expresada mediante el coeficiente de variación (CV%), tanto intra como interdía, y la exactitud ( $E_{r \max}$ , %) en la detección para cada uno de los puntos de las rectas de disacárido patrón.

En el Cuadro 3.28 se detalla la pendiente, ordenada en origen, coeficiente de correlación, linealidad, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación respectivamente, para cada una de las rectas patrón de disacárido valoradas mediante detección por fluorescencia.

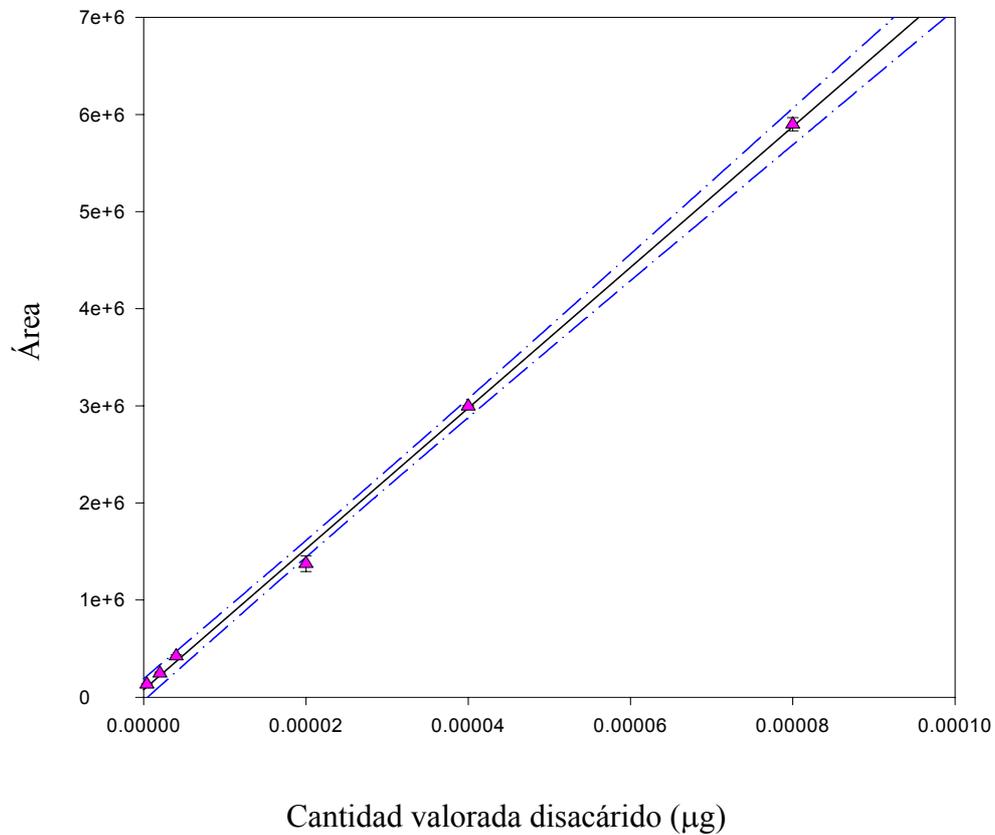
CONCENTRACIONES ESTIMADAS DISACÁRIDO ( $\mu\text{g/ml}$ ). VALORACIÓN FLUORESCENCIA							
INTRADIA							INTERDIA
$\mu\text{g/ml}$ Disac.	$C_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)	$C_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)	$C_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)	$E_{r \text{ max}}$	$E_{r \text{ max}}$	$E_{r \text{ max}}$	$C_{\text{estim}} \pm \text{DE}$ (CV%)
<b>0.01</b>	$0.03 \pm 1.92 \cdot 10^{-5}$ (0.06)	$0.02 \pm 1.99 \cdot 10^{-6}$ (0.01)	$0.03 \pm 8.77 \cdot 10^{-6}$ (0.04)	87.79	69.66	90.50	$0.02 \pm 0.01$ (48.33)
<b>0.05</b>	$0.06 \pm 8.30 \cdot 10^{-7}$ (0.001)	$0.05 \pm 3.51 \cdot 10^{-6}$ (0.006)	$0.06 \pm 6.47 \cdot 10^{-6}$ (0.01)	37.23	9.83	38.94	$0.06 \pm 0.01$ (10.72)
<b>0.1</b>	$0.11 \pm 4.98 \cdot 10^{-6}$ (0.004)	$0.11 \pm 4.13 \cdot 10^{-6}$ (0.003)	$0.13 \pm 8.00 \cdot 10^{-6}$ (0.06)	23.87	16.01	26.26	$0.12 \pm 0.01$ (9.90)
<b>0.5</b>	$0.44 \pm 4.80 \cdot 10^{-5}$ (0.01)	$0.44 \pm 2.79 \cdot 10^{-5}$ (0.006)	$0.47 \pm 4.89 \cdot 10^{-5}$ (0.01)	-16.67	-14.61	2.74	$0.45 \pm 0.01$ (2.59)
<b>1</b>	$0.98 \pm 1.12 \cdot 10^{-4}$ (0.01)	$1.00 \pm 2.62 \cdot 10^{-6}$ (0.0002)	$0.93 \pm 9.90 \cdot 10^{-5}$ (0.01)	-9.11	0.8	-8.13	$0.97 \pm 0.04$ (3.72)
<b>2</b>	$2.02 \pm 5.77 \cdot 10^{-6}$ (0.0003)	$2.00 \pm 2.34 \cdot 10^{-5}$ (0.001)	$2.03 \pm 1.54 \cdot 10^{-4}$ (0.007)	1.25	0.3	5.36	$2.02 \pm 0.02$ (0.76)

**Cuadro 3.27.** Concentraciones teóricas valoradas y estimadas ( $C_{\text{estim}}$ ) de disacárido. Se muestra la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV %) intradía e interdía, así como el error relativo máximo ( $E_{r \text{ max}}$ ) para cada muestra.

<b>VALORACIÓN DEL DISACÁRIDO POR FLUORESCENCIA (0.01-2 µg/ml)</b>			
	<b>R 1</b>	<b>R 2</b>	<b>R 3</b>
<b>m (pendiente) ± EE</b>	$7.25 \cdot 10^7 \pm 1 \cdot 10^6$	$6.80 \cdot 10^7 \pm 3 \cdot 10^6$	$7.17 \cdot 10^7 \pm 1 \cdot 10^6$
<b>a (ordenada origen) ± EE</b>	$77407.16 \pm 45450.3$	$60106.20 \pm 113348.95$	$73298.20 \pm 49083.31$
<b>r (coef.correl.)</b>	0.999	0.992	0.998
<b>Linealidad (%)</b>	1.80	0.94	2.59
<b>Sensibilidad (µg)</b>	0.0022	0.0011	0.0031
<b>L. Detección (µg)</b>	0.0063	0.0033	0.0091
<b>L. Cuantificación (µg)</b>	0.0210	0.0110	0.0103

**Cuadro 3.28.** Pendiente, ordenada en origen, coeficiente de correlación, linealidad, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación para cada una de las rectas patrón de disacárido, 0.01-2 µg/ml, valorado por fluorescencia.

En las Figuras 3.14, 3.15 y 3.16 se representan gráficamente los ajustados entre el área obtenida y la cantidad de disacárido de cada una de las rectas en el ámbito de concentraciones ensayado, así como el intervalo de confianza del 95%.

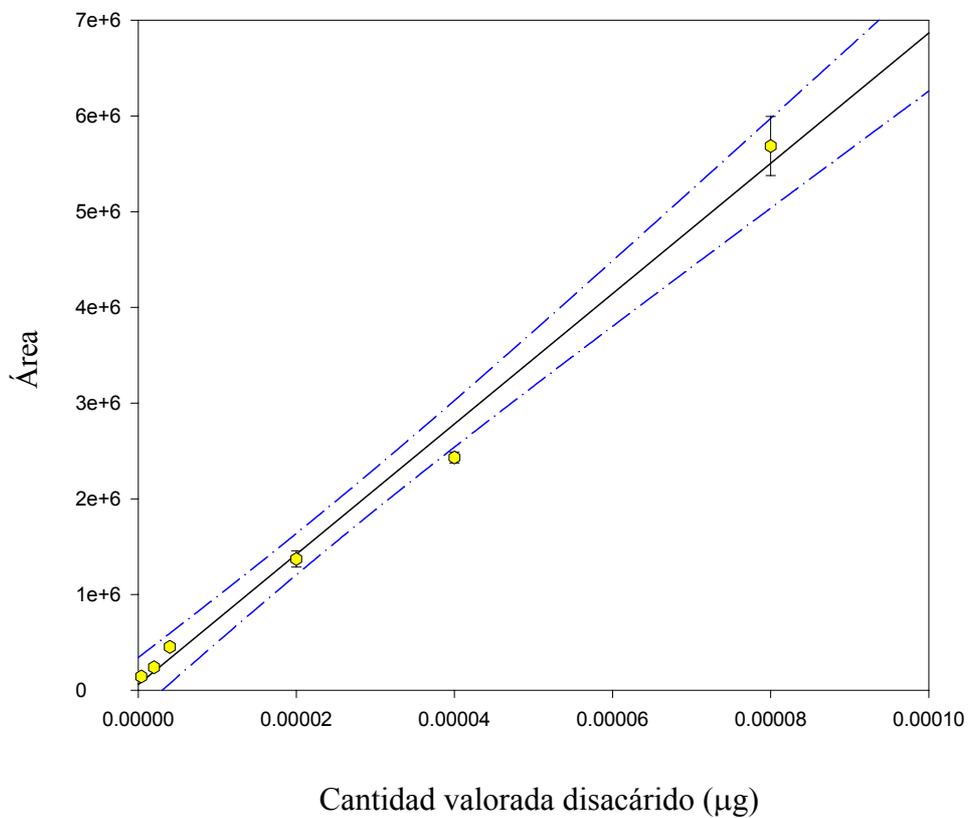


**Figura 3.14. Valoración del disacárido por fluorescencia**

Representación gráfica de los ajustados entre el área (y) y la cantidad de disacárido (x).

La ecuación del ajustado es (recta 1):

$$\text{Área} = 77407.16 + 7.25 \cdot 10^{10} \cdot \mu\text{g disacárido} \quad (r = 0.999)$$

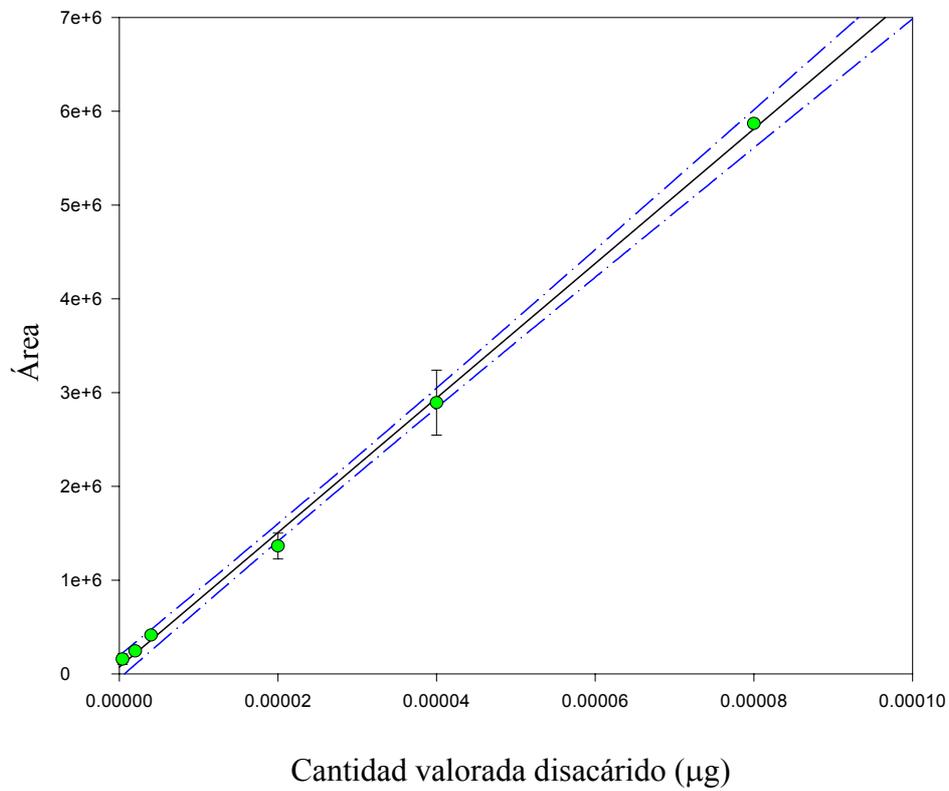


**Figura 3.15. Valoración del disacárido por fluorescencia**

Representación gráfica de los ajustados entre el área (x)  
y la cantidad de disacárido (y).

La ecuación del ajustado es (recta 2):

$$\text{Área} = 60106.20 + 6.80 \cdot 10^{10} \cdot \mu\text{g disacárido} \quad (r=0.992)$$



**Figura 3.16. Valoración del disacárido por fluorescencia**

Representación gráfica de los ajustados entre el área (y)  
y la cantidad de disacárido (x).

La ecuación del ajustado es (recta 3):

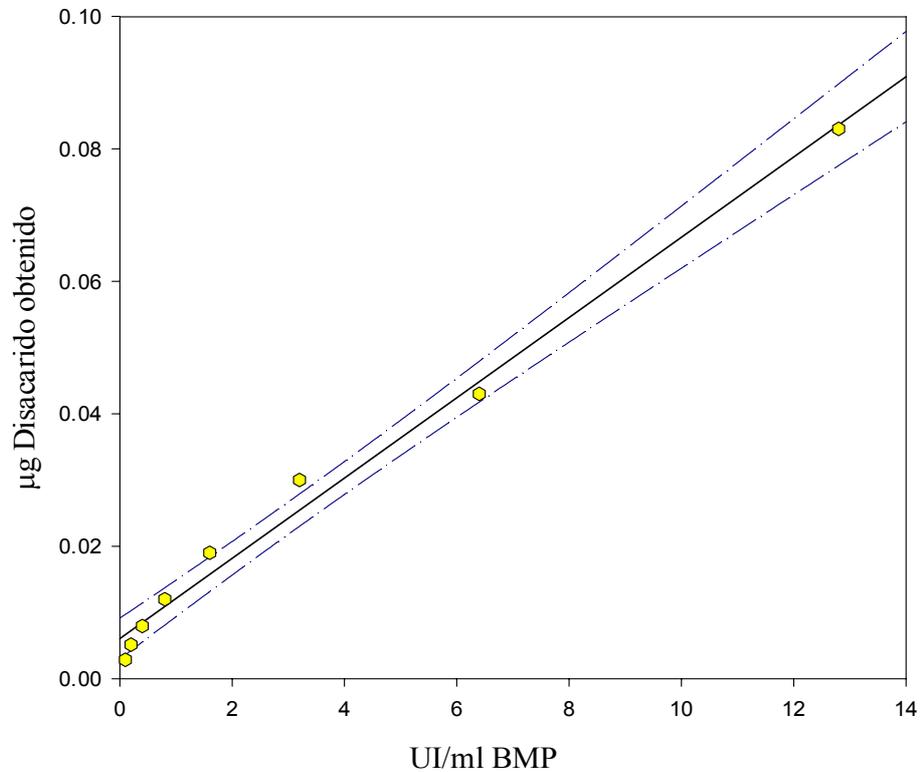
$$\text{Área} = 73298.20 + 7.17 \cdot 10^{10} \cdot \mu\text{g disacárido} \quad (r=0.998)$$

Interpolando las áreas obtenidas en la valoración de la digestión enzimática de la Bemiparina, en la recta patrón del disacárido se determina la cantidad de disacárido producida por las muestras de BMP. En la Figura 3.18 se muestra la relación que existe entre la cantidad de disacárido obtenida y la concentración de Bemiparina inicial de las muestras. Como puede observarse, la concentración de BMP de 0.1 UI/ml queda fuera del intervalo de confianza de la recta de regresión.

En el Cuadro 3.29. se detallan las UI/ml de partida de BMP, las UI valoradas y la cantidad correspondiente de BMP ( $\mu\text{g}$ ), así como los  $\mu\text{g}$  de disacárido producido por la digestión de las muestras para las distintas concentraciones de Bemiparina

<b>UI/ml BMP</b>	<b>UI BMP valoradas</b>	<b><math>\mu\text{g}</math> BMP</b>	<b><math>\mu\text{g}</math> Disacárido obtenido</b>
0.1	0.0016	0.018	$2.8 \cdot 10^{-3}$
0.2	0.0032	0.037	$5.1 \cdot 10^{-3}$
0.4	0.0064	0.07	$7.9 \cdot 10^{-3}$
0.8	0.0128	0.14	0.01
1.6	0.0256	0.29	0.02
3.2	0.0512	0.58	0.03
6.4	0.1024	1.17	0.04
12.8	0.2048	2.34	0.08

**Cuadro 3.29.** UI/ml BMP de partida, cantidad de BMP valorada, expresada como UI y  $\mu\text{g}$ , y disacárido producido ( $\mu\text{g}$ ) determinado mediante detección de fluorescencia.



**Figura 3.18. Cálculo de la cantidad de BMP a partir de la valoración por fluorescencia del disacárido producto de la digestión**

Representación gráfica de los ajustados entre la cantidad de disacárido ( $\mu\text{g}$ ) obtenido, producto de la digestión, y las UI/ml de Bemiparina de las muestras.

La ecuación del ajustado es:

$$\mu\text{g Disacárido obtenido} = 6.05 \cdot 10^{-3} + 6.06 \cdot 10^{-3} \cdot \text{UI/ml BMP} \quad (r = 0.995)$$

## ***Capítulo: Discusión***

## 4.1. ENSAYOS DE PERMEABILIDAD

La heparina, derivados heparinoides y heparinas de bajo molecular se utilizan habitualmente en el tratamiento, por vía tópica, de alteraciones de la permeabilidad vascular, trombosis superficial y procesos inflamatorios (Kopenhagen, K., y col., 1992; Li, X., Cooley, BC., Gould, JS., 1992).

La heparina no fraccionada parece improbable, debido a su elevado peso molecular, que pueda atravesar la barrera cutánea. No obstante, la administración por vía tópica de heparinas de bajo peso molecular, como la Enoxaparina (aproximadamente PM.6000 D.) permite considerar la posibilidad de utilizar esta vía de administración (Xiong, GL., Quan, D. y Maibach, HI., 1996) para ésta y otras heparinas de bajo peso molecular.

Por ello, se planteó estudiar la absorción percutánea de la Bemiparina (PM.3500 D.) con objeto de buscar una vía alternativa a la administración subcutánea, para inducir efectos sistémicos.

A continuación se discuten los resultados obtenidos en los ensayos “*in vitro*” e “*in vivo*”.

### 4.1.1. ENSAYOS “*IN VITRO*”

En primer lugar se realizó un estudio estadístico de la **concentración de Bemiparina presente en el compartimento receptor**, para los distintos geles ensayados. Este análisis de inferencia estadístico determina si las cantidades de Bemiparina valoradas en los receptores difieren significativamente del valor cero UI anti-Xa/ml. En la Cuadro 4.1 se muestran los resultados del análisis estadístico.

% BMP	n° de ensayos	UI anti-Xa/ml Receptor Media DE	Comparación 0 UI anti-Xa/ml	Comparación 0.1 UI anti-Xa/ml
0	6	0.005 (0.004)	S (p=0.036)	S (p=0.0003)
0.1	7	0.007 (0.001)	S (p=0.0001)	S (p=0.0001)
0.15	5	0.009 (0.006)	S (p=0.030)	S (p=0.0004)
0.25	6	0.032 (0.030)	S (p=0.040)	S (p=0.00002)
0.5	10	0.020 (0.019)	S (p=0.011)	S (p=2.3·10 <sup>-10</sup> )
1	10	0.068 (0.072)	S (p=0.016)	NS (p=0.216)

**Cuadro 4.1.** Análisis estadístico de los resultados de cantidad de Bemiparina en el compartimento receptor en los ensayos *in vitro* (S, p<0.05) (S = Diferencias estadísticamente significativas, NS = No existen diferencias estadísticamente significativas).

Las concentraciones valoradas en el compartimento receptor tras 8 h de ensayo, fueron superiores a 0 UI anti-Xa/ml con las cinco formulaciones ensayadas.

Estudios realizados en la prevención del tromboembolismo venoso recomiendan niveles plasmáticos de 0.1-0.2 UI anti-Xa/ml tras 4 horas de la inyección subcutánea para las heparinas de bajo peso molecular (*Duplaga, BA., Rivers, CW., Nutescu, E., 2001; Agnelli, G. y col., 1995*). Así, la Clivarina® (Reviparina sódica, PM.3900 D.), heparina de bajo peso molecular, tras la administración subcutánea de 1750 UI anti-Xa/día, proporciona niveles plasmáticos con una actividad de 0.1 UI anti-Xa/ml, lo que permite afirmar que, en lo concerniente a la prevención del tromboembolismo venoso postoperatorio puede considerarse tan efectiva como 10 UI anti-Xa/día de heparina no fraccionada (*Kakkar, VV. y col., 1997*).

Así pues, las cantidades acumuladas en el compartimento receptor se compararon con el valor 0.1 UI anti-Xa/ml; con el fin de predecir si mediante la aplicación sobre la piel de los geles ensayados podrían alcanzarse niveles plasmáticos en el ámbito terapéutico indicado. Excepto para el gel de 1%, en todos los demás casos se observaron diferencias significativas, aunque, como se puede observar, las cantidades de Bemiparina en el compartimento receptor en estos casos son bastante inferiores al valor de 0.1 UI anti-Xa/ml.

Cuando se comparan entre sí las concentraciones acumuladas en el compartimento receptor en los ensayos realizados con los distintos geles (Cuadro 4.2), el análisis estadístico muestra que sólo los geles con 0.5 y 1% de BMP proporcionan niveles, en el compartimento receptor, superiores a los proporcionados por el gel control. Así pues, a partir de los análisis efectuados se puede concluir que el gel de concentración 1% de BMP es el único que permite obtener concentraciones en receptor de alrededor de 0.1 UI/ml.

Hay que destacar que los resultados obtenidos presentan en muchos casos gran variabilidad, con coeficientes de variación superiores al 85% (Cuadros 3.3-3.13 de Resultados).

<b>Gel BMP</b>	<b>0</b>	<b>0.1</b>	<b>0.15</b>	<b>0.25</b>	<b>0.5</b>
<b>0.1</b>	NS	--	--	--	--
<b>0.15</b>	NS	NS	--	--	--
<b>0.25</b>	NS	NS	NS	--	--
<b>0.5</b>	S	S	NS	NS	--
<b>1.0</b>	S	S	NS	NS	NS

**Cuadro 4.2.** Comparación estadística, aplicando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, entre las concentraciones acumuladas en el compartimento receptor obtenidas con los diferentes geles ensayados.

En segundo lugar se procedió a efectuar un estudio estadístico de las **cantidades de Bemiparina presentes en epidermis**, en los ensayos llevados a cabo con los distintos geles, resultados que se muestran en el Cuadro 4.3. Con este análisis se estudió si las cantidades de Bemiparina valoradas en epidermis diferían significativamente del valor cero y del valor 0.41 (UI anti-Xa/cm<sup>2</sup>). El valor de 0.41 resulta de adicionar 0.1 UI anti-Xa/cm<sup>2</sup> al valor obtenido con las muestras control (0.31). Esta segunda comparación ha tenido por objetivo determinar la posible utilidad de estos geles en la terapéutica local. Para ello se partió de la hipótesis según la cual, cantidades alrededor de 0.1 UI anti-Xa/cm<sup>2</sup> de epidermis podrían ejercer un efecto terapéutico en la zona de aplicación. Dado que, no existe bibliografía en relación con la cantidad de heparina que debería existir en el tejido cutáneo para conseguir una acción localizada, se ha elegido este valor por analogía con los niveles plasmáticos eficaces que se comentan en el epígrafe anterior.

% BMP	nº de ensayos	UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> de epidermis Media (DE)	Comparación cero UI anti-Xa/cm <sup>2</sup>	Comparación 0.41 UI anti-Xa/cm <sup>2</sup>
0	6	0.31 (0.05)	S (p=0.0003)	S (p=0.004)
0.1	10	0.93 (0.14)	S (p=0.0007)	S (p=0.0005)
0.15	4	0.47 (0.05)	S (p=0.0004)	NS (p=0.131)
0.25	8	0.55 (0.29)	S (p=0.003)	NS (p=0.052)
0.5	10	0.33 (0.25)	S (p=0.003)	NS (p=0.140)
1	11	0.49 (0.28)	S (p=3.5·10 <sup>-4</sup> )	NS (p=0.364)

**Cuadro 4.3.** Análisis estadístico de los resultados de cantidad de Bemiparina en epidermis en los ensayos *in vitro* (S, p<0.05) (S = Diferencias estadísticamente significativas, NS = No existen diferencias estadísticamente significativas.).

Como puede observarse en el Cuadro 4.3, a partir de los geles de BMP ensayados (concentración 0.1, 0.15, 0.25, 0.5 y 1%) las cantidades de Bemiparina determinadas en epidermis son significativamente superiores a cero en todos los casos.

Por otra parte, se puede asumir que la cantidad de Bemiparina presente en epidermis a partir de cualquiera de los geles ensayados no difiere significativamente de 0.41 UI anti-Xa/cm<sup>2</sup>, cantidad que, en principio, es la que se ha considerado adecuada para desarrollar en efecto terapéutico local. No parece lógico admitir que el gel de menor concentración (0.1%) sea el que proporcione cantidades más elevadas de Bemiparina en epidermis.

En resumen, si bien la BMP penetra en la piel, los anteriores resultados muestran que resulta difícil cuantificar con exactitud la cantidad que en ella se acumula, dado que se obtienen coeficientes de variación superiores al 50% para algunas muestras de piel (Cuadros 3.2-3.12 de Resultados).

#### **4.1.2. ENSAYOS “*IN VIVO*”**

Puesto que el gel de 0.5% de BMP proporcionó cantidades en compartimento receptor superiores a las del gel control (Cuadro 4.1) se decidió administrarlo a un grupo de animales. Asimismo se seleccionó el gel de 0.25% de BMP para realizar estos mismos ensayos porque, aunque el valor obtenido no difiere del control (por su variabilidad), presenta un valor de tendencia central superior al de concentración 0.5%.

En el Cuadro 4.4 se resumen los resultados del análisis estadístico realizado con las **concentraciones de Bemiparina determinadas en las muestras de plasma** extraídas tras 4 y 8 horas de la aplicación de los geles. Las comparaciones se efectuaron con cero UI y 0.1 UI anti-Xa/ml, con el fin de determinar la existencia de niveles plasmáticos de BMP capaces de ejercer un efecto terapéutico.

<b>% BMP en gel</b>	<b>Tiempo tras aplicación (h)</b>	<b>n° ensayos</b>	<b>UI anti-Xa/ml plasma Media (DE)</b>	<b>Comparación 0 UI anti-Xa/ml</b>	<b>Comparación 0.1 UI anti-Xa/ml</b>
0.5	4	11	0.071 (0.044)	S (p=0.0001)	NS (p=0.052)
0.5	8	4	0.054 (0.024)	S (p=0.02)	S (p=0.030)
0.25	4	8	0.093 (0.043)	S (p=0.0001)	NS (p=0.678)
0.25	8	8	0.070 (0.016)	S (p=0.0001)	S (p=0.001)

**Cuadro 4.4.** Comparación estadística (prueba t-Student) de la cantidad de Bemiparina en plasma en los ensayos *in vivo* (4 y 8 horas) y los valores de referencia 0 y 0.1 UI anti-Xa/ml.

Como puede observarse en el Cuadro 4.4, la aplicación de ambos geles, 0.25 y 0.5%, proporciona una concentración de Bemiparina en plasma significativamente diferente de cero UI anti-Xa/ml transcurridas 4 y 8 horas de la administración. A las 4 horas de su aplicación la concentración de Bemiparina en plasma, para ambos geles, no difiere significativamente del valor 0.1 UI anti-Xa/ml, mientras que a las 8 horas es inferior a este valor.

A partir de los resultados obtenidos parece probable que ambos geles de BMP sean capaces de ejercer cuanto menos una acción local y quizá puedan llegar a proporcionar niveles plasmáticos de alrededor de 0.1 UI/ml, que resultan adecuados para la prevención del tromboembolismo.

Se realizó un análisis estadístico de comparación múltiple entre las **cantidades de Bemiparina (UI anti-Xa/cm<sup>2</sup>) en piel** transcurridas 4 y 8 horas tras la administración de ambos geles (Cuadro 4.5). En este análisis se incluyeron los valores de actividad anti-Xa/cm<sup>2</sup> de piel determinados en la zona de piel denominada control, en la cual no se aplicó gel, con el fin de determinar el gel más eficaz de los ensayados.

**COMPARACIÓN CANTIDADES DE BEMIPARINA EN EPIDERMIS**

		Control	Gel 0.25%		Gel 0.5%	
			4h	8h	4h	8h
<b>Gel 0.25%</b>	<b>4h</b>	NS	-	-	-	-
	<b>8h</b>	NS	NS		-	-
<b>Gel 0.5%</b>	<b>4h</b>	<b>S (p=0.029)</b>	NS	NS	-	-
	<b>8h</b>	<b>S (p=0.01)</b>	NS	NS	NS	-

**Cuadro 4.5.** Comparación estadística entre las cantidades de Bemiparina acumuladas en epidermis en los ensayos *in vivo*.



Como puede observarse (Cuadro 4.5) tras 4 y 8 h de administración del gel de concentración 0.5% las muestras de piel proporcionan una actividad anti-Xa/cm<sup>2</sup> significativamente superior a la actividad del control. Sin embargo para el gel de concentración 0.25% esta actividad anti-Xa/cm<sup>2</sup> no difiere significativamente del control.

Con el fin de determinar la eficacia de la aplicación tópica para el gel de concentración 0.5%, las cantidades de Bemiparina valoradas en piel transcurridas 4 y 8 horas de la aplicación se compararon estadísticamente con el valor 0.53 UI anti-Xa/cm<sup>2</sup>. Este último valor que corresponde al que resulta de añadir a 0.1UI anti-Xa/cm<sup>2</sup> (cantidad que se ha estimado adecuada para un efecto local) la cantidad de Bemiparina valorada en las muestras control (0.43±0.13). En el Cuadro 4.6 se resumen los resultados del análisis estadístico correspondiente a la prueba t de Student.

%BMP en gel	Tiempo tras aplicación (h)	n° ensayos	UI anti-Xa/cm <sup>2</sup> piel Media (DE)	Comparación 0.53 UI anti-Xa/cm <sup>2</sup>
0.5	4	12	1.09 (0.74)	S (p=0.023)
0.5	8	11	1.19 (0.84)	S (p=0.027)

**Cuadro 4.6.** Comparación, mediante la prueba t-Student, entre la cantidad de Bemiparina acumulada en epidermis en los ensayos *in vivo* y el valor de referencia 0.53 UI anti-Xa/cm<sup>2</sup> (S, p< 0.05).

Como puede observarse en el Cuadro 4.6, las cantidades de Bemiparina en piel son significativamente superiores de 0.53 UI anti-Xa/cm<sup>2</sup> tanto a las 4 h como a las 8 horas post aplicación del gel.

## **4.2. VALORACIÓN DE LA BMP MEDIANTE CLAE: ABSORCIÓN UV**

Es posible intuir, a partir de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, que la Bemiparina penetra a través de la piel. No obstante, no se puede considerar concluyente ya que los resultados presentan gran variabilidad. Si bien habitualmente los estudios de penetración a través de piel presentan variabilidades elevadas, nosotros consideramos que en mayor medida la variabilidad es debida al método de valoración, que se puede considerar adecuado para valorar concentraciones que no sean muy inferiores a 0.1 UI anti-Xa/ml, pero no para valores del orden de los obtenidos en el presente trabajo.

Además, actualmente, en el ámbito hospitalario la monitorización de la actividad anti-Xa se realiza a través de kits cromogénicos comercializados por distintos fabricantes. Los resultados obtenidos con estos métodos no son intercambiables, puesto que, para una misma muestra los valores de actividad anti-Xa difieren según el fabricante, pudiendo llevar a error en la dosificación (*Kovacs, MJ. y col., 1999*).

Por este motivo se intentó buscar métodos alternativos, empleando la cromatografía líquida de alta resolución (CLAE), que permitieran cuantificar, de un modo más fiable las muestras obtenidas.

En primer lugar se desarrollaron dos métodos de valoración por espectrometría UV con el fin de mejorar la sensibilidad del método basado en la determinación de la actividad anti-Xa.

Uno de ellos consistió en la valoración de la BMP directamente a partir de las áreas del pico de absorción en la longitud de onda seleccionada. Inicialmente se prepararon rectas de calibración entre 12.8-0.4 UI/ml. El análisis de los resultados obtenidos, para este ámbito de concentraciones

ensayadas de BMP, muestra una excelente precisión, así como un excelente coeficiente de correlación ( $r > 0.99$ ).

No obstante, dado que el ámbito de concentraciones ensayado se encuentra alejado de las concentraciones de BMP obtenidas en los ensayos de penetración *in vitro* e *in vivo*, se procedió a determinar mediante esta técnica de valoración, un ámbito de concentración comprendido entre 0.4 y 0.0125 UI/ml de BMP. Este método cromatográfico presenta un coeficiente de correlación de 0.83, la precisión y exactitud obtenidas en este ámbito de concentraciones resulta inaceptable. Por ello, se puede concluir que mediante este método sólo es posible detectar cantidades de BMP superiores a 0.86 UI/ml (0.43 µg) y cuantificar cantidades de BMP alrededor de 2.86 UI/ml (1.43 µg). El análisis de los resultados obtenidos indica que este método, rápido y económico, podría tener aplicación en controles de calidad en laboratorio.

<b>ÁMBITO ENSAYADO</b>		
	<b>0.0125-0.4 UI/ml 6·10<sup>-3</sup>-0.2 µg</b>	<b>0.4-12.8 UI/ml 0.2-5.9 µg</b>
<b>m (pendiente)</b>	2.15·10 <sup>6</sup>	1.16·10 <sup>8</sup>
<b>a (ordenada origen)</b>	268	-42079.52
<b>r (coef.correl.)</b>	0.83	0.99
<b>Linealidad (%) ± DE</b>	19.39 ± 4.76	2.88 ± 0.66
<b>Sensibilidad (µg) ± DE</b>	0.05 ± 0.01	0.26 ± 0.05
<b>L. Detección (µg) ± DE</b>	0.14 ± 0.05	0.43 ± 0.15
<b>L. Cuantificación (µg) ± DE</b>	0.48 ± 0.10	1.43 ± 0.51

**Cuadro 4.7.** Resumen de los valores medios de pendiente, ordenada en el origen, coeficiente de correlación, linealidad, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación, para los dos ámbitos de concentraciones de BMP ensayados, empleando el método de valoración directa de BMP por UV.

Dado que sólo fue posible cuantificar cantidades de BMP por encima de 2.86 UI/ml, se procedió a la digestión enzimática de la BMP y posterior valoración del disacárido obtenido mediante detección UV. La recta obtenida para el disacárido patrón muestra una excelente linealidad para el ámbito de concentraciones ensayado ( $r > 0.99$ ) y el límite de detección y el de cuantificación obtenidos para el disacárido fueron de 0.005  $\mu\text{g}$  y 0.017  $\mu\text{g}$ , respectivamente

<b>ÁMBITO ENSAYADO</b>	
<b><math>1 \cdot 10^{-2} - 2 \mu\text{g/ml}</math></b>	
<b>m (pendiente)</b>	$9.34 \cdot 10^5$
<b>a (ordenada origen)</b>	932.41
<b>r (coef.correl.)</b>	0.998
<b>Linealidad (%) <math>\pm</math> DE</b>	$1.45 \pm 0.24$
<b>Sensibilidad (<math>\mu\text{g}</math>) <math>\pm</math> DE</b>	$0.0018 \pm 0.0005$
<b>L. Detección (<math>\mu\text{g}</math>) <math>\pm</math> DE</b>	$0.005 \pm 0.0008$
<b>L. Cuantificación (<math>\mu\text{g}</math>) <math>\pm</math> DE</b>	$0.017 \pm 0.005$

**Cuadro 4.8.** Resumen de los valores medios de pendiente, ordenada en el origen, coeficiente de correlación, linealidad, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación, para el ámbito de concentraciones de disacárido ensayado, (0.01-2  $\mu\text{g/ml}$ ) valorado por detección ultravioleta.

La valoración posterior del producto de la digestión de la BMP permitió detectar cantidades de BMP hasta aproximadamente 1 UI/ml de BMP y cuantificar a partir de concentraciones ligeramente superiores a 1.6 UI/ml de BMP (Cuadro 3.26 del capítulo Resultados). La valoración del disacárido producto de la digestión de la BMP por UV ha resultado ser menos sensible

que la valoración de la BMP directamente. Por tanto, esta metodología está lejos de representar ventajas respecto a la determinación de la actividad anti-Xa, método de valoración propuesto por la Real Farmacopea Española, que permite cuantificar muestras de concentración inferior a 0.2 UI/ml.

#### **4.3. VALORACIÓN DE LA BMP MEDIANTE CLAE: DETECCIÓN FLUORESCENCIA**

Dado que normalmente la detección mediante fluorescencia permite obtener una mejor sensibilidad que el método por UV, se preparó una recta de calibración del disacárido patrón ( $1 \cdot 10^{-2}$ -2·µg/ml), el cual fue sometido a una reacción de derivatización para su posterior detección mediante fluorescencia.

<b>ÁMBITO CONCENTRACIÓN</b>	
<b><math>1 \cdot 10^{-2}</math>-2· µg/ml</b>	
<b>m (pendiente)</b>	7.07·10 <sup>7</sup>
<b>a (ordenada origen)</b>	69294.18
<b>r (coef.correl.)</b>	0.996
<b>Linealidad (%) ± DE</b>	1.77 ± 0.82
<b>Sensibilidad (µg) ± DE</b>	0.002 ± 0.001
<b>L. Detección (µg) ± DE</b>	0.006 ± 0.003
<b>L. Cuantificación (µg) ± DE</b>	0.0099 ± 0.006

**Cuadro 4.9.** Resumen de los valores medios de pendiente, ordenada en el origen, coeficiente de correlación, linealidad, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación, para el ámbito de concentraciones de disacárido ensayado, detectado por fluorescencia.

En este caso también se obtuvo una excelente linealidad ( $r > 0.99$ ) y un límite de detección y cuantificación de  $0.006 \mu\text{g}$  y  $0.0099 \mu\text{g}$ , respectivamente (Cuadro 4.9), valores ligeramente inferiores a los obtenidos por detección UV.

Sin embargo, este límite de cuantificación es sensiblemente superior al obtenido por Toyoda, H. y col. (1997), cuyo límite se situó en  $0.005 \mu\text{g}$ . Hay que destacar que estos autores no cuantifican la heparina a través de la valoración de un único disacárido, sino como suma de varios de ellos, entre los que se encuentra el empleado en los ensayos del presente trabajo, con el fin de mejorar la sensibilidad del método de valoración.

La digestión de las muestras de BMP permite detectar, siguiendo este procedimiento, cantidades de BMP próximas a  $0.1 \text{ UI/ml}$  ( $0.018 \mu\text{g BMP}$ ) y cuantificar a partir de  $0.4 \text{ UI/ml}$ .

La determinación de los productos de la digestión de la Bemiparina empleando la detección por fluorescencia resulta más sensible que su valoración por ultravioleta. Los límites de detección y cuantificación de este método son ligeramente inferiores a los obtenidos en la valoración de la BMP directamente por absorción en el UV. Pero la valoración por fluorescencia tampoco supone una mejora respecto al método de valoración de la BMP mediante la determinación de la actividad anti-Xa.

El método de digestión enzimática y detección por fluorescencia podría llegar a ser una alternativa en la monitorización de la BMP si en lugar de valorar un único disacárido, se valorasen simultáneamente varios de ellos, al igual que Toyoda y col. (1997), consiguiendo así determinar y cuantificar cantidades más pequeñas de BMP. El inconveniente que se plantea es que se encarecerían aún más los costes del método de valoración, ya que además de enzimas se necesitarían más patrones de disacárido, y el coste de todos estos reactivos es elevado.

## *Resumen y Conclusiones*



En el trabajo de la presente memoria se han realizado estudios de permeabilidad de geles de Bemiparina sódica de concentraciones: 0, 0.1, 0.15, 0.25, 0.5 y 1%, *in vitro* e *in vivo* a través de piel humana y piel de rata, respectivamente.

Se han desarrollado tres métodos cromatográficos para la valoración de las muestras, alternativos al método de la actividad anti-Xa:

- valoración de BMP por absorción en el ultravioleta
- valoración de un disacárido, producto de la digestión enzimática de la BMP, mediante absorción en el ultravioleta
- valoración de BMP a través de un disacárido producto de la digestión, enzimática, por fluorescencia

De los resultados obtenidos pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. En los ensayos *in vitro*, únicamente los geles de concentración 0.5 y 1% de BMP proporcionan niveles de actividad anti-Xa/ml, en el compartimento receptor, superiores a los proporcionados por el gel control, aunque sólo el último llega a 0.1 UI anti-Xa/ml. Por ello, en principio cabe esperar que sólo el gel de concentración 1% pueda llegar a desarrollar un efecto terapéutico sistémico. La cantidad de BMP en epidermis que proporcionan los geles de concentración superior a 0.15%, no difiere significativamente de 0.41 UI anti-Xa/cm<sup>2</sup>. Este hecho puede interpretarse, a priori, como posibilidad de actividad terapéutica local.

2. En los ensayos *in vivo*, los dos geles de BMP ensayados (0.25 y 0.5%) proporcionan una concentración en plasma significativamente diferente de cero, tras 4 y 8 horas de administración y solamente a las 4 horas alcanza el valor de 0.1 UI/ml para ambos geles. Estos resultados podrían indicar una posible actividad sistémica. Tras 4 y 8 horas de administración el gel de Bemiparina de concentración 0.5% proporciona, en piel, una actividad significativamente superior a la del gel control incrementada en 0.1 UI/cm<sup>2</sup>.

3. El método propuesto para la determinación de la Bemiparina mediante absorción en el ultravioleta, por tratarse de un método sencillo, rápido y económico, podría tener utilidad en controles de calidad en laboratorio puesto que su límite de cuantificación se sitúa en 2.86 UI/ml.

4. La valoración de uno de los disacáridos obtenido en la digestión enzimática de la BMP, por absorción en el ultravioleta no presenta ventajas frente a la cuantificación de la BMP directamente. El límite de cuantificación es similar y supone mayor complejidad en el tratamiento de las muestras.

5. La determinación de la BMP a través de su digestión enzimática y valoración por fluorescencia de uno de los disacáridos obtenidos no presenta ventajas respecto a la valoración de la actividad anti-Xa por el método descrito en la Real Farmacopea Española. Podría llegar a mejorarse la sensibilidad de este método por medio de la cuantificación simultánea de varios de los disacáridos producto de la digestión.

## *Bibliografía*



**Agnelli, G., Iorio, A., Renga, C., Boschetti, E. Nenci, GG.**

*Prolonged antithrombin activity of low molecular weight heparins: Clinical implications for the treatment of thromboembolic diseases.*

Circulation. 92(10): 2819-2824 (1995).

**Alonso, A., Vasques da Silva, J., Tabak, M.**

*Hydration effects on the protein dynamics in stratum corneum as evaluated by EPR spectroscopy.*

Biochim. Biophys. Acta. 21: 1646(1-2):32-41 (2003).

**Balant, LP., Garret, ER.**

*Computer use in pharmacokinetics.*

En: Drug fate and metabolism, Eds. Garret E.R., Hirtz J.L. Marcel Dekker. New York, pp. 1-78 (1983).

**Bara, L., Samama, M.**

*Pharmacokinetics of low molecular weight heparins.*

Acta. Chir. Scand. 536: 57-61 (1990).

**Barrowcliffe, TW.**

*Low molecular weight heparins.*

Br. J. Haematol. 90: 1-7 (1995)

**Barry, BW.**

*Methods for studying percutaneous absorption.*

En: Dermatological Formulations. Barry, BW. (Ed.). Marcel Dekker, New York, pp. 234-295 (1983).

**Bauer, KA., Eriksson, BI., Lassen, MR., Turpie, AG.**

*Factor Xa inhibition in the prevention of venous thromboembolism and treatment of patients with venous thromboembolism.*

Curr. Opin. Pulm. Med. 8 (5): 398-404 (2002).

**Beetge, E., du Plessis, J., Muller, DG., Goosen, C., van Rensburg, FJ.**

*The influence of the physicochemical characteristics and pharmacokinetic properties of selected NSAID's on their transdermal absorption.*

Int. J. Pharm. 193(2): 261-264 (2000).

**Berton, TR., Pavone, A., Fischer, SM.**

*Ultraviolet-B irradiation alters the cell cycle machinery in mouse epidermis in vivo.*

J. Invest. Dermatol. 117(5) : 1171-1178 (2001).

**Blank, IH.**

*Penetration of low-molecular-weight alcohols into skin. I. Effect of concentration of alcohol and type of vehicle.*

J Invest. Dermatol. 43: 415-420 (1964).

**Bonima, FP., Montenegro, L., Micali, G., West, DP., Palicharla, P., Koch, RL.**

*In vitro percutaneous absorption evaluation of phenobarbital through hairless mouse, adult and premature human skin.*

Int. J. Pharm. 98: 93-99 (1993).

**Bouwstra, JA., Gooris, GS., van der Spek, JA., Bras, W.**

*Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering.*

J. Invest. Dermatol. 97: 1005-1012 (1991).

**Bouwstra, JA., Gooris, GS., Salomons-de Vries, MA., van der Spek, JA., Bras, W.**

*Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: a wide-angle X-ray diffraction study.*

Int. J. Pharm. 84: 205-216 (1992).

**Bouwstra, JA., Gooris, GS., van der Spek, JA., Lavrijsen, S., Bras, W.**

*The lipid and protein structure of mouse stratum corneum: a wide and small angle diffraction study.*

Biochem. Biophys. Acta. 1212: 183-192 (1994).

**Bouwstra, JA., Gooris, GS., Weerheim, A., Kempenaar, J., Ponec, M.**

*Characterization of stratum corneum structure in reconstructed epidermis by X-ray diffraction.*

J. Lipid. Res. 36: 496-504 (1995).

**Bouwstra, JA., Cheng, K., Gooris, GS., Weerheim, A., Ponec, M.**

*The role of ceramides 1 and 2 in the stratum corneum lipid organization.*

Biochem. Biophys. Acta. 1300: 177-186 (1996).

**Bowman, PD., Schuschereba, ST., Lawlor, DF., Gilligan, GR., Mata, JR., DeBaere, DR.**

*Survival of human epidermal keratinocytes after short-duration high temperature: synthesis of HSP70 and IL-8.*

Am. J. Physiol. 272(6 Pt 1): C1988-1994 (1997).

**Braverman, IM., Keh-Yen, A.**

*Ultrastructural abnormalities of the microvasculature and elastic fibers in the skin of juvenile diabetics.*

J. Invest. Dermatol. 82: 270-274 (1984).

**Burge, S.**

*Cohesion of the epidermis.*

Br. J. Dermatol. 131: 153-159 (1994).

**Cánovas, M., de Luna, M., Basi, N.**

*RO-11, a new low molecular weight heparin.*

En: Abstract. Advances in Anticoagulant, Antithrombotic and Thrombolytic Drugs, October 1992.

**Cánovas, M., de Luna, M., Basi, N.**

*RO-11, a new molecular weight heparin.*

En: Abstract. 13<sup>th</sup> International Congress on Thrombosis, Spain, June 1994.

**Catálogo de Especialidades Farmacéuticas**

*Antitrombóticos: Heparina y derivados. Bemiparina.*

En: Catálogo de Especialidades Farmacéuticas. (Eds.) Consejo General de Colegios de Farmacéuticos. Madrid. pp.526-527 (2003).

**Chang, SK., Riviere, JE.**

*Percutaneous absorption of parathion in vitro in porcine skin: effects of dose, temperature, humidity, and perfusate composition on absorptive flux.*

Fundam. Appl. Toxicol. 17(3): 494-504 (1991).

**Chapman, SJ., Walsh, A.**

*Desmosomes, corneosomes and desquamation: an ultrastructural study of adult pig epidermis.*

Arch. Dermatol. Res. 282: 304-310 (1990).

**Cordero, JA., Alarcon, L., Escribano, E., Obach, R., Domenech, J.**

*A comparative study of the transdermal penetration of a series of nonsteroidal antiinflammatory drugs.*

J. Pharm. Sci. 86: 503-508 (1997).

**Cross, SE., Roberts, MS.**

*Importance of dermal blood supply and epidermis on the transdermal iontophoretic delivery of monovalent cations.*

J. Pharm. Sci. 84: 584-592 (1994).

**Cross, SE., Magnusson, BM., Winckle, G., Anissimov, Y., Roberts, MS.**

*Determination of the effect of lipophilicity on the in vitro permeability and tissue reservoir characteristics of topically applied solutes in human skin layers.*

J. Invest. Dermatol. 120(5): 759-764 (2003).

**Cua, AB., Wilhelm, KP., Maibach, HI.**

*Skin surface lipid and skin friction: relation to age, sex and anatomical region.*

Skin Pharmacol. 8(5): 246-251 (1995).

**Dale, BA., Holbrook, KA.**

*Developmental expression of human epidermal keratins and filagrin.*

Curr. Topics. Dev. Biol. 22: 127-151 (1987).

**Depasse, F., Gonzalez de Suso, MJ., Lagoutte, I., Fontcuberta, J., Borrell, M., Samara, MM.**

*Comparative study of the pharmacokinetic profiles of two LMWHs--bemiparin (3500 IU, anti-Xa) and tinzaparin (4500 IU, anti-Xa)--administered subcutaneously to healthy male volunteers.*

Thromb. Res.109(2-3): 109-117 (2003).

**Díez, O., Pérez, E., Martín, A., Herráez, M.**

*The prediction of percutaneous absorption I. Influence of the dermis on in vitro permeation models.*

Int. J. Pharm. 100: 1-7 (1993).

**Downing, DT., Stewart, ME., Wertz, PW., Strauss, JS.**

*Lipids of the epidermis and sebaceous glands.*

En: Dermatology in General Medicine. Fitzpatrick, TB., Eisen, AZ., Wolff, K., Freedberg, IM., Austen, KF. (Eds.). McGraw-Hill, New York, pp. 210-220 (1993).

**Duplaga, BA., Rivers, CW., Nutescu, E.**

*Dosing and monitoring of low molecular weight heparin in special populations.*

Pharmacotherapy. 21(2): 218-234 (2001).

**Elias, PM., Feingold, KR., Menon, GK., Grayson, S., Williams, ML., Grubauer, G.**

*The stratum corneum two compartment model and its functional implications.*

En: Skin Pharmacokinetics. Shroot B, Shaefer H (Eds.). Basel, Karger, pp. 1-9 (1987).

**Elias, PM.**

*Epidermal lipids, membranes and keratinization.*

Int. J. Derm. 20, 1-19 (1981).

**Eriksson, BI., Bergqvist, D., Kålebo, P., Dahl, OE., Lindbratt, S., Bylock, A., Frison, L., Eriksson, UG., Welin, L., Gustafsson, D.**

*Ximelagatran and Melagatran compared with dalteparin for prevention of venous thromboembolism after total hip or knee replacement: the METRHO II randomised trial.*

Lancet. 360: 1441-1447 (2002).

**Fareed, J., Hoppensteadt, DA.**

*Pharmacology of the low molecular weight heparins.*

Sen. Thromb. Haemostas. 22: 13-18 (1996).

**Fartasch, M., Bassukas, ID., Diepgen, TL.**

*Structural relationship between epidermal lipid lamellae, lamellar bodies and desmosomes in human epidermis: an ultrastructural study.*

Br. J. Dermatol. 128: 1-9 (1993).

**Fartasch, M.**

*Epidermal barrier in disorders of the skin.*

Microc. Res. Techn. 38: 361-372 (1997).

**Feldman, RJ., Maibach, HI.**

*Absorption of some organic compounds through the skin in man.*

J. Invest. Dermatol. 54: 399-404 (1970).

**Fernández, A.**

*Características de las heparinas de bajo peso molecular (HBPM).*

Emergencias. 14: 38-41 (2002).

**Fluhr, JW., Mao-Qiang, M., Brown, BE., Wertz, PW., Crumrine, D.,  
Sundberg, JP., Feingold, KR., Elias, PM.**

*Glycerol regulates stratum corneum hydration in sebaceous gland deficient (asebia) mice.*

J. Invest. Dermatol. 120(5): 728-737 (2003).

**Flynn, GL., Yalkowsky, SH.**

*Correlation and prediction of mass transport across the membranes I: Influence of alkyl chain length on flux determining properties of barrier and diffusant.*

J. Pharm. Sci. 61: 838-852 (1972).

**Flynn, GL., Yalkowsky, SH., Roseman, TJ.col.**

*Mass transport phenomena and models: theoretical concepts.*

J. Pharm. Sci. 63: 479-510 (1974).

**Flynn GL.**

*Physicochemical determinants of skin absorption.*

En: Principles of Route-to Route Extrapolation for Risk Assessment. Gerrity, TR., Henry, CJ. (Eds.). Elsevier, New York, pp. 93-127 (1990).

**Ganong, WF.**

*Líquidos corporales circulantes.*

En: Fisiología médica. Ganong, WF. (Ed). El manual moderno, Mexico, pp. 573-604 (2000).

**Greco, MA., Lorand, L., Lane, WS., Baden, HP., Paramsewaran, KN., Kvedar, JC.**

*Pancornullins: a group of small proline rich-related cornified envelope precursors with bifunctional capabilities in isopeptide bond formation.*

J. Invest. Dermatol. 104: 204-210 (1995).

**Grouthamel, WG., Tan, GH., Ditter, LW., Doluisio, JT.**

*Drug absorption IV. Influence of pH on absorption kinetics of weakly acidic drugs.*

J. Pharm. Sci. 60: 1160-1163 (1971).

**Gustafsson D.**

*Oral direct thrombin inhibitors in clinical development.*

J. Intern. Med. 254(4): 322-334 (2003).

**Hadgraft, J.**

*Calculations of drug release rates from controlled release devices. The slab.*

Int. J. Pharm. 2: 177-197 (1979).

**Hara, M., Verkman, AS.**

*Glycerol replacement corrects defective skin hydration, elasticity, and barrier function in aquaporin-3-deficient mice.*

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100(12): 7360-7365 (2003).

**Hirsh, J.**

*Low molecular weight heparin.*

Thromb. Haemost. 70: 204-206 (1993).

**Hohl, D., de Viragh, PA., Amiguet-Barras, F., Gibbs, S., Backendorf, C., Huber, M.**

*The small proline-rich proteins constitute a multigene family of differentially regulated cornified cell envelope precursors proteins.*

J. Invest. Dermatol. 104: 902-909 (1995).

**Holleran, WM., Takagi, Y., Imokawa, G., Jackson, S., Lee, JM., Elias, PM.**

*$\beta$ -Glucocerebrosidase activity in murine epidermis: characterization and localization in relationship to differentiation.*

J. Lipid Res. 33: 1201-1209 (1992).

**Hou, SY., Mitra, AK., White, SH., Menon, GK., Ghadially, R., Elias, PM.**

*Membrane structures in normal and essential fatty acid-deficient stratum corneum: characterization by ruthenium tetroxide staining and X-ray diffraction.*

J. Invest. Dermatol. 96: 215-223 (1991).

**Jimbow, K., Quevedo, WC., Fitzpatrick, TB., Szabo, G.**

*Biology of melanocytes.*

En: Dermatology in General Medicine. Fitzpatrick, TB., Eisen, AZ., Wolff, K., Freedberg, IM., Austen, KF. (Eds.). McGraw-Hill, New York, pp. 261-288 (1993).

**Jones, PH., Watt, FM.**

*Separation of human epidermal stem cells from transit-amplifying stem cells on the basis of differences in integrin function and expression.*

Cell. 73: 713-724 (1993).

**Kakkar, VV., Boeckl, O., Boneu, B., Bordenave, L., Brehm, MD.**

*Efficacy and safety of a low molecular weight heparin and standard unfractionated heparin for prophylaxis of postoperative venous thromboembolism: European multicenter trial.*

World J. Surg. 21: 2-9 (1997).

**Keam, SJ., Goa, KL.**

*Fondaparinux sodium.*

Drugs 62(11): 1673-1685 (2002).

**Kondo, S., Hozumi .Y., Aso, K.**

*Long-term organ culture of rabbit skin: effect of EGF on epidermal structure in vitro.*

J. Invest. Dermatol. 95(4):397-402 (1990).

**Kopenhagen, K., Adolf, J., Matthes, M., Troster, E., Roder, JD., Hass, S., Fritsche, HM., Wolf, H.**

*Low molecular weight heparin and prevention of postoperative thrombosis in abdominal surgery.*

Thromb. Haemost. 67(6): 627-630 (1992).

**Kovacs, MJ., Keeney, M., MacKinnon, K., Boyle, E.**

*Three different chromogenic methods do not give equivalent anti-Xa levels for patients on therapeutic low molecular weight heparin (dalteparin) or unfractionated heparin.*

Clin. Lab. Haematol. 21(1): 55-60 (1999).

**Kriwet, K., Mullergo y Mann, C.C.**

*Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum.*

Int. J. Pharm. 125(2): 231-242 (1995).

**Lazo, ND., Meine, JG., Downing, DT.**

*Lipids are covalently attached to rigid corneocyte protein envelopes existing predominantly as  $\beta$ -sheets: a solid-state nuclear magnetic resonance study.*

J. Invest. Dermatol. 105: 296-300 (1995).

**Lewis, D., Hadgraft, J.**

*Mixed monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine with Azone or oleic acid at the air-water interface.*

Int. J. Pharm. 65: 211-218 (1990).

**Li, X., Cooley BC., Gould, JS.**

*Influence of topical heparin on stasis-induced thrombosis of microvascular anastomoses.*

Microsurgery. 13(2): 72-75 (1992).

**López, A., Morant, MJ., Guzman, D., Borrás, J., Díez O., Herráez, M.**

*Skin permeation model of phenylalkylcarboxylic homologous acids and their enhancer effect on percutaneous penetration of 5-fluorouracil.*

Int. J. Pharm. 139: 205-213 (1996).

**Lorrain, J., Millet, L., Lechère, I., Lochot, S., Ferrari, P., Visconte, C., Sainte-Marie, M., Lunven, C., Berry, CN., Schaeffer, P., Herbert, JM., O'Connor, SE.**

*Antithrombotic properties of SSR182289A, a new, orally active thrombin inhibitor.*

J. Pharmacol. Exp. Ther. 304(2): 567-74 (2003).

**Madison, KC., Swartzendruber, DC., Wertz, PW., Downing, DT.**

*Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum.*

J. Invest. Dermatol. 101: 180-184 (1993).

**Mc Cormick, K., Abdel Rahman, MS.**

*The role of testosterone in trichloroethylene penetration in vitro.*

Environ. Res. 54: 82-92 (1991).

**Mao-Qiang, M., Jain, M., Feingold, KR., Elias, PM.**

*Secretory phospholipase A<sub>2</sub> activity is required for permeability barrier homeostasis.*

J. Invest. Dermatol. 106: 57-63 (1996).

**Marekov, LN., Steinert, PM.**

*Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope.*

J. Biol. Chem. 273: 17763-17770 (1998).

**Martinez, C., López, A.**

*Relación riesgo-beneficio de las heparinas de bajo peso molecular en la profilaxis de la enfermedad tromboembólica venosa en general.*

Cir. Esp. 68: 235-242 (2000).

**Marzulli, FN., Callahan, JF., Brown, DW.**

*Chemical structure and skin penetrating capacity of a short series of organic phosphates and phosphoric acid.*

J. Invest. Dermatol. 44: 339-344 (1965).

**Mauro, T., Grayson, S., Gao, WN., Man, MQ., Kriehuber, E., Behne, M., Feingold, KR., Elias, PM.**

*Barrier recovery is impeded at neutral pH, independent of ionic effects: implications for extracellular lipid processing.*

Arch. Dermatol. Res. 290: 215-222 (1998).

**Meyer, JC., Grundmann, HP., Knapenhans, S.**

*Properties of acid phosphatase in human stratum corneum.*

Dermatologica 180: 24-29 (1990).

**Michel, S., Schmidt, R., Shroot, B., Reichert, U.**

*Morphological and biochemical characterization of the cornified envelopes from human epidermal keratinocytes of different origin.*

J. Invest. Dermatol. 91: 11-15 (1998).

**Modamio, P., Lastra, CF., Mariño, EL.**

*A comparative in vitro study of percutaneous penetration of beta-blockers in human skin.*

Int. J. Pharm. 194(2): 249-259 (2000).

**Mommers, JM., ter Meulen, AC., van Erp, PE., van de Kerkhof, PC.**

*Influence of tacalcitol on cell cycle kinetics of human keratin following standardized injury.*

Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. 12(4): 174-81 (1999).

**Nemes, Z., Demeny, M., Marekov, LN., Fesus, L., Steinert, PM.**

*Cholesterol 3-sulfate interferes with cornified envelope assembly by diverting transglutaminase I activity from the formation of cross-links and esters to the hydrolysis of glutamine.*

J. Biol. Chem. 275: 2636-2646 (2000).

**Nguyen, BC., Kochevar, IE.**

*Influence of hydration on dihydroxyacetone-induced pigmentation of stratum corneum.*

J. Invest. Dermatol. 120(4): 655-661 (2003).

**Norlen, L., Engblom, J., Andersson, M., Forslind, B.**

*A new computer-based evaporimeter system for rapid and precise measurements of water diffusion through stratum corneum in vitro.*

J. Invest. Dermatol. 113: 533-540 (1999).

**Okamoto, R., Tokunaga, Y., Ozaki, N., Kiuchi, T., Sakai, Y., Okamura, R., Utsunomiya, H., Ukikusa, M., Tanaka, K., Yamaoka, Y.**

*Fluorometric study for the noninvasive determination of cellular viability in perfused rat livers.*

Transplant Proc. 20(1 Suppl 1): 969-971 (1988).

**Pinnagoda, J., Tupker, RA., Agner, T., Serup, J.**

*Guidelines for transepithelial water loss (TWEL) measurements: a report from the standarization. Group of the European Society of Contact Dermatitis.*

Contact Dermatitis 22: 164-178 (1990).

**Potts, RO., Francoeur, ML.**

*The influence of stratum corneum morphology on water permeability.*

J. Invest. Dermatol. 96: 495-499 (1991).

**Pouliot, R., Germain, L., Auger, FA., Tremblay, N., Juhasz, J.**

*Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro human skin equivalent produced by tissue engineering and its comparison with normal human skin by ATR-FTIR spectroscopy and thermal analysis (DSC).*

Biochim. Biophys. Acta, 1439: 341-352 (1999).

**Real Farmacopea Española (2ª ed.)**

*Heparinas de bajo peso molecular.*

Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid, pp: 1576-1579 (2002).

**Rhoades, A., Tañer, GA.**

*Sangre y fisiología cardiovascular.*

En: Fisiología médica. (Eds.). Rhoades, A., Tañer, GA. Masson-Little, Brown.

Madrid. pp. 239-263 (1997).

**Riviere, JE., Sage, B., Williams, PL.**

*Effects of vasoactive drugs on transdermal lidocaine iontophoresis.*

J. Pharm. Sci. 80: 615-620 (1991).

**Rosenberg RD.**

*Biochemistry and pharmacology of low molecular weight heparin.*

Semin. Haematol. 34: 2-8 (1997).

**Saunders, BD., Trapp, RG.**

*Basic and clinical biostatistics.*

En: 2ª ed., Appleton & Lange, Connecticut (1994).

**Scheuplein, RJ.**

*Mechanism of percutaneous absorption I. Routes of penetration and the influence of solubility.*

J. Invest. Dermatol. 45: 334-346 (1965).

**Scheuplein, R.J.**

*Mechanism of percutaneous absorption. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration.*

J. Invest. Dermatol. 48: 79-88 (1967).

**Scheuplein, R.J., Blank, I.H.**

*Permeability of the skin.*

Physiological Reviews. 51: 702-747 (1971).

**Scheuplein, R.J., Blank, I.H.**

*Mechanism of percutaneous absorption. Penetration of non-electrolytes (alcohols) from aqueous solutions and from pure liquids.*

J. Invest. Dermatol. 60: 286-296 (1973).

**Scott, P.C., Walker, M., Dugard, P.H.**

*In vitro percutaneous absorption experiments. A technique for the production of intact epidermal membranes from rat skin.*

J. Soc. Cosmet. Chem. 37: 35-41 (1986).

**Squier, C.A., Wertz, P.W., Williams, D.M., Cruchley, A.T.**

*The effect of aging in oral mucosa and skin.*

Squier, C.A., Hill, M.W. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, pp. 91-98 (1994).

**Steinert, P.M., Marekov, L.N.**

*Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope.*

J. Biol. Chem. 272: 2021-2030 (1997).

**Steinert, PM., Candi, E., Tarcsa, E., Marekov, LN., Sette, M., Paci, M., Ciani, B., Guerrieri, P., Melino, G.**

*Transglutaminase crosslinking and structural studies of the human small proline rich 3 protein.*

Cell. Death. Differ. 6: 916-930 (1999).

**Stingl, G., Hauser, C., Wolff, K.**

*The epidermis: an immunological environment.*

En: Dermatology in General Medicine. Fitzpatrick, TB., Eisen, AZ., Wolff, K., Freedberg, IM., Austen, KF. (Eds.). McGraw-Hill, New York, pp. 172-197 (1993).

**Stoica, GE., Franke, TF., Moroni, M., Mueller, S., Morgan, E., Iann, MC., Winder, AD., Reiter, R., Wellstein, A., Martin, MB., Stoica, A.**

*Effect of estradiol on estrogen receptor-alpha gene expression activity can be modulated by the ErbB2/P1 3-K/Akt pathway.*

Oncogene. 22(39): 6054-6067 (2003).

**Sugibayashi, K., Nakayama, S., Seki, T., Hosoya, K., Morimoto, Y.**

*Mechanism of skin penetration-enhancing effect by laurocapram.*

J. Pharm. Sci. 81: 58-64 (1992).

**Swartzendruber, DC., Wertz, PW., Madison, KC., Downing, DT.**

*Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope.*

J. Invest. Dermatol. 88: 709-713 (1987).

**Swartzendruber, DC., Manganaro, A., Madison, KC., Kremer, M., Wertz, PW., Squier, CA.**

*Organization of the intercellular spaces of porcine epidermal and palatal stratum corneum a quantitative study employing ruthenium tetroxide.*

Cell. Tissue Res. 279: 271-276 (1995).

**Takahashi, M., Tekuza, T., Katunuma, N.**

*Phosphorelated cystain alpha is a natural substrate of epidermal transglutaminase for formation of skin cornified cell envelope.*

FEBS Lett. 308: 79-82 (1992).

**Taylor, L.J., Lee, R.S., Long, M., Rawlings, A.V., Tubek, J., Whitehead, L., Moss, G.P.**

*Effect of occlusion on the percutaneous penetration of linoleic acid and glycerol.*

Int. J. Pharm. 249(1-2): 157-164 (2002).

**Torres, F., Peris, J.E., García-Carbonell, M.C., Aristorena, J.C., Granero, L., Chesa, J.L.**

*Use of rats cannulated in the jugular vein and the duodeum in pharmacokinetics studies. Effect of ether anesthesia on absorption of amoxicilin.*

Arzneimittelforschung. 45 (7): 716-719 (1996).

**Toyoda, H., Nagashima, T., Hirata, R., Toida, T., Imanari, T.**

*Sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorometric detection for the determination of heparin and heparan sulfate in biological samples: application to human urinary heparan sulfate.*

J. Chromatography B. 704: 19-24 (1997).

**Treffel, P., Panisset, F., Faivre, B., Agache, P.**

*Hydration, transepidermal water loss, pH and skin surface parametres. Correlations and variations between dominant and non-dominant forearms.*

Brithish J. Derm. 130: 325-328 (1994).

**Vega, JM., Caro-Patón, T., Sánchez, P., Sanchís, ME., de la Fuente, R., Armentia, A., Fernández, A.**

*Delayed hypersensitivity reaction to enoxoparin with sensitisation to other low molecular weight and unfractionated heparins: tolerance to a recombinant hirudin.*

*Alergol. Immunol. Clin.* 16: 294-296 (2001).

**Weingand, DA., Haygood, C., Gaylor, JR., Anglin, JH.**

En: *Current Concepts in Cutaneous Toxicity.* Drill, VA., Lazar, P. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 221-235 (1991).

**Wepierre, J.**

*L'imperméabilité de la peau la souris à légard du perhydrosqualene tritié.*

*Ann. Pharm. Fr.* 25: 515-519 (1967).

**Wertz, PW., Downing, DT.**

*Epidermal lipids.*

En: *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin.* Goldsmith, LA., (Ed.). Oxford University Press, Oxford, pp. 205-235 (1991).

**Wertz, PW., van den Berg, B.**

*The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers.*

*Chem. Phys. Lipids* 91: 85-96 (1998).

**Williams, AC., Barry, BW.**

*Penetration enhancers*

*Avanced Drug Delivery Reviews* 56: 603-618 (2004).

**Xiong, GL., Quan, D., Maibach, HI.**

*Effects of penetration enhancers on in vitro percutaneous absorption of low molecular weight heparin through human skin.*

J. Control. Release 42: 289-296 (1996).

**Xu, P., Chien, YW.**

*Enhanced skin permeability for transdermal drug delivery: Physiopathological and physiocochemical considerations.*

Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 8: 211-236 (1991).

**Yamamura, T., Tezuka, T.**

*The water-holding capacity of the stratum corneum as measured by H-NMR.*

J. Invest. Dermatol. 93: 160-164 (1989).

**Zanowiak, P., Jacobs, MR.**

*Topical antiinfective products.*

En: Handbooks of Nonprescription Drugs, 7<sup>a</sup> Ed. Laitin, SC. (Ed). American Pharmaceutical Association. Whashington, pp. 525-529 (1982).