



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Predicció de la permeació a través de la pell a partir de mesures físico-químiques

Sara Soriano Meseguer

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Química, Universitat de Barcelona  
Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica  
Programa de doctorat: Química Analítica i Medi Ambient

## **PREDICCIÓ DE LA PERMEACIÓ A TRAVÉS DE LA PELL A PARTIR DE MESURES FÍSICO-QUÍMIQUES**

**Sara Soriano Meseguer**

Memòria de tesi doctoral presentada per optar al grau de Doctor per  
la Universitat de Barcelona

Sota la direcció de:

**Dr. Martí Rosés i Pascual**

Professor Catedràtic del Departament  
d'Enginyeria Química i Química  
Analítica (Secció Departamental de  
Química Analítica)

**Dra. Adriana Port Casamitjana**

Analytical Chemistry Head, Esteve  
Pharmaceuticals



El Dr. Martí Rosés i Pascual, Professor Catedràtic del Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica (Secció Departamental de Química Analítica) de la Universitat de Barcelona, i la Dra. Adriana Port Casamitjana, Analytical Chemistry Head de l'empresa Esteve Pharmaceuticals,

## FAN CONSTAR

que la present memòria de tesi doctoral, que porta per títol "Predicció de la permeació a través de la pell a partir de mesures físico-químiques", ha estat realitzada sota la seva direcció per la Sra. Sara Soriano Meseguer i que tots els resultats presents són fruit de la recerca realitzada per l'esmentada doctoranda.

Barcelona, desembre de 2019

Dr. Martí Rosés i Pascual

Dra. Adriana Port Casamitjana



*“Don’t be afraid of hard work. Nothing worthwhile comes easily. Don’t let others discourage you or tell you that you can’t do it. In my day I was I was told woman didn’t go into chemistry. I saw no reason why we couldn’t”*

Gertrude B. Elion



# AGRAÏMENTS

M'agradaria expressar els meus agraïments a totes aquelles persones que han fet possible el desenvolupament d'aquest projecte de doctorat industrial tant a nivell acadèmic com empresarial i en l'àmbit personal.

En primer lloc vull donar profundament les gràcies als meus directors de tesi, Martí i Adriana, i també a Eli Fuguet per tots els coneixements que m'han transmès, així com la seva ajuda i orientació al llarg de tots aquests anys. També vull agrair a Clara, Xavi, Susana i Elisabeth Bosch per haver-me acollit tant gratament al grup de recerca "PhysChem" i també haver-me transmès totes les seves experiències i coneixements. Com a part d'aquest grup de recerca, també donar les gràcies als futurs doctors Alejandro, Lidia i Diego pels bons i divertits moments que hem passat dintre del laboratori i per tot el que m'han ajudat durant l'etapa final de la tesi, així com, a tots els estudiants de Grau i Màster que han passat pel grup al llarg d'aquests anys. Així mateix, no poden faltar els companys d'Esteve. En primer lloc, els meus companys del departament d'Anàlisi: l'Adriana, el Toni, la Magda, la Raquel, l'Edmundo, el Joanan, la Mònica, la Vero, el Carlos i l'Edu. Gràcies per totes les vostres contribucions i la vostra gran professionalitat. Sou un gran equip! A la Carme Almansa, cap de Química Mèdica, pels seus consells i suggeriments. També als companys de Síntesi, en especial al Ramón i al Blas pel seu bon humor i alegria. Tampoc poden faltar les xiques d'ADMET: Maite, Eva, Raquel i Sandra, i el Santi de Bian, gràcies pel vostre interès i predisposició. Finalment, agrair a l'equip "Run Vertical Esteve" (Joanan, Esteban i Àlex) per les divertidíssimes sortides que fèiem per la muntanya i que tant m'han ajudat a desconnectar de la tesi. Sou uns cracks!

En segon lloc m'agradaria donar les gràcies a tots els companys del departament d'Enginyeria Química i Química Analítica amb els que he compartit grans moments a l'hora del dinar i alguna que altra sortida fora del departament: Alejandro, Juanfran, Anne, Guillem, Noe, Clara, Montse, Roger i Laura. D'entre aquests, agrair a la recent Doctorada Clara per la seva ajuda en els últims retocs de la tesi. També vull mencionar a totes aquelles persones que vaig conèixer durant el Màster: Raquel, Dani, Victor, Jordi, Didac, Joanmarc, Elisenda, Txell, Mar, Silvia, Carmen i Vir.



També vull donar les gràcies a les persones que he conegut durant la meua estada a la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València: Teresa, Ana, Patri, Juanjo i Toni. Gràcies pel vostre positivisme i la vostra predisposició a ensenyar-me tantes coses sobre les mesures a través de Cel-les de Franz. També a la Italiana Maria Teresa per ajudar-me en alguns dels experiments *in vitro*.

També són protagonistes d'aquests agraïments el meu grup de EnglishCafe. Gràcies Emma, Patri, Silvia, Valeria, Raquel i Mireia per fer tan amenes les converses amb anglès. Gràcies a aquestes classes ha sorgit una gran amistat entre nosaltres.

Sens dubte, tampoc poden faltar els meus excompanys i amics d'Almirall: Héctor, Laye, Marta, Bombons, Rachel, Rouse, Susana, Patri i Bea. Gràcies per haver sigut uns companys de feina excepcionals i haver compartit moments inoblidables tant dins com fora de la feina.

Els meus amics químics, en especial Bea i Sergio, també han estat molt importants en aquesta etapa. Gràcies pel vostre suport ara i sempre. Pel que fa al meus amics que no tenen res a veure amb el món de la química; "Caliperos", "Friends" i amics de Vallibona, agrair a tots i cadascun de vosaltres totes les experiències que hem compartit, per estar sempre al meu costat i haver-me donat tant de suport durant aquesta etapa. D'entre aquests vull fer especial menció a Eva i Manu pel gran esforç d'haver-se llegit la tesi sencera. També a Alfredo, amic del "cole" i millor amic de la meua parella, pel magnífic disseny de la portada de la tesi. Tots tres sou uns grans professionals en els vostres àmbits. Com bé has dit en alguna ocasió, Manuel, "entre amics no hi ha massa". Gràcies.

I finalment, a qui agraeixo més haver estat amb mi al llarg d'aquesta etapa i durant tota la meua vida, és a la meua família. Vull donar les gràcies a tots i cadascun d'ells, als meus pares, als meus germans, al meu avi que ja no està entre nosaltres, als meus cunyats i als meus nebots Claudia, David, Nuria, Candela, Noelia, Lisa i Álvaro que són alegria i felicitat. També a la meua parella per compartir-ho tot i haver sigut un pilar fonamental en aquesta etapa, i als meus sogres per ser tan bones persones i fer-ho tot tan fàcil.

Molt especialment tinc el plaer de dedicar-los aquesta tesi als meus pares perquè gran part del que sóc és gràcies a ells. Gràcies de tot cor per ser els millors.

# ÍNDEX



ABREVIATURES I ACRÒNIMS .....	I
PRÒLEG.....	VII
RESUM.....	XI
1. INTRODUCCIÓ .....	1
1.1. LA PELL COM A VIA D'ADMINISTRACIÓ DE FÀRMACS .....	3
1.1.1. Fisiologia de la pell.....	3
1.1.2. Vies de penetració cutània.....	4
1.1.2.1. Aspectes teòrics de la difusió a través de la pell.....	6
1.1.3. Factors implicats en l'absorció transdèrmica .....	7
1.1.3.1. Factors biològics.....	7
1.1.3.2. Factors físico-químics.....	8
1.2. MÈTODES D'ESTUDI DE L'ABSORCIÓ TRANSDÈRMICA.....	13
1.2.1. Estudis <i>in vivo</i> .....	13
1.2.2. Estudis <i>in vitro</i> .....	13
1.2.2.1. Factors que afecten als estudis d'absorció dèrmica <i>in vitro</i> .....	14
1.2.2.2. Cel·les de difusió .....	16
1.2.2.3. Assaig de permeació <i>in vitro</i> amb cel·les de difusió de Franz .....	18
1.2.3. Correlació entre les cel·les de difusió i el mètode <i>in vivo</i> .....	20
1.2.4. Altres mètodes <i>in vitro</i> .....	21
1.2.4.1. Tape-Stripping .....	21
1.2.4.2. Models de pell artificial <i>in vitro</i> .....	22
1.2.4.2.1. Model de pell artificial skin PAMPA .....	22
1.2.4.2.1.1. Condicions generals de l'assaig PAMPA.....	23
1.2.4.2.1.2. Influència del pH en la permeabilitat PAMPA .....	28
1.2.4.2.1.3. Variants del PAMPA.....	29
1.2.4.2.1.4. Assaig skin PAMPA.....	32
1.3. MODELS PER A LA PREDICCIÓ DE L'ABSORCIÓ CUTÀNIA .....	37
1.3.1. Model de paràmetres de solvatació .....	37
1.3.1.1. Aplicació al sistema biològic de la permeabilitat de la pell.....	39
1.3.1.2. Aplicació a sistemes físico-químics .....	41
1.3.2. Eines de comparació entre sistemes biològics i físicoquímics .....	43
1.3.2.1. Paràmetre de distància <i>d</i> .....	43
1.3.2.2. Càlcul de variàncies .....	44
1.3.3. Validació de models QSAR.....	45

1.3.3.1. Validació interna .....	46
1.3.3.2. Validació externa .....	47
1.3.4. Habilitat dels sistemes cromatogràfics per a subrogar la permeació de la pell humana .....	47
1.3.4.1. Influència de la ionització àcid-base en la retenció RP-HPLC .....	50
2. OBJECTIUS.....	55
3. MATERIALS I MÈTODES .....	59
3.1. SOLUTS ESTUDIATS .....	61
3.1.1. Recopilació de dades biològiques de la permeabilitat de la pell.....	61
3.2. REACTIUS AUXILIARS I SOLVENTS.....	62
3.3. EXPERIMENTS <i>IN VITRO</i> AMB CEL·LES DE DIFUSIÓ DE FRANZ.....	63
3.3.1. Instruments.....	63
3.3.2. Preparació de les mostres de pell.....	64
3.3.3. Assaig de permeació.....	65
3.4. SISTEMA CROMATOGRÀFIC .....	66
3.4.1. Instruments.....	66
3.4.2. Procediment .....	67
3.4.2.1. Mesura del temps extracolumna i del temps mort.....	67
3.5. ASSAIG SKIN PAMPA.....	68
3.5.1. Instruments.....	68
3.5.2. Mètode Skin PAMPA.....	69
3.6. TRACTAMENT DE DADES .....	70
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	71
4.1. ESTABLIMENT DE MODELS D'ESTIMACIÓ DE LA PERMEABILITAT A TRAVÉS DE LA PELL PER SOLUTS I ESPÈCIES NEUTRES .....	73
4.1.1. Model cromatogràfic.....	73
4.1.1.1. Caracterització a través del model de paràmetres de solvatació del sistema Kinetex Evo C18 i comparació de sistemes cromatogràfics .....	73
4.1.1.2. Estimació de la permeació de la pell humana a partir de mesures cromatogràfiques .....	78
4.1.1.2.1. Establiment i validació del model cromatogràfic per predir valors de log $K_p$ .....	78
4.1.1.2.2. Predicció de valors de log $K_p$ a partir de mesures cromatogràfiques .....	81
4.1.2. Model skin PAMPA.....	83
4.1.2.1. Optimització assaig skin PAMPA: temps d'incubació i agitació .....	83

4.1.2.2. Caracterització a través del model de paràmetres de solvatació del sistema skin PAMPA i comparació de sistemes PAMPA.....	89
4.1.2.3. Estimació de la permeació de la pell a partir del sistema skin PAMPA .....	93
4.1.2.3.1. Establiment i validació del model skin PAMPA per predir valors de log $K_p$ .....	93
4.1.2.3.2. Predicció de valors de log $K_p$ a partir de mesures de permeabilitat skin PAMPA .....	97
4.1.3. Comparació del sistema cromatogràfic i el sistema skin PAMPA amb el sistema biològic de la permeabilitat a través pell.....	99
4.1.3.1. Similitud entre els sistemes de subrogació de la permeabilitat de la pell .....	103
4.2. INFLUÈNCIA DE LA IONITZACIÓ EN LA PERMEABILITAT DE LA PELL HUMANA, LA RETENCIÓ CROMATOGRÀFICA I LA PERMEABILITAT SKIN PAMPA.....	105
4.2.1. Permeabilitat de la pell humana.....	105
4.2.1.1. Influència del pH de la solució donadora .....	105
4.2.2. Retenció cromatogràfica .....	111
4.2.2.1 Variació de la retenció cromatogràfica amb el pH de la fase mòbil	113
4.2.2.2. Anàlisi conjunta dels resultats .....	122
4.2.3. Permeabilitat skin PAMPA .....	127
4.2.3.1. Variació de la permeabilitat skin PAMPA amb el pH de la solució donadora.....	127
4.2.3.2. Anàlisi conjunta dels resultats .....	140
4.3. ESTABLIMENT DE MODELS D'ESTIMACIÓ DE LA PERMEABILITAT A TRAVÉS DE LA PELL PER ESPÈCIES IÒNIQUES .....	143
4.3.1. Model cromatogràfic.....	143
4.3.1.1. Caracterització del sistema Kinetex Evo C18 per a soluts neutres, espècies neutres i espècies iòniques.....	143
4.3.1.2. Estimació de la permeació de la pell de substàncies parcialment i totalment ionitzables a partir de mesures cromatogràfiques.....	148
4.3.2. Model skin PAMPA .....	152
4.3.2.1. Caracterització del sistema skin PAMPA per soluts neutres, espècies neutres i espècies iòniques.....	152
4.3.2.2. Estimació de la permeació de la pell de substàncies parcialment i totalment ionitzables a partir de mesures de permeabilitat skin PAMPA....	156
4.3.3. Comparació entre sistemes físico-químics i el sistema de la permeabilitat de la pell .....	159

4.4. APLICACIÓ DELS MODELS PREDICTIUS A LA INDÚSTRIA FARMACÈUTICA.....	163
4.4.1. Predicció de valors de la permeabilitat de la pell per a una sèrie de fàrmacs enfocats al tractament del dolor .....	163
4.4.1.1. Predicció a través del model skin PAMPA .....	164
4.4.1.2. Predicció a través del model cromatogràfic.....	166
4.4.1.3. Determinació de coeficients de permeabilitat mitjançant cel·les de difusió de Franz i comparació amb els models de predicció .....	169
4.4.2. Correlació cel·les de difusió de Franz-mesures <i>in vivo</i> .....	170
5. CONCLUSIONS .....	173
REFERÈNCIES .....	179
ANNEXOS .....	199

# **ABREVIATURES I ACRÒNIMS**





<b><math>SD_{\text{bio}}^2</math></b>	Estimació de la variància deguda a la precisió de les dades biològiques
<b><math>SD_{\text{corr}}^2</math></b>	Estimació de la variància total de la correlació
<b><math>SD_{\text{crom}}^2</math></b>	Estimació de la variància deguda a la precisió de les dades cromatogràfiques
<b><math>SD_{\text{d}}^2</math></b>	Estimació de la variància deguda a la dissimilitud entre el sistema biològic i el sistema cromatogràfic
<b><math>\sigma_{\text{bio}}^2</math></b>	Variància deguda a la precisió de les dades biològiques
<b><math>\sigma_{\text{corr}}^2</math></b>	Variància global de la correlació
<b><math>\sigma_{\text{crom}}^2</math></b>	Variància deguda a la precisió de les dades cromatogràfiques
<b><math>\sigma_{\text{d}}^2</math></b>	Variància deguda a la dissimilitud entre el sistema biològic i el sistema cromatogràfic
<b>a</b>	Basicitat per pont d'hidrogen del medi segons el model de paràmetres de solvatació
<b>A</b>	Acidesa del solut per pont d'hidrogen segons el model de paràmetres de solvatació
<b>ABL</b>	Capa aquosa limitant
<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>API</b>	Principi actiu
<b>b</b>	Acidesa per pont d'hidrogen del medi segons el model de paràmetres de solvatació
<b>B</b>	Basicitat del solut per pont d'hidrogen segons el model de paràmetres de solvatació
<b>BBB</b>	Barrera sang-cervell
<b>BCS</b>	Sistema de classificació de compostos biofarmacèutics
<b>BM</b>	Membrana biomimètica
<b>c</b>	Constant de l'equació general de solvatació que es relaciona amb la proporció de fases segons el model de paràmetres de solvatació
<b>C18</b>	Fase estacionària d'octadecilsilà

<b>COS</b>	Cosolvent
<b>d</b>	Distància $d$ entre dos vectors LSER normalitzats
<b>DAD</b>	Detector de fila de díodes
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfòxid
<b>DOPC</b>	Dioleilfosfatidilcolina
<b><math>D_{o/w}</math></b>	Coefficient de distribució octanol-aigua
<b>DS</b>	Condicions de doble <i>sink</i>
<b>e</b>	Polaritzabilitat del medi segons el model de paràmetres de solvatació
<b>E</b>	Refractivitat molar en excés del solut segons el model de paràmetres de solvatació
<b>ESI</b>	Ionització per electrospray
<b>Evo C18</b>	Columna d'HPLC Kinetex Evo C18
<b>F</b>	Paràmetre estadístic F de Fisher
<b>GIT</b>	Gastrointestinal
<b>HDM</b>	Membrana d'hexadecà
<b>HPLC</b>	Cromatografia de líquids d'alta resolució
<b>IAM</b>	Membrana immobilitzada artificialment
<b>IUPAC</b>	Unió Internacional de Química Pura i Aplicada
<b>J</b>	Flux en l'estat estacionari
<b><math>J^-</math></b>	Descriptor aniònic segons el model de paràmetres de solvatació
<b><math>j^-</math></b>	Coefficient del descriptor aniònic segons el model de paràmetres de solvatació
<b><math>J^+</math></b>	Descriptor catiònic segons el model de paràmetres de solvatació
<b><math>j^+</math></b>	Coefficient del descriptor catiònic segons el model de paràmetres de solvatació
<b><math>k</math></b>	Factor de retenció d'un solut en un sistema cromatogràfic

<b>K<sub>p</sub></b>	Coeficient de permeabilitat a través de la pell
<b>l</b>	Longitud d'un vector LSER
<b>LC/MS</b>	Cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses
<b>LFER</b>	Relacions lineals de l'energia lliure
<b>LSER</b>	Relacions lineals de l'energia lliure de solvatació
<b>MECK</b>	Cromatografia electrocinètica micel·lar
<b>MSC18</b>	Columna d'HPLC XTerra MSC18
<b>n</b>	Nombre de punts de la correlació
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	Hidrogenfosfat de sodi dihidratat
<b>NaCl</b>	Clorur de sodi
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Dihidrogenfosfat de sodi
<b>NaOH</b>	Hidròxid de sodi
<b>OECD</b>	Organització per a la Cooperació i el Desenvolupament Econòmic
<b>PAMPA</b>	Assaig de permeabilitat a través d'una membrana artificial en paral·lel
<b>PC</b>	Component principal
<b>PCA</b>	Anàlisi per components principals
<b>P<sub>e</sub></b>	Coeficient de permeabilitat efectiva en un assaig PAMPA
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>pK<sub>a</sub></b>	Constant de dissociació àcid-base
<b>P<sub>o/w</sub></b>	Coeficient de partició octanol-aigua
<b>PVPA</b>	Assaig de permeació basat en vesícules fosfolipídiques
<b>Q<sup>2</sup><sub>Loo</sub></b>	Coeficient de correlació de la validació creuada deixant un compost fora
<b>Q<sup>2</sup><sub>Lso</sub></b>	Coeficient de correlació de la validació creuada deixant diversos compostos fora
<b>QSAR</b>	Relacions quantitatives estructura-activitat

<b>Q-TOF</b>	Sistema d'espectrometria de masses quadripolar de temps de vol
<b>R</b>	Coefficient de correlació
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficient de determinació
<b>R<sub>M</sub></b>	Factor de retenció de la membrana
<b>RP18</b>	Columna d'HPLC XTerra RP18
<b>RP-HPLC</b>	Cromatografia de líquids d'alta resolució en fase invertida
<b>s</b>	Dipolaritat del medi segons el model de paràmetres de solvatació
<b>S</b>	Dipolaritat/polaritzabilitat del solut segons el model de paràmetres de solvatació
<b>SD</b>	Desviació estàndard
<b>SDS</b>	Dodecilsulfat de sodi
<b>SCCNFP</b>	Comitè Científic de Productes Cosmètics i No Alimentaris destinats als Consumidors
<b>STC</b>	Taurocolat de sodi
<b>t<sub>ext</sub></b>	Temps extracolumna
<b>t<sub>lag</sub></b>	Temps de latència
<b>t<sub>M</sub></b>	Temps mort (Temps de retenció d'un compost no retingut)
<b>t<sub>R</sub></b>	Temps de retenció
<b>UHPLC</b>	Cromatografia de líquids d'ultra alta resolució
<b>UPLC</b>	Cromatografia de líquids d'ultra alta resolució. Marca registrada per Waters S.A.
<b>UV-Vis</b>	Ultraviolat-visible
<b>v</b>	Hidrofobicitat del medi segons el model de paràmetres de solvatació
<b>V</b>	Volum de McGowan del solut segons el model de paràmetres de solvatació

# PRÒLEG



Aquest projecte de tesi que du com a títol “Predicció de la permeació a través de la pell a partir de mesures físico-químiques” és un projecte realitzat en el Pla de Doctorats Industrials. Es tracta d'un treball de recerca estratègic per a l'empresa Esteve Pharmaceuticals i desenvolupat en col·laboració amb la Universitat de Barcelona, concretament amb el grup de recerca Caracterització Físico-química i Estimació de l'Activitat Biològica de Compostos Bioactius (PhysChem) del departament d'Enginyeria Química i Química Analítica.

Esteve Pharmaceuticals desenvolupa la seva activitat en l'àrea farmacèutica mitjançant la investigació i el desenvolupament de nous fàrmacs, comercialitza un ampli portafoli de productes de prescripció, medicaments publicitaris, vacunes, genèrics i per a ús veterinari; i també està present en el segment dels principis actius farmacèutics (APIs). Actualment, la I+D farmacèutica interna d'Esteve se centra en el desenvolupament de tractaments innovadors en diversos camps incloent neurologia, malalties neurodegeneratives i el maneig del dolor. És precisament en les línies d'investigació centrades en el tractament del dolor on una administració per via cutània podria atendre necessitats mèdiques no cobertes dels pacients.

El grup de recerca Caracterització Físico-química i Estimació de l'Activitat Biològica de Compostos Bioactius (PhysChem), el qual pertany a l'Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), treballa en línies d'investigació basades principalment en l'establiment de metodologia robusta i automatitzada dirigida als camps d'aplicació de la caracterització de compostos candidats a fàrmac en les etapes inicials del procés de descobriment de fàrmacs.

La combinació dels coneixements i experiències dels dos grups de recerca ha de portar al desenvolupament de mètodes ràpids i fiables per a la predicció de l'absorció per via cutània.

Durant el desenvolupament de la tesi també s'ha realitzat una estada a la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, concretament per a la realització de mesures *in vitro* amb pell humana.

Gràcies a la complementarietat de totes aquestes parts implicades sorgeix aquest treball d'investigació en forma de tesi doctoral la qual s'ha redactat en format monogràfic.





**RESUM**



L'absorció cutània descriu el transport d'una certa substància a través de la pell humana i és un procés clau en els estudis d'alliberament de fàrmacs administrats per via tòpica, en la indústria cosmètica i a l'hora d'avaluar el risc potencial d'absorció de compostos tòxics per contacte cutani. L'absorció cutània es troba representada pel coeficient de permeabilitat a través de la pell ( $K_p$ ). Els mètodes òptims per avaluar l'absorció d'un compost a través de la pell són els estudis *in vivo* en diferents espècies animals, no obstant, diverses consideracions ètiques i econòmiques associades a aquests experiments fan que en molts casos es prefereixin els estudis *in vitro*, tot i que aquests no permetin reproduir exactament les condicions reals pel que fa al metabolisme i distribució. Els mètodes *in vitro* sorgeixen com una alternativa més ràpida i econòmica per avaluar la permeabilitat cutània: aporten una informació molt valuosa per tal de preparar els experiments *in vivo* i limiten l'extensió d'aquests als casos més necessaris. El mètode *in vitro* més emprat és el basat en les cel·les de difusió de Franz, tot i això aquest mètode té una alta variabilitat intra- i interlaboratori degut a la complexitat de les mostres biològiques. Uns altres mètodes *in vitro* sorgits més recentment són els basats en models de pell artificial com l'anomenat skin PAMPA. Una alternativa encara més ràpida i més econòmica que els mètodes *in vitro* són els models de predicció basats en mesures físico-químiques.

Aquest projecte de tesi es fonamenta principalment en el desenvolupament i l'establiment de models de predicció de la permeabilitat a través de la pell a partir de mesures físico-químiques, com són els paràmetres de retenció cromatogràfica. També es realitza la seva comparació amb les dades obtingudes amb el model de pell artificial skin PAMPA i amb el mètode *in vitro* de referència de les cel·les de difusió de Franz. En aquesta tesi també s'estudia l'efecte de la ionització del principi actiu en l'estimació de l'absorció cutània ja que la majoria de compostos actius biològicament presenten algun grup àcid o bàsic i això comporta que es poden trobar ionitzats al pH de la pell. Per tal de realitzar tots aquests estudis, el treball s'ha estructurat en quatre parts:

En la primera part de la tesi, es du a terme l'estudi i la caracterització del model cromatogràfic i el model skin PAMPA mitjançant el model de paràmetre de solvatació d'Abraham per a soluts i espècies neutres. Aquesta caracterització permet avaluar la similitud dels models amb l'obtingut per les cel·les de difusió de Franz i mesurar així la idoneïtat dels mètodes cromatogràfics i skin PAMPA per subrogar la

permeació de la pell. En termes de similitud tots 3 sistemes es troben molts propers entre si, per tant, tant el model cromatogràfic com el model skin PAMPA són adequats per la predicció de la permeació de la pell.

En el cas del model cromatogràfic, es desenvolupa una metodologia per a la predicció de la permeabilitat cutània de soluts i espècies neutres basada en mesures cromatogràfiques en un sistema HPLC amb una columna C18, combinat amb detecció UV-Vis i MS. Un conjunt de 80 compostos de diferent naturalesa química i complexitat estructural s'utilitza per establir la correlació entre la permeació de la pell i la retenció HPLC, corregida pel volum de McGowan del solut. Aquesta metodologia és validada estadísticament mitjançant un *training set* per avaluar la robustesa i un *test set* per avaluar la capacitat predictiva. Finalment, es prediuen valors de  $K_p$  d'un conjunt d'11 compostos d'interès i es comparen amb els predits per altres models. Els resultats mostren bona concordança.

En el cas del model skin PAMPA, es desenvolupa una metodologia per a la predicció de la permeabilitat cutània de soluts i espècies neutres basada en mesures de permeabilitat skin PAMPA a partir d'unes condicions d'assaig de 4 hores d'incubació i utilitzant l'agitació per reduir la capa aquosa que es forma al voltant de la membrana artificial. El model s'estableix amb un conjunt de 46 compostos de diferent naturalesa química i posteriorment es valida estadísticament mostrant una bona robustesa i una bona capacitat predictiva. La capacitat de predicció també es comprova comparant els resultats d'un conjunt de compostos amb altres models de predicció, entre ells el model cromatogràfic. També es mostren bons resultats.

En la segona part de la tesi, s'estudia la influència del pH i consegüentment l'efecte de la ionització de diferents compostos àcid-base en la permeabilitat de la pell humana, la retenció cromatogràfica i la permeabilitat skin PAMPA. Aquest estudi és rellevant per poder tenir en compte l'efecte de la ionització en l'estimació de l'absorció cutània i d'aquesta manera ampliar els models anteriorment desenvolupats a espècies parcialment i totalment ionitzades. Per aquest propòsit, els perfils de cada propietat en funció del pH de diferents compostos àcid-base s'ajusten a una equació general que relaciona la propietat d'interès amb el pH. Aquest ajust proporciona els valors de cada propietat per a la forma neutra i iònica del solut, així com el  $pK_a$  del solut en el medi de dissolució, paràmetres que posteriorment permetran predir el valor de la propietat (permeabilitat de la pell humana, retenció cromatogràfica i

permeabilitat skin-PAMPA) a qualsevol valor de pH. Segons la propietat d'estudi s'observen diferents comportaments:

En el cas del mètode cromatogràfic, els valors  $pK_a$  de la fase mòbil obtinguts de l'ajust es poden relacionar amb els  $pK_a$  amb aigua mitjançant dues correlacions diferents, una per a àcids i l'altra per a bases, que reflecteix la diferent influència de la constant dielèctrica del medi en la ionització d'àcids i bases. El temps de retenció de les formes ionitzades es relaciona amb el temps de retenció de les formes neutres mitjançant dues correlacions, una per a anions i l'altra per a cations. Aquestes correlacions assenyalen un diferent comportament en la retenció dels anions i cations: els anions es troben menys retinguts que els cations de la mateixa lipofilicitat. El diferent comportament en la retenció de les formes aniònica, catiònica i neutra es confirma pel temps mort obtingut a partir de diferents aproximacions: el mètode de la picnometria i els temps de retenció de marcadors aniònics (KBr i KI) i neutre (DMSO). Els temps morts obtinguts mitjançant la picnometria es corresponen amb els obtinguts per la retenció del marcador neutre (0.83-0.85 min), no obstant el temps mort dels anions depèn del pH de la fase mòbil: a pH àcid és semblant al temps mort del marcador neutre (0.83 min) però disminueix amb l'augment del pH de la fase mòbil (0.65 min a pH 11). Això es pot explicar per la ionització dels silanols de la columna i l'exclusió dels anions per la repulsió de càrrega. Encara que el temps mort dels cations no s'ha mesurat directament, les dades de retenció obtingudes i les correlacions establertes indiquen que el temps mort dels cations és semblant o lleugerament inferior al temps mort dels compostos neutres (0.77 min).

En el cas del mètode skin PAMPA, la permeabilitat dels anions i els cations és molt inferior a la de les formes neutres, no obstant això, no hi ha una relació clara entre els valors de les formes iòniques i les neutres. Els valors de  $pK_a$  procedents de l'ajust es poden relacionar linealment amb els valors aquosos de  $pK_a$  dels fàrmacs. Alguns compostos mostren valors de permeabilitat anòmals a pH superior a 8 i especialment a pH 9 i 10 a causa de la pèrdua d'integritat de la membrana a pH bàsic.

En la tercera part de la tesi, els models anteriorment desenvolupats per a la predicció de l'absorció cutània s'estenen a espècies parcialment i totalment ionitzades. En el cas del model cromatogràfic, els factors de retenció de les formes iòniques i parcialment ionitzades es calculen a partir de les dades obtingudes de l'ajust dels perfils  $t_R$ -pH i utilitzant el valor de temps mort corresponent. La permeabilitat de la

pell es relaciona amb la retenció cromatogràfica, corregida pel volum del solut, d'espècies totalment i parcialment ionitzades i s'observa que tot el conjunt de dades es troba dintre l'interval de confiança de la corba que s'ha obtingut de la correlació dels soluts i espècies neutres, el que significa que es pot predir  $K_p$  per substàncies ionitzades amb igual error que amb les neutres. En el cas del model skin PAMPA, la permeabilitat de les formes iòniques i parcialment ionitzades s'obtenen de l'ajust dels perfils  $\log P_e$ -pH. La permeabilitat de la pell es relaciona amb la permeabilitat skin PAMPA de les formes parcialment i totalment ionitzades i s'observa un comportament semblant al model cromatogràfic: totes les dades es troben dintre de l'error de la correlació de les substàncies neutres. La capacitat predictiva d'ambdós models es confirma correlacionant les dades de  $K_p$  calculades per a cada model en front de les dades  $K_p$  experimentals de les diferents espècies.

Amb la introducció de les espècies iòniques als diferents models, es realitza una nova caracterització del model cromatogràfic i el model skin PAMPA a través del model de paràmetres de solvatació amb l'addició dels descriptors iònics ( $J^+$  i  $J^-$ ). Es comparen amb el sistema de la permeació de la pell i s'observen diferències en el comportament dels cations.

En la quarta i última part de la tesi, els mètodes de predicció de la permeabilitat a través de la pell establerts al llarg del desenvolupament de la tesi, i el mètode *in vitro* de referència mitjançant cel·les de difusió de Franz, s'apliquen per a la determinació dels coeficients de permeabilitat de diferents compostos a pH 5.5. i 7.4 (pH de la superfície de la pell i pH de la sang, respectivament) dins de les línies d'investigació d'Esteve Pharmaceuticals, centrades en el camp del tractament del dolor on és particularment interessant estudiar l'administració per la via tòpica. Els valors predits de  $\log K_p$  a partir del model cromatogràfic i el model skin PAMPA són força coherents amb els obtinguts experimentalment mitjançant les cel·les de difusió de Franz. Això suggereix que els dos models són igual d'adequats per a la predicció de la permeació de la pell, no obstant, hi ha diferències pel que fa la metodologia i tipus de mostra. El model cromatogràfic no permet l'anàlisi de formulacions semisòlides de fàrmacs ni pegats transdèrmics mentre que els altres sí.

Com a resultat de la recerca duta a terme en la present tesi, s'han publicat dos articles en revistes científiques (*Analytica Chimica Acta* i *ADMET*). Addicionalment, un article està actualment en revisió i altres més estan en fase de redacció.





# **1. INTRODUCCIÓ**



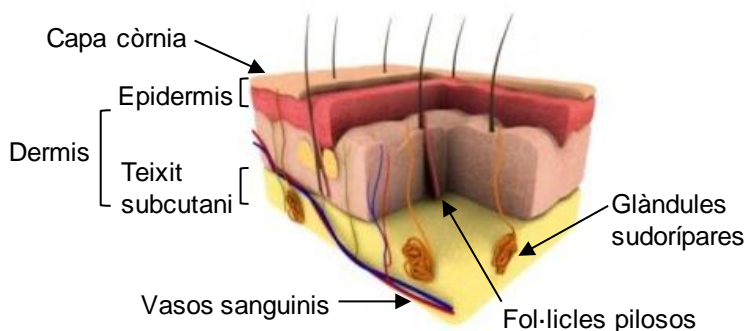
## **1.1. LA PELL COM A VIA D'ADMINISTRACIÓ DE FÀRMACS**

La pell és l'òrgan més gran i complex del cos. Presenta una superfície aproximada de 1.7 m<sup>2</sup> i comprèn el 10 % de la massa corporal total d'una persona. La pell actua com a principal barrera entre el cos i l'entorn exterior i també juga un paper important en la homeòstasi, regulant la temperatura corporal i la pressió sanguínia. Tot i que actua de barrera, proporciona un lloc ideal per a l'administració de fàrmacs com a finalitat d'obtenir efectes terapèutics a nivell local (el fàrmac no s'absorbeix, es queda en alguna de les diferents capes de la pell) o a nivell sistèmic (entrada del fàrmac al torrent sanguini).

Així doncs, l'administració transdèrmica es pot considerar com una ruta alternativa per a fàrmacs que no es poden administrar per altres vies com són la via oral o la parenteral. L'administració transdèrmica ofereix significants avantatges com poden ser: mínim metabolisme de primer pas, s'evita l'entorn gastrointestinal advers i proporciona l'alliberament del fàrmac de manera prolongada i controlada. Malgrat aquests avantatges, el rang de compostos que poden ser alliberats de manera transdèrmica és limitat ja que a vegades la permeabilitat del fàrmac no és suficient per a proporcionar nivells terapèutics efectius [1].

### **1.1.1. Fisiologia de la pell**

La pell humana està formada principalment per tres regions: l'epidermis, que conté l'estrat corni, la dermis i els teixits subcutanis. També estan associats amb la pell un gran nombre d'apèndixs com són els fol·licles pilosos i les glàndules sudorípares. La Figura 1 il·lustra de manera simplificada l'estructura de la pell humana.



**Figura 1.** Esquema de l'estructura de la pell [2].

La capa més externa de la pell, l'epidermis, comprèn aproximadament el 5 % del gruix i es divideix en diverses capes cel·lulars, de les quals la capa més superficial és l'estrat corni o capa còrnia i, subjacent a aquesta, es troba el que s'anomena l'epidermis viva. L'estrat corni mesura 10-20  $\mu\text{m}$  de gruix i actua com a principal barrera de la pell, regulant la pèrdua d'aigua del cos i prevenint la permeació de substàncies potencialment perilloses i microorganismes. La part exterior de l'estrat corni està recoberta per una pel·lícula líquida dèbilment àcida (pH 5-6) per a la protecció antimicrobiana. La capa còrnia és descrita com una estructura de corneòcits en una matriu intercel·lular de lípids [3,4]. Els corneòcits estan formats d'un 70 % - 80 % de queratina i 20 % de lípids. A la vegada, els lípids de la matriu intercel·lular es componen principalment de ceramides, colesterol, àcids grassos, èsters de colesterol i sulfat de colesterol. L'epidermis viva mesura 50-100  $\mu\text{m}$  i està formada per 3 capes cel·lulars anomenades estrat granulós, estrat espinós i estrat basal.

La dermis se situa immediatament per sota de l'epidermis i mesura 2-5 mm de gruix. Es constitueix per una matriu densa de teixit connectiu, format per fibres de col·lagen i elastina, que proporciona elasticitat i flexibilitat. Degut a la naturalesa hidrofílica de l'estructura d'aquesta capa, la dermis també pot actuar com a barrera de fàrmacs ja que podria reduir la permeació de compostos molt lipofílics a capes més internes. La part inferior de la dermis, la hipodermis o també anomenat teixit subcutani, constitueix la base dels fol·licles pilosos i les glàndules sudorípares.

### **1.1.2. Vies de penetració cutània**

L'absorció cutània és un terme global que descriu el transport de les substàncies químiques des de la superfície externa de la pell fins al sistema circulatori [5]. El transport de substàncies a través de la pell és bàsicament un procés de difusió passiva ja que no s'han desenvolupat mecanismes de transport actiu al ser l'estrat corni una barrera protectora. L'absorció cutània es divideix en diferents etapes:

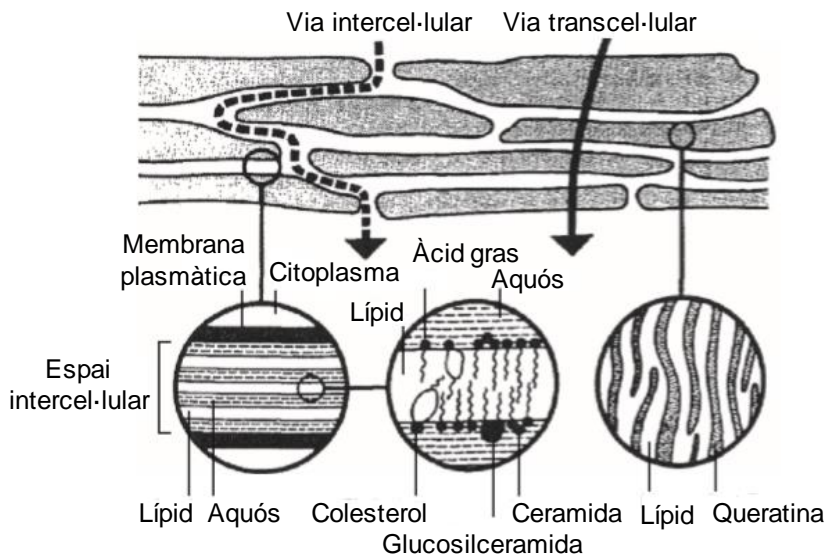
- Penetració: Entrada d'una substància a una capa o estructura concreta, com ara l'entrada d'un compost a l'estrat corni.
- Permeació: Penetració d'una substància a través d'una capa per accedir a una segona capa que és estructuralment i funcionalment diferent de la primera.

- Absorció: Absorció d'una substància al sistema limfàtic i el sistema vascular local i en la majoria dels casos entrada a la circulació sistèmica (absorció sistèmica).

Un fàrmac pot travessar la pell mitjançant dues rutes principals: difusió via estrat corni (ruta transepidèrmica) i/o via apèndixs (ruta transapèndicular):

- Ruta transepidèrmica (via intercel·lular): La substància química difon al voltant dels corneòcits, a través de les regions intercel·lulars de l'estrat corni riques en lípids.
- Ruta transepidèrmica (via transcel·lular): La substància química difon a través dels corneòcits particionant entre el medi exterior i el medi interior de la membrana cel·lular. La via transcel·lular es considera una ruta polar ja que proporciona un medi aquós ideal per a la difusió de fàrmacs hidrofílics.
- Ruta transapèndicular: La substància química entra directament a través dels fol·licles pilosos i les glàndules sudorípares. És considerada una ruta minoritària ja que els apèndixs només representen 0.1 % - 1 % del total de l'àrea de la superfície de la pell.

Les diferents rutes de penetració queden il·lustrades en la figura que es mostra a continuació:



**Figura 2.** Vies de penetració intercel·lular i transcel·lular a través de l'epidermis [5].

La majoria dels compostos poden penetrar la pell mitjançant una combinació de les diferents rutes i la contribució relativa de cadascuna es pot relacionar amb les propietats fisicoquímiques del penetrant.

### 1.1.2.1. Aspectes teòrics de la difusió a través de la pell

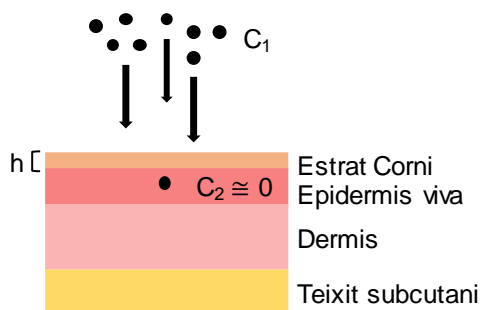
El procés de difusió passiva a través de la membrana de la pell es pot descriure mitjançant la primera llei de Fick. Aquesta postula que el solut es mou des d'una regió d'alta concentració a una de baixa concentració produint un flux que tendeix a uniformar la concentració. Per tant, el flux a través de la membrana és directament proporcional al gradient de concentració del solut i inversament proporcional al gruix de la membrana:

$$J = \frac{D(C_1 - C_2)}{h} \quad \text{(Equació 1)}$$

on  $J$  és el flux,  $C_1$  i  $C_2$  són les concentracions del compost a les dos parts de la membrana (és a dir, a  $x = 0$  i  $x = h$ ) i  $D$  el coeficient de difusió del compost. L'estrat corni és la capa de la membrana de la pell que controla l'absorció dèrmica, és a dir, és l'etapa limitant de la difusió, per tant  $h$  es considera el gruix de l'estrat corni, i la concentració a  $x = h$  ( $C_2$ ) és zero o pràcticament zero. La concentració del compost a  $x = 0$  és un equilibri amb el vehicle (és a dir,  $C_1 = K_m \cdot C_v$ , on  $K_m$  és el coeficient de partició, o distribució, del principi actiu entre el vehicle i l'estrat corni i  $C_v$  és la concentració del principi actiu en el vehicle). Remarcar que la paraula vehicle fa referència a la solució en la qual està dissolt el principi actiu. Per tant, sota aquestes condicions, l'equació 1 es converteix en:

$$J = \frac{DK_m C_v}{h} \quad \text{(Equació 2)}$$

La figura següent reflecteix simplificadament el procés de difusió passiva a través de la membrana de la pell:



**Figura 3.** Difusió passiva d'un solut a través de la membrana de pell.

Si s'aconsegueix l'estat estacionari, és a dir, la quantitat de solut que travessa la membrana per unitat de temps és constant, el flux a través de la pell es pot expressar en termes de coeficient de permeabilitat ( $K_p$ ):

$$J = K_p C_v \quad \text{(Equació 3)}$$

Per tant, comparant l'equació 2 i 3, el coeficient de permeabilitat es pot calcular a través de la següent equació:

$$K_p = \frac{J}{C_v} = \frac{K_m D}{h} \quad \text{(Equació 4)}$$

El flux es defineix, per tant, com la quantitat de solut que passa a través d'una unitat d'àrea de la pell per unitat de temps sota condicions d'estat estacionari ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ ) i el coeficient de permeabilitat,  $K_p$ , representa el grau en el qual un solut penetra la pell ( $\text{cm}/\text{s}$ ).

### **1.1.3. Factors implicats en l'absorció transdèrmica**

El grau de penetració d'un fàrmac a través de la pell depèn de molts factors (relatius al principi actiu, el vehicle utilitzat i la interacció amb la pell) i tots ells s'han de considerar a l'hora de desenvolupar una formulació farmacèutica.

#### **1.1.3.1. Factors biològics**

Hi ha un nombre de factors fisiològics que fan referència a la naturalesa de la pell i que afecten a la funció de barrera i per tant a la seva permeabilitat, com són: l'edat, la zona anatòmica, el gènere, l'etnicitat, trastorns de la pell (patologies) i la hidratació de la pell [1].



### 1.1.3.2. Factors físico-químics

Les propietats físiques i químiques d'un compost i el vehicle utilitzat tenen una influència decisiva en la seva permeació a través de la pell.

#### *Massa molecular/Volum molecular*

La massa molecular d'una substància química és un bon indicador del seu volum molecular, el qual està inversament relacionat amb el coeficient de difusió [6]. Com la difusió dels fàrmacs a través de la pell es considera un mecanisme passiu, les molècules petites travessen la pell humana més ràpidament que les molècules grans [7]. Com a conseqüència, s'ha demostrat que hi ha una relació inversa entre el volum molecular del fàrmac i la permeació de la pell [7–12]. Els candidats seleccionats per a l'administració tòpica i transdèrmica generalment tenen un pes molecular inferior a 500 Da. Tot i que aquest paràmetre és important ja que s'ha contemplat en molts models matemàtics, altres factors com són el coeficient de partició i la ionització són molt més influents.

#### *Coefficient de partició*

Els fàrmacs administrats tòpicament, abans d'arribar al sistema circulatori, primer particionen des del vehicle aplicat fins al domini lipofílic de l'estrat corni (bicapes lipídiques) i seguidament al medi hidrofílic de l'epidermis viva. Per tant els compostos han d'arribar a un equilibri entre el medi lipídic i l'aquós per tal de ser absorbits de manera sistèmica. Compostos molt hidrofílics probablement no particionaran des del vehicle fins a l'estrat corni i compostos molt lipofílics tindran una gran afinitat per l'estrat corni però probablement no particionaran en l'epidermis viva. Molts estudis han demostrat que el valor òptim de lipofilitat ( $\log P_{o/w}$ ) està entre 2-3 [13–16].

#### *Ionització*

Quan un compost ionitzable s'aplica a la superfície de la pell, la seva permeabilitat depèn del pH del vehicle i de la seva constant de dissociació àcid-base ( $pK_a$ ). D'aquesta manera, el coeficient de permeabilitat de la pell experimental o total ( $K_p$ ) es pot calcular a partir del grau d'ionització del compost ( $\alpha$ ), el qual es pot deduir fàcilment a partir del pH de la solució del medi en el que es troba dissolt el solut i el seu  $pK_a$ , i de  $K_p$  de l'espècie neutre i totalment ionitzada segons l'equació 5 per als àcids monopròtics i l'equació 6 per a les bases monopròtiques:

$$K_p = (1-\alpha_1) K_{p_{HA}} + \alpha_1 K_{p_{A^-}} \quad \text{(Equació 5)}$$

$$K_p = (1-\alpha_2) K_{p_A} + \alpha_2 K_{p_{HA^+}} \quad \text{(Equació 6)}$$

$K_{p_{HA}}$  i  $K_{p_{A^-}}$  són els coeficients de permeabilitat de la forma neutra i totalment ionitzada d'un àcid monopròtic, respectivament, i  $K_{p_A}$  i  $K_{p_{HA^+}}$  són els coeficients de permeabilitat de la forma neutra i totalment ionitzada d'una base monopròtica, respectivament.  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  es calculen segons les equacions que es mostren a continuació:

$$\alpha_1 = \frac{10^{(pH - pK_a)}}{1 + 10^{(pH - pK_a)}} \quad \text{(Equació 7)}$$

$$\alpha_2 = \frac{10^{(pK_a - pH)}}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \quad \text{(Equació 8)}$$

La combinació de les equacions anteriors condueix a una equació general que relaciona la permeació amb el pH de qualsevol solut monopròtic:

$$K_p = \frac{K_{p_{HA}} + K_{p_A} 10^{(pH - pK_a)}}{1 + 10^{(pH - pK_a)}} \quad \text{(Equació 9)}$$

on  $K_{p_{HA}}$  i  $K_{p_A}$  representen els coeficients de permeabilitat de les formes protonades i no protonades d'un solut monopròtic, respectivament (les càrregues s'ometen per simplicitat).

El coeficient de permeabilitat de l'espècie no ionitzada d'un fàrmac és més alt que el de l'espècie ionitzada ja que la càrrega d'aquesta interacciona amb els components de l'estrat corni, retardant o impedit la penetració. La relació exacta entre les formes no ionitzades i ionitzades depèn del compost en particular i de la lipofilicitat de la forma no ionitzada, és a dir, la relació entre la forma no ionitzada i ionitzada de la mateixa substància química hauria de ser similar quan l'espècie no ionitzada és hidrofílica i menys similar quan és lipofílica. La relació de  $K_p$  també depèn de si el compost està en forma de sal, ja que els parells iònics poden facilitar els transport dels fàrmacs ionitzats, i del vehicle utilitzat [17]. Per una altra banda, la solubilitat aquosa d'un fàrmac augmenta amb la ionització, aleshores, és possible que una

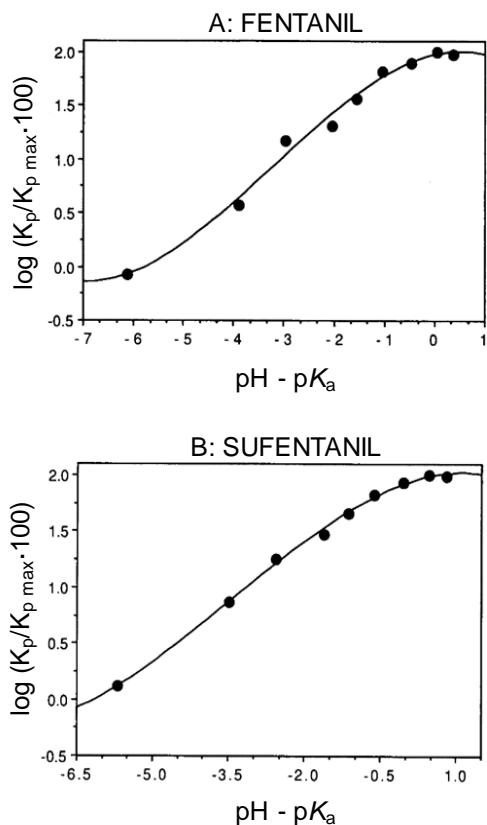
baixa permeabilitat de l'espècie ionitzada quedi compensada per un augment de la solubilitat.

Al llarg del anys, s'han generat un gran nombre de dades de  $K_p$ . Roberts et al. [18] van determinar valors de  $K_p$  d'una sèrie de compostos fenòlics (valors de  $pK_a$  entre 8-10) utilitzant aigua destil·lada com a medi de dissolució. Pràcticament, tots els compostos es trobaven en la seva forma neutra. Més tard, Bronaugh i Congdon [14] van obtenir dades de  $\log K_p$  de 4 fenilendiamines utilitzant com a solució tampó borat a pH 9.7 per tal de prevenir la ionització de les amines i determinar només les formes neutres. Singh i Roberts [19] van mesurar valors de  $K_p$ , tant de les espècies neutres com de les totalment ionitzades, de 5 fàrmacs antiinflamatoris no esteroides. El valor promig de la relació entre la forma neutra i la ionitzada era de 70, excepte per al piroxicam que era 29. Roy i Flynn [20] van estudiar la influència del pH en la permeació de la pell de dos compostos bàsics d'interès farmacèutic, el fentanil i el sufentanil amb un  $pK_a$  de 8.43 i 8.01, respectivament (Annex 1). La taula següent mostra els valors de permeabilitat dels dos compostos en funció del pH:

**Taula 1.** Permeació a través de la pell del fentanil i sufentanil en funció del pH [20].

pH	$K_p$ ( $\cdot 10^{-6}$ cm/s)	
	Fentanil	Sufentanil
2.88	0.08	0.13
5.08	0.36	0.69
6.02	1.42	1.72
6.95	1.97	2.81
7.43	3.53	4.36
7.95	6.22	6.42
8.52	7.67	8.28
9.04	9.69	9.58
9.37	9.14	9.36

Els autors d'aquest treball van utilitzar el valor de  $K_p$  a pH 2.88 com el corresponent a la forma iònica per als dos fàrmacs, tot i així els valors de  $K_p$  a pH 2.88 i 5.08 deurien de ser semblants ja que el grau d'ionització en ambdós casos és superior a 0.999. Per una altra banda, es va representar el logaritme del percentatge del coeficient de permeabilitat experimental a un pH donat respecte al coeficient de permeabilitat experimental màxim, és a dir,  $\log (K_p/K_{p_{\max}} \cdot 100)$ , en front de  $(\text{pH}-pK_a)$  (Figura 4).



**Figura 4.** Permeabilitat relativa ( $\log (K_p/K_{pmax} \cdot 100)$ ) del fentanil (A) i sufentanil (B) en funció de  $(\text{pH} - \text{p}K_a)$  [20].

Aquests perfils mostren un augment exponencial de  $\log (K_p/K_{pmax} \cdot 100)$  a mesura que augmenta la fracció de l'espècie neutra, no obstant, a pH elevats els fluxos d'aquests fàrmacs es troben limitats per la seva solubilitat. Els gràfics anteriors mostren que a partir de pH 9 els valors de  $\log (K_p/K_{pmax} \cdot 100)$  són constants.

Roy i Flynn van concloure que la forma neutra dels fàrmacs és pràcticament la responsable de la permeació, no obstant, tot i que la permeabilitat disminueix considerablement amb la ionització, a pH baixos encara hi ha permeació. Aquestes dades van suggerir que la permeació dels ions es pot donar a través de les rutes polars de la pell.



## **1.2. MÈTODES D'ESTUDI DE L'ABSORCIÓ TRANSDÈRMICA**

Els mètodes per a mesurar l'absorció cutània es poden dividir en dues categories: *in vivo* i *in vitro*.

### **1.2.1. Estudis *in vivo***

El principal avantatge de realitzar un estudi *in vivo* en lloc de *in vitro* és que s'utilitza un sistema intacte des del punt de vista fisiològic i metabòlic.

Els estudis de penetració cutània *in vivo* es realitzen amb animals de laboratori, normalment rosegadors, i amb humans. El desavantatge d'utilitzar animals de laboratori és que tenen una permeabilitat cutània i una disposició sistèmica diferents en comparació amb les persones.

Pel que fa al protocol de les proves estàndard *in vivo*, s'aplica una dosi de la substància d'assaig a una part concreta de la pell durant un període de temps definit i, posteriorment, es retira netejant la zona d'exposició. La presa de mostres biològiques, generalment fluids corporals, teixits o excrements, es realitza en intervals preestablerts de temps i la quantitat de producte químic i/o metabòlit present en les mostres es mesura mitjançant un mètode analític adequat [21]. Finalment es du a terme un balanç de masses de totes les mostres analitzades i es calcula la recuperació total de compost. L'absorció de la substància es pot expressar com a percentatge de dosi absorbida per unitat de temps o en termes de grau d'absorció promig per unitat d'àrea de pell (quantitat de substància d'assaig que passa per unitat d'àrea de pell al sistema circulatori, per unitat de temps,  $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ ).

Uns dels principals inconvenients dels estudis *in vivo* són els baixos nivells plasmàtics que s'aconsegueixen després de l'aplicació del fàrmac, no obstant, l'ús de tècniques sensibles com la cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses (LC/MS) permet la seva quantificació.

Els estudis *in vivo* en humans són els mètodes estàndard d'or i es requereixen com a finalitat regulatòria per al registre de productes farmacèutics [22].

### **1.2.2. Estudis *in vitro***

Els mètodes *in vitro* estan dissenyats per mesurar la penetració i la posterior permeació d'una substància química a un dipòsit de fluids.

En la realització dels assaigs *in vitro* resulta de gran importància treballar en condicions estandarditzades i controlar els factors que poden afectar l'absorció transdèrmica, de manera que els resultats obtinguts siguin reproduïbles. Els protocols i les pautes utilitzades en els assaigs *in vitro* es basen en les directrius de la guia OECD (Organització per a la Cooperació i el Desenvolupament Econòmic) [23,24].

Els experiments *in vitro* més comuns per a l'avaluació de la penetració en la pell són els basats en les cel·les de difusió. Altres tècniques són l'extracció de les diferents capes de la pell amb tires adhesives (tape stripping) i la utilització de pell artificial o reconstituïda.

#### 1.2.2.1. Factors que afecten als estudis d'absorció dèrmica *in vitro*

##### *Fluid receptor*

Per a que el fluid receptor no actuï com a barrera a l'absorció, el compost d'estudi ha de tenir una solubilitat adequada en aquest fluid. El fluid receptor tampoc ha d'afectar la integritat de la membrana. Per a compostos solubles l'ús d'una solució salina (com sèrum fisiològic 0.9 %) o una solució tamponada de sals es considera una bona elecció per tal de simular el medi fisiològic. Per a compostos lipofílics, el fluid receptor pot contenir barreges de solvents com per exemple 1:1 etanol:aigua (tot i que una solució aquosa d'etanol al 50 % pot causar una sobreestimació dels valors de permeació) o 6 % de polioxietilen (20) oleil èter (Brij™ 98) amb aigua.

##### *Membranes de pell*

Una variant important en el disseny dels experiments *in vitro* és la naturalesa de la membrana de la pell. L'elecció d'aquesta depèn dels propòsits de la substància d'assaig i la disponibilitat de les mostres. Encara que les mostres de pell humana donen valors de permeabilitat més apropiats a les condicions humanes *in vivo* no sempre estan disponibles, a més l'ús d'aquestes està subjecte a l'aprovació d'un comitè ètic. Les membranes de pell humana provenen de persones vives o mortes recentment (pell viva) o bé de cadàvers (pell no viva). La pell viva s'aconsegueix tant de la part abdominal com del pit de donants femenins a partir de la cirurgia estètica o d'autòpsies. Les pells no vives s'aconsegueixen de diversos llocs anatòmics a partir de cadàvers tant masculins com femenins.

Molts cops s'utilitza pell d'animal com a substitut de la pell humana, com per exemple pell de rata, ratolí, porc, gos, mico o inclús serp. La pell de rata i especialment la de porc són les més adequades. La pell de porc és recomanada per a estudis cosmètics segons el SCCNFP (Comitè Científic de Productes Cosmètics i No Alimentaris destinats als Consumidors) [25]. No obstant, es creu de manera general que els models animals donen resultats poc fiables [26], a més de valors de permeació més alts ja que la pell d'animal resulta més permeable que la humana. Per tant, el model més fiable per als experiments *in vitro* és sens dubte, la membrana de pell humana. Tot i això està subjecta a un gran nombre de variables:

- Variació intra- i inter-individu: Hi ha estudis que conclouen que la variació de la permeabilitat *in vitro* entre diferents donants (inter) és del 66 % i dintre del mateix donant del 43 % [27]. Per contra, altres estudis han demostrat que aquestes variacions, tant inter- com intra-, es poden reduir utilitzant pell d'una mateixa àrea del cos, com per exemple la zona abdominal o el pit.
- Efecte de l'edat: La disminució de la hidratació en la pell de persones majors pot reduir la permeabilitat de compostos de naturalesa hidrofílica. Sauermann et al. [28] van utilitzar la tècnica de microscòpia làser d'escaneig per avaluar les diferències en la pell de persones entre 18 i 25 anys i la pell de persones grans (> 65 anys). Tot i que no es van observar diferències significatives en el gruix de l'estrat corni entre aquests dos grups, sembla que factors fisiològics com el flux sanguini de la pell o bé la dermis es redueixen amb l'edat. Aquestes diferències no s'aprecien en els estudis *in vitro* (pell extirpada).
- Diferències racials: En general, s'ha demostrat que la pell clara és lleugerament més permeable que la pell fosca degut al fet que aquesta té més capes cel·lulars i un alt contingut lipídic. Un estudi de pell caucàsica, hispànica, fosca i asiàtica les classifica en ordre de permeabilitat com pell fosca < pell asiàtica < pell caucàsica < pell hispànica [29].

### *Condicions d'emmagatzematge*

La pell humana o d'animal es pot emmagatzemar fins a un any a -20 °C sempre que les mostres es trobin en el seu estat normal d'hidratació. Tot i que alguns autors diuen que la congelació no té cap efecte en la permeabilitat [30,31], Wester et al. [32] adverteixen que l'ús de pell humana prèviament congelada pot tenir algun efecte en



els estudis de metabolisme cutani. Per tant, és aconsellable en aquest tipus d'estudis utilitzar la pell dintre de les 24 hores després de ser extirpada.

### *Integritat de la pell*

Es recomana comprovar la integritat de la membrana de pell abans i després de l'experiment. Un simple examen visual pot donar una indicació qualitativa de la integritat de la pell, no obstant és preferible una avaluació quantitativa mitjançant mètodes físics, com per exemple la pèrdua d'aigua transepidermica o la resistència elèctrica transcutània, o també mètodes químics com el mètode del triti, el qual determina la permeació de l'aigua tritiada. Els resultats d'aquests mètodes es comparen amb valors de referència i les membranes que es troben fora de l'interval "normal" de valors són descartades.

### *Preparació de la membrana*

Es poden preparar diferents tipus de membranes de pell [24,33]:

- Pell de gruix complet: Incorpora l'estrat corni, l'epidermis viva i la dermis. S'utilitza normalment per a estudis mecànics.
- Pell dermatomada: S'extrau la dermis inferior. S'aconsegueix mitjançant un dermatoma, instrument de cirurgia que s'utilitza per tallar empelts de pell.
- Membranes epidèrmiques: Comprenen l'epidermis viva i l'estrat corni. Separació de l'epidermis a partir de la dermis mitjançant calor. La pell de gruix complet se submergeix en aigua a 60 °C durant 45-90 segons. A continuació la membrana es treu de l'aigua i l'epidermis s'extrau suaument utilitzant fòrceps. Aquesta tasca és laboriosa i existeix la possibilitat de trencar la membrana. Un altre mètode per separar l'epidermis de la dermis pot ser un tractament químic i enzimàtic.
- Estrat corni aïllat: Aquest teixit es prepara a partir de les membranes epidèrmiques mitjançant un tractament enzimàtic amb tripsina. Les membranes d'estrat corni solen utilitzar-se per estudis mecànics i determinacions de coeficients de partició.

#### 1.2.2.2. Cel·les de difusió

Existeixen dos tipus bàsics de cel·les de difusió: cel·les de difusió de tipus vertical i de tipus horitzontal. En qualsevol dels casos, la pell extirpada se situa actuant de barrera entre el compartiment donador, que conté la solució o formulació del

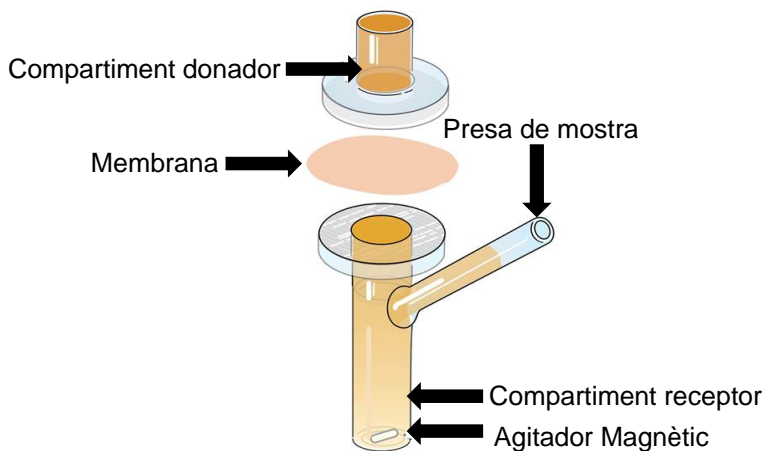
penetrant, i el compartiment receptor o acceptor, que conté el fluid receptor. La substància d'assaig s'aplica sobre la superfície de la pell i roman durant un temps determinat sota unes condicions d'assaig específiques (Apartat 1.2.2.3). L'efecte de l'agitació en el compartiment receptor és essencial per evitar la formació d'una capa aquosa estàtica que limitaria la difusió [23,34].

El volum del compartiment receptor pot oscil·lar entre 0.5 a 10 mL aproximadament i la superfície de les membranes entre 0.2 a 2 cm<sup>2</sup> [34]. El material emprat en la fabricació de les cel·les pot variar des de vidre fins a altres materials inerts.

#### *Cel·les de difusió de tipus vertical*

Dintre d'aquest tipus, aquestes cel·les poden treballar de manera estàtica o amb un flux continu.

La cel·la de difusió de Franz és un dels sistemes més utilitzats per als estudis *in vitro* de permeació en pell [35,36]. És una cel·la de difusió vertical que treballa de manera estàtica amb un disseny relativament senzill (Figura 5): el compartiment donador se situa per sobre del compartiment receptor i entre ells es disposa la membrana de pell de manera horitzontal. El compartiment receptor conté una obertura tubular que permet la presa de mostra en intervals de temps predeterminants i està contínuament en agitació.



**Figura 5.** Disseny d'una cel·la de difusió de Franz [37].

Les cel·les de difusió verticals amb flux continu estan caracteritzades per un continu reemplaçament del fluid receptor. Això es pot aconseguir amb l'ús d'una bomba peristàltica. Aquest mètode se sol utilitzar quan els compostos tenen una solubilitat molt baixa en el medi receptor. Aquest tipus de sistema va ser desenvolupat per Bronaugh i Stewart [38].

#### *Cel·les de difusió de tipus horitzontal*

En aquest tipus de cel·les la membrana es disposa de manera vertical entre el compartiment donador i el compartiment receptor i ambdós estan sotmesos a agitació. Les cambres de les cel·les de difusió horitzontals solen tenir el mateix volum. Aquest sistema és útil per estudiar el mecanisme de difusió a través de la pell [39] i sol treballar amb solucions de fàrmac, o bé amb suspensions.

#### 1.2.2.3. Assaig de permeació *in vitro* amb cel·les de difusió de Franz

Abans d'aplicar la substància d'assaig, s'han de considerar diversos factors que poden influir en la permeació. Aquests són la naturalesa del vehicle i la dosi dèrmica (la qual depèn de la concentració de la substància d'assaig en el vehicle i la quantitat aplicada per centímetre quadrat de pell):

- Dosi finita: S'utilitza en casos on es vol avaluar la permeació d'ingredients cosmètics per a propòsits d'avaluació de riscos. Es disposa en el compartiment donador una dosi única, exacta de principi actiu. Aquest escenari mostra una notable disminució en la concentració del donador al llarg de l'experiment. Per a permeants aplicats en formulacions semisòlides, diverses directrius suggereixen l'aplicació d'un pes fins a 10 mg/cm<sup>2</sup>. Per a formulacions líquides solen aplicar-se 10 µL/cm<sup>2</sup> [23].
- Dosi infinita: S'utilitza per avaluar l'efecte terapèutic d'un producte farmacèutic. La concentració en el compartiment donador és suficientment elevada per mantenir-se invariable i el compartiment receptor manté condicions *sink* durant tot l'assaig, és a dir, la concentració del medi receptor és pràcticament zero si es compara amb la concentració del medi donador i es produeix un flux degut al gradient de concentració. Després d'un període de latència, el gradient de concentració a través de la membrana i, per tant, la velocitat de penetració de la

substància, es manté constant al llarg del temps. S'empra per a la determinació del flux en l'estat estacionari.

#### *Duració de l'experiment*

En principi, una duració de 24 o 48 hores és suficient. No obstant, per avaluar la permeació de sistemes d'administració transdèrmica pot ser necessari ampliar l'experiment a 72 hores. Per a experiments de llarga durada és aconsellable incorporar agents antimicrobians en la fase receptora. De totes maneres, s'ha de tenir en compte la possible degradació de la barrera durant períodes de temps prolongats.

#### *Interval de mostreig*

Per a compostos amb permeació desconeguda és important executar un experiment pilot amb intervals de mostreig cada 1-2 hores per tal de conèixer la duració total de l'assaig. Els primers punts del mostreig (1 a 4 hores) són especialment importants ja que valors anòmals de permeabilitat poden identificar membranes de pell trencades en algunes de les cel·les de difusió.

#### *Nombre de replicats*

Donada la alta variabilitat intra- i inter-individu en la permeabilitat de pell humana, el nombre de replicats que es recomana és de 12 . Per altra banda, es poden emprar menys replicats (mínim 4) si el cost, el temps o la disponibilitat de pell són un problema.

#### *Temperatura*

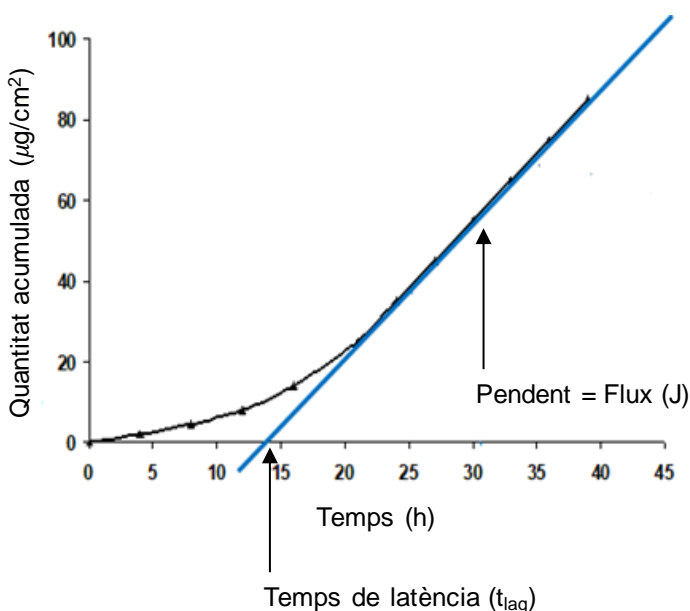
Els experiments de permeabilitat de la pell es duen a terme normalment amb una temperatura superficial de 32 °C i això s'aconsegueix submergint les cel·les en un bany d'aigua i mantenint les solucions del receptor a 35-37 °C. Com que la difusió és un procés depenent de la temperatura, qualsevol alteració en la temperatura de la pell afectarà al procés d'absorció.

#### *Anàlisi de dades*

Les directrius OECD 428 [24] estableixen que:

Pels estudis de dosi finita, un cop finalitzat l'experiment, s'ha d'analitzar la quantitat de mostra en el compartiment donador (netejan la zona d'exposició), la quantitat retinguda en la pell (i en les diferents capes de la pell si és possible) i la quantitat present en el fluid receptor (quantitat o percentatge de la dosi aplicada).

Pels estudis de dosi infinita, l'objectiu és obtenir constants que poden definir la cinètica de permeació. Les constants que s'utilitzen amb més freqüència són el coeficient de permeabilitat  $K_p$  i el temps de latència ( $t_{lag}$ ). Després d'un període de latència inicial, la quantitat acumulada de compost que apareix en el fluid receptor augmentarà linealment en el temps, en altres paraules, el flux a través de la pell arribarà a l'estat estacionari. A partir del gràfic de quantitat acumulada de compost en front del temps (Figura 6), el  $t_{lag}$  es pot determinar mitjançant l'extrapolació de la part lineal del gràfic a l'eix x i el flux a partir del pendent. El coeficient de permeabilitat es pot calcular a partir del flux dividit per la concentració aplicada (Equació 4).



**Figura 6.** Representació gràfica de la quantitat acumulada de principi actiu front el temps sota condicions de dosi infinita.

### **1.2.3. Correlació entre les cel·les de difusió i el mètode *in vivo***

Les dades procedents del model *in vitro* de pell humana extirpada tenen una gran importància en el camp de l'administració transdèrmica de fàrmacs on la mesura de

l'absorció percutània és un pas crític en les etapes prèvies del desenvolupament d'un producte. L'absorció percutània es pot predir a partir del supòsit que el flux d'estat estacionari (J) a través de la pell *in vitro* és equivalent al grau d'entrada a la circulació sistèmica *in vivo*, el penúltim objectiu d'un producte transdèrmic. Atès que el desenvolupament de formes de dosificació transdèrmica per a un fàrmac generalment es produeix posteriorment al desenvolupament d'altres formes de dosificació, el nivell sanguini terapèutic ( $C_{ss}$ ) i el *clearance* sistèmic ( $Cl_s$ ) ja són coneguts. Així doncs, aquests paràmetres permeten el càlcul del flux d'estat estacionari necessari segons l'equació següent [1]:

$$J \cdot A = C_{ss} \cdot Cl_s \quad \text{(Equació 10)}$$

on A és l'àrea de la pell.

D'aquesta manera, el procés tedios del desenvolupament d'una formulació es simplifica molt, ja que l'objectiu principal que és el flux d'estat estacionari es pot determinar *in vitro* i això impedeix la necessitat de realitzar inicialment estudis d'assaig clínic.

#### **1.2.4. Altres mètodes *in vitro***

##### **1.2.4.1. Tape-Stripping**

El mètode *in vitro* de *tape-stripping* s'utilitza per a investigar la penetració d'un fàrmac a través de la pell determinant la quantitat present en les diferents capes de la pell. També és important per estudiar la funció de barrera de l'estrat corni i els factors implicats en les patologies de la pell [40–42]. En aquests experiments, una substància química s'aplica en una àrea determinada de la pell durant un període de temps fixat. A continuació, l'estrat corni s'extrau de la zona d'exposició seqüencialment per aplicacions successives de cinta adhesiva i finalment la quantitat de substància recuperada per cinta adhesiva és analitzada utilitzant un mètode analític adequat. És un mètode simple, econòmic, mínimament invasiu i es pot utilitzar tant en humans com en animals de laboratori, no obstant, no permet determinar els paràmetres implicats en la difusió a través de la pell com són el flux i el coeficient de permeabilitat.

#### 1.2.4.2. Models de pell artificial *in vitro*

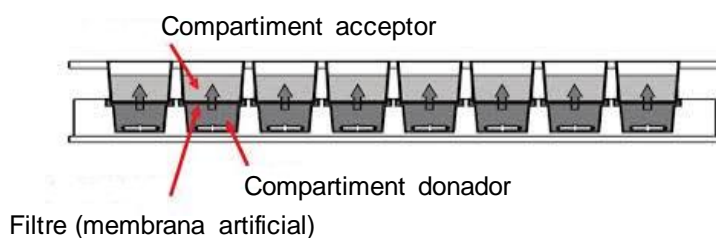
Tal i com s'ha mencionat en l'apartat 1.2.2.1., l'ús de membranes de pell tant d'origen humà com d'animal té alguns desavantatges, com per exemple l'alta variabilitat intra- i inter-individu. Per aquesta raó, els models de pell artificial *in vitro* poden oferir una alternativa simple i reproduïble per estudiar els mecanismes físico-químics bàsics de la permeació de fàrmacs. Aquests models intenten reproduir tant les regions hidrofíliques com lipofíliques, imitant així la capa de l'estrat corni. En els darrers anys diversos models han estat desenvolupats: models no lipídics com per exemple les membranes de silicona [43–46] o els models lipídics, entre ells el de PVPA (Assaig de permeació basat en vesícules fosfolipídiques) que intenta imitar les funcions de barrera de l'estrat corni a partir d'una compactada barrera de liposomes en un filtre d'èster de cel·lulosa [47,48] i skin PAMPA que pretén imitar l'estructura de la pell [49,50].

##### 1.2.4.2.1. Model de pell artificial skin PAMPA

Amb la introducció del sistema de classificació de compostos biofarmacèutics (BCS) [51] va sorgir la necessitat de trobar estratègies de mesura ràpides i fiables de la permeabilitat per tal de classificar les molècules en les primeres etapes dels processos de descobriment de fàrmacs. L'assaig de permeabilitat a través d'una membrana artificial en paral·lel (PAMPA) va ser desenvolupat per Kansy i els seus col·laboradors [52] per a la ràpida determinació de la permeabilitat gastrointestinal de fàrmacs en una membrana artificial a través de la difusió passiva. Aquest assaig va ser dissenyat originalment com un model per imitar el transport transcel·lular dels fàrmacs administrats oralment a través de l'epiteli intestinal. En els darrers 20 anys, aquesta tècnica ha rebut una atenció considerable en les indústries farmacèutiques degut al baix cost i el cribratge d'alt rendiment. Diverses empreses han desenvolupat les seves pròpies variants i s'han publicat una gran quantitat d'articles indicant que el PAMPA és una bona eina per al cribratge de propietats físico-químiques en les primeres etapes del descobriment de fàrmacs. Els primers models publicats, com s'ha mencionat anteriorment, van ser per a la predicció de l'absorció gastrointestinal (GIT PAMPA) [53–55]. Més tard, es van publicar models per a la predicció de la barrera sang-cervell (BBB PAMPA) [56] i també per a l'estimació de la permeació a través de la pell (Skin PAMPA) [49,50] que va ser desenvolupat per Sinkó i els seus col·laboradors.

En general, el mètode PAMPA es basa en la difusió passiva d'una molècula entre dos compartiments, el donador i l'acceptor, separats per una membrana artificial. En aquest assaig es forma un *sandwich* (Figura 7) a partir d'una placa de 96 pouets que se situa en la part inferior (compartiment donador) i una placa de microfiltres també amb 96 pouets, la qual se situa a la part de superior (compartiment acceptor o receptor). Això permet l'estudi d'un gran nombre de compostos en un mateix experiment. El fàrmac està present en el compartiment donador amb una concentració apropiada (normalment entre desenes i centenars  $\mu\text{M}$ ) i difon, a través de la membrana, des del compartiment donador fins a l'acceptor. La permeabilitat es determina a partir de les concentracions del compost en ambdós compartiments, les quals es detecten mitjançant una tècnica analítica adequada.

A diferència dels assaigs *in vitro* tradicionals, en el PAMPA, que va ser desenvolupat per a aplicacions de cribratge d'alt rendiment, no hi ha un continu reemplaçament en el compartiment acceptor i per tant s'han de portar a terme experiments d'un sol punt.



**Figure 7.** Disseny PAMPA *Sandwich* [57].

#### 1.2.4.2.1.1. Condicions generals de l'assaig PAMPA

##### *Composició del compartiment donador i acceptor*

Els estudis PAMPA es realitzen normalment amb tampons aquosos. Tant els compartiments donadors com els acceptors contenen tampons aquosos a valors de pH seleccionats. Generalment es varia el valor de pH del compartiment donador i el pH del compartiment acceptor es manté a 7.4 per tal de simular les condicions fisiològiques del sistema circulatori. En el cas que la solubilitat de les molècules sigui baixa és possible introduir un petit percentatge de cosolvent al compartiment donador per evitar la precipitació del compost durant l'assaig [58].



### *Condicions de pH (iso-pH/gradient-pH) i condicions sink*

Pel que fa a les condicions de pH, es pot treballar amb el mateix valor pH en el compartiment donador i acceptor (iso-pH) o amb valors diferents de pH (gradient-pH).

Per a molècules ionitzables, és possible crear unes condicions *sink* efectives amb el gradients de pH. En aquest cas, les condicions *sink* signifiquen que el compost està ionitzat al pH del compartiment acceptor i per tant la concentració de la forma no ionitzada és baixa, creant així un elevat gradient de concentració des del compartiment donador fins l'acceptor. En compostos àcids això s'aconsegueix si el pH en el compartiment acceptor és més gran que en el compartiment donador. Per contra, en compostos bàsics el pH en el comportament acceptor ha de ser més petit.

En els assaigs PAMPA, també es poden crear condicions *sink* quan s'inclouen en el compartiment acceptor proteïnes de sèrum o algun surfactant. Les molècules travessen ràpidament la membrana per unir-se fortament amb les proteïnes de sèrum o el surfactant. Les condicions *sink* creades per la ionització i la unió amb proteïnes o surfactants simulen les condicions fisiològiques *in vivo*. Si s'imposen aquestes dues condicions *sink* (ionització i unió) s'utilitza el terme *double-sink*. L'ús de condicions *sink* químiques permet a l'assaig PAMPA treballar amb un alt rendiment ja que disminueixen el temps d'anàlisi.

Un altre tipus de condicions *sink* són les creades per un major volum geomètric del compartiment acceptor (condicions *sink* físiques).

### *Equacions PAMPA*

En la recerca de descobriment de fàrmacs molts compostos sintetitzats tenen una elevada lipofilicitat i això fa que puguin acumular-se en la membrana. Per aquest motiu s'ha de tenir en compte el que s'anomena la retenció en membrana que es defineix com la fracció molar de solut acumulada en la membrana. Si es negligeix aquest paràmetre es poden subestimar els coeficients de permeabilitat.

A continuació es mostren les equacions dels coeficients de permeabilitat presentades per Avdeef, desenvolupades a partir de les lleis de difusió de Fick i incorporant la retenció en membrana [53,59].

## a. Equacions iso-pH:

Sota condicions iso-pH, la permeabilitat es pot calcular a partir de la següent equació:

$$P_e = -\frac{2.303V_D}{A \cdot (t-t_{lag}) \cdot \varepsilon_a} \cdot \left(\frac{1}{1+r_V}\right) \cdot \log_{10} \left[ -r_V + \left(\frac{1+r_V}{1-R_M}\right) \cdot \frac{C_D(t)}{C_D(0)} \right] \quad \text{(Equació 11)}$$

$$R_M = 1 - \frac{C_D(t)}{C_D(0)} - \frac{V_A}{V_D} \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \quad \text{(Equació 12)}$$

on  $P_e$  és el coeficient de permeabilitat efectiu (cm/s),  $R_M$  és el factor de retenció de la membrana,  $V_D$  i  $V_A$  és el volum de solució en el compartiment donador i el compartiment acceptor ( $\text{cm}^3$ ), respectivament,  $A$  és l'àrea de la membrana ( $\text{cm}^2$ ),  $t$  és el temps de l'experiment (s),  $t_{lag}$  és el temps de latència (s), temps necessari per arribar a l'estat estacionari [ $t_{lag} = (54 \cdot R_M + 1) \cdot 60\text{s}$ ],  $\varepsilon_a$  és la porositat aparent de la membrana,  $C_D(t)$  és la concentració en el compartiment donador a temps  $t$ ,  $C_D(0)$  és la concentració inicial en el compartiment donador i  $C_A(t)$  és la concentració en el compartiment acceptor a temps  $t$ . El paràmetre  $r_V$  és la relació de volums dels compartiments i es defineix com:

$$r_V = \frac{V_D}{V_A} \quad \text{(Equació 13)}$$

## b. Equacions gradient-pH (condicions sink):

Quan el pH és diferent en els dos compartiments, la permeació de les molècules ionitzables es veu alterada. En efecte, es poden crear condicions *sink* químiques degut al gradient de pH. És important saber que en aquest cas s'han de tenir en compte dos coeficients de permeabilitat diferents, un denotat amb els superíndex (D→A), associat amb el transport donador-acceptor, i l'altre denotat amb el superíndex (A→D) que correspon al transport en direcció inversa. Per tant, el model de gradient-pH implica que és possible un flux en direcció inversa a la permeació. Sota condicions de gradient de pH, la permeabilitat es pot calcular a partir de la següent equació:

$$P_e = -\frac{2.303V_D}{A \cdot (t-t_{lag}) \cdot \varepsilon_a} \cdot \left(\frac{1}{1+r_a}\right) \cdot \log_{10} \left[ -r_a + \left(\frac{1+r_a}{1-R_M}\right) \cdot \frac{C_D(t)}{C_D(0)} \right] \quad \text{(Equació 14)}$$

on  $r_a$  és la relació d'asimetria *sink*, definida com:

$$r_a = \left(\frac{V_D}{V_A}\right) \cdot \left(\frac{P_e^{A \rightarrow D}}{P_e^{D \rightarrow A}}\right) \quad \text{(Equació 15)}$$

Quan les condicions de les solucions aquoses són idèntiques en els dos compartiments,  $r_a = r_v$  i l'equació 14 és equivalent a l'equació 11.

L'equació 14 té dues incògnites:  $P_e^{(A \rightarrow D)}$  i  $P_e^{(D \rightarrow A)}$ . Per resoldre aquesta equació es realitzen al menys dos assaigs: un amb gradient de pH (per exemple, pH 5.0<sub>donador</sub>-7.4<sub>acceptor</sub>) i l'altre iso-pH (per exemple, pH 7.4<sub>donador</sub>-7.4<sub>acceptor</sub>), amb un pH comú als dos assaigs. Per a iso-pH,  $P_e^{(A \rightarrow D)} = P_e^{(D \rightarrow A)}$ , per tant,  $P_e^{(A \rightarrow D)}$  es pot resoldre utilitzant directament l'equació 11. A continuació, l'equació 14 es resol per a  $P_e^{(D \rightarrow A)}$  de manera iterativa. Inicialment s'assumeix que  $r_a = r_v$ , però amb cada iteració  $r_a$  estimat millora mitjançant l'ús de  $P_e^{(D \rightarrow A)}$  calculat i  $P_e^{(A \rightarrow D)}$  agafat a partir de iso-pH. El procés d'iteració continua fins que s'aconsegueix l'auto-consistència en la precisió adequada.

c. Equacions gradient-pH (condicions de doble *sink*):

Si s'afegeixen al compartiment acceptor proteïnes de sèrum o surfactants, en general  $P_e^{(A \rightarrow D)}$  i  $P_e^{(D \rightarrow A)}$  no són iguals, inclús sota condicions iso-pH. La permeabilitat de l'acceptor al donador necessita ser resolta realitzant un assaig iso-pH amb proteïnes de sèrum o surfactants al compartiment donador en comptes del compartiment acceptor. El valor de  $P_e$  es determina utilitzant l'equació 11 i després en l'equació de gradient-pH s'utilitza com a  $P_e^{(A \rightarrow D)}$ . El procediment del càlcul també és iteratiu.

Com l'equació 14 requereix un procediment iteratiu i és més complicat que aplicar una equació iso-pH, per a simplificar, sota condicions de doble *sink*, s'assumeix que es pot utilitzar una equació iso-pH que contempla condicions *sink* a partir de la presència d'additius al compartiment acceptor. Com a resultat de la forta unió de les molècules en el compartiment acceptor, la molècula no enllaçada té una disminució de la concentració. En aquest cas, es pot assumir que el transport revers és pràcticament nul; és a dir,  $C_A(t) \approx 0$ . Com a resultat, l'equació de permeabilitat és simplificada de la següent manera:

$$P_a = -\frac{2.303V_D}{A \cdot (t-t_{lag}) \cdot \epsilon_a} \cdot \log_{10} \left[ \left( \frac{1}{1-R_M} \right) \cdot \frac{C_D(t)}{C_D(0)} \right] \quad \text{(Equació 16)}$$

on  $P_a$  es considera una permeabilitat aparent i no efectiva ja que hi ha una assumptió oculta (la concentració de molècula no enllaçada és pràcticament zero).

Quan els compostos són molt permeables i els temps d'incubació són llargs, les concentracions del compartiment donador i acceptor poden aconseguir valors d'equilibri. Sota condicions iso-pH i en absència de solucions de proteïnes i surfactants en el compartiment acceptor, això significa que la concentració de mostra de l'acceptor és igual a la del donador. Sota aquestes condicions la concentració de mostra en el compartiment acceptor no pot excedir la que hi ha en el compartiment donador. Amb condicions de gradient de pH les concentracions en els diferents compartiments també poden arribar a valors d'equilibri. En aquest cas tota la mostra es mou cap al compartiment acceptor degut a les condicions *sink*. En general, els valors d'equilibri limiten molts cops la determinació de la permeabilitat. Temps de permeació més curts poden resoldre aquest problema, malgrat això, poden conduir a càlculs del coeficient de la permeabilitat amb grans incerteses ja que el temps de latència de compostos molt lipòfils pot ser igual o superior a una hora.

#### *Tècniques de detecció*

Els mètodes de detecció varien des de mètodes senzills com l'espectrofotometria UV-Vis fins a mètodes més sensibles com LC/MS. L'elecció d'aquesta tècnica es deu principalment a la baixa sensibilitat d'alguns compostos així com també la baixa solubilitat (<20 µg/mL).

#### *Efecte de la capa aquosa limitant (ABL)*

El transport passiu d'un compost a través d'una membrana lipídica és la combinació de la difusió a través de la membrana i la difusió a través d'una capa aquosa estàtica que es forma al voltant de la membrana. Aquesta capa rep el nom de capa aquosa limitant i el seu gruix depèn del model de transport. El gruix ABL *in vivo* és significativament diferent del *in vitro*, per exemple, en el tracte gastrointestinal, el moviment de la superfície de l'epiteli dona valors ABL *in vivo* de 30-100 µm, per contra, valors ABL d'experiments *in vitro* sense agitació poden estar entre 1500-2500 µm de gruix.

El gruix de la capa aquosa limitant es pot reduir mitjançant l'efecte de l'agitació, fent que la resistència d'aquesta capa tingui menys contribució en la permeabilitat [60]. L'ús de discs ovalats que giren sobre un eix horitzontal, paral·lel al pla de les plaques de 96 pouets, van demostrar ser el mecanisme d'agitació més eficient en els assajos PAMPA [60]. També l'addició de proteïnes de sèrum o surfactants en el compartiment acceptor pot reduir a la meitat l'efecte de la capa aquosa en el cas de molècules lipídiques.

Es pot suposar que la resistència total al transport passiu a través de la barrera trilaminar (ABL-membrana-ABL) és la suma de les resistències de la membrana lipídica artificial i de les dues capes aquoses (una a cada part de la membrana). La resistència és la inversa de la permeabilitat, per tant:

$$\frac{1}{P_e} = \frac{1}{P_{ABL}} + \frac{1}{P_m} = \frac{1}{P_{ABL}^D} + \frac{1}{P_m} + \frac{1}{P_{ABL}^A} \quad \text{(Equació 17)}$$

on  $P_e$  és la permeabilitat efectiva mesurada,  $P_m$  és la permeabilitat de la membrana artificial i  $P_{ABL}^D$  i  $P_{ABL}^A$  són les permeabilitats ABL en els costats del compartiment donador (D) i del compartiment acceptor (A), respectivament.

#### 1.2.4.2.1.2. Influència del pH en la permeabilitat PAMPA

Per a molècules ionitzables, la permeabilitat de membrana,  $P_m$ , depèn del pH de la solució aquosa i el seu valor màxim es designa com  $P_0$ , permeabilitat intrínseca de l'espècie neutra. Per tant, en el cas de soluts monopròtics la relació entre  $P_m$  i  $P_0$  es pot establir en termes de fracció de l'espècie neutra ( $1 - \alpha$ ) com:

$$P_m = (1 - \alpha)P_0 \quad \text{(Equació 18)}$$

on  $\alpha$  es calcula mitjançant l'equació 7, en el cas d'àcids monopròtics, o equació 8 en el cas de bases monopròtiques, per tant,

$$P_m = \frac{P_0}{1 + 10^{\pm(\text{pH} - \text{p}K_a)}} \quad \text{(Equació 19)}$$

Combinant les equacions 17 i 19 es produeix la següent equació:

$$\frac{1}{P_e} = \frac{1}{P_{ABL}} + \frac{1 + 10^{\pm(\text{pH}-\text{p}K_a)}}{P_0} \quad \text{(Equació 20)}$$

on el signe positiu s'utilitza per a àcids i el signe negatiu per a bases.

Si la capa aquosa ABL és molt fina o si  $P_0 \ll P_{ABL}$  (cas comú en les molècules hidrofíliques), la membrana lipídica es converteix en l'etapa limitant de la difusió global, per tant, l'equació 20 és independent de  $P_{ABL}$ . Si per contra existeix una capa aquosa considerable i  $P_0 \geq P_{ABL}$  (típic cas de les molècules lipofíliques), l'etapa limitant del transport és en aquest cas la capa aquosa. En aquest cas, el valor de  $\text{p}K_a$  del compost rep el nom de constant de dissociació de "flux",  $\text{p}K_a^{\text{flux}}$ .

Al llarg dels últims anys s'ha demostrat que algunes membranes PAMPA, com BBB PAMPA, contenen porus d'aigua en la membrana (canals aquosos de paramembrana) [56]. Per aquest motiu, és necessari incorporar a l'equació 20 un nou terme, la permeabilitat de paramembrana ( $P_{\text{para}}$ ). Aquest paràmetre descriu la difusió del permeant a través dels porus d'aigua que es formen en membranes molt fines o filtres recoberts prèviament. Amb la introducció d'aquest nou terme, l'equació 20 obté la forma següent:

$$\frac{1}{P_e} = \left( \frac{1}{P_{ABL}} + \frac{1}{\frac{P_0}{(1 + 10^{\pm(\text{pH}-\text{p}K_a)})} + P_{\text{para}}} \right) \quad \text{(Equació 21)}$$

Els paràmetres  $P_{ABL}$ ,  $P_0$  i  $P_{\text{para}}$  es determinen aplicant un mètode de regressió no lineal ponderat a partir d'una sèrie de mesures de  $P_e$  a diferents valors de pH en el compartiment donador [56].

L'estudi del nou terme de  $P_{\text{para}}$  va demostrar que la permeabilitat de paramembrana equival a la permeació de compostos hidrofílics i espècies iòniques [56].

#### 1.2.4.2.1.3. Variants del PAMPA

Les variants de l'assaig original de PAMPA difereixen per la naturalesa del filtre, la composició dels constituents de la membrana, el pH en el compartiment donador/acceptor i la presència de condicions *sink* en el compartiment acceptor. Generalment les membranes estan impregnades amb una solució de lípids en un

solvent orgànic no polar. El primer model PAMPA, desenvolupat per Kansy [52], va ser el de lecitina d'ou. Aquest model va ser la base per al desenvolupament de models posteriors. A continuació es resumeixen totes les característiques de les principals variants de l'assaig PAMPA [61]:

**Taula 2.** Resum de les principals variants del model PAMPA.

<b>Assaig PAMPA</b>	<b>Simulació membrana biològica</b>	<b>Filtre de suport</b>	<b>Solvent</b>	<b>Composició de membrana artificial</b>	<b>pH (Donador/ Acceptor)</b>	<b>Sink</b>	<b>Referència</b>
Egg PAMPA	Tracte GI	Hidrofòbic PVDF (125 $\mu\text{m}$ )	n-dodecà	10 % de lecitina d'ou	Iso 6.5 i 7.4	No	[52]
HDM PAMPA	Tracte GI	Policarbonat 10 $\mu\text{m}$	n-hexadecà	n-hexadecà	Iso 4 o gradient 6.8-8	No	[62]
BM PAMPA	Tracte GI	Hidrofòbic PVDF (125 $\mu\text{m}$ )	1,7-octadiè	3 % mescla de fosfolípids	Iso 6.5	No	[58]
DOPC PAMPA	Tracte GI	Hidrofòbic PVDF (125 $\mu\text{m}$ )	n-dodecà	2% DOPC	Iso 7.4	No	[63]
DS PAMPA	Tracte GI	Hidrofòbic PVDF (125 $\mu\text{m}$ )	n-dodecà	20 % mescla de fosfolípids	Gradient 6-7.4	Surfactants aniónics	[64]
BBB PAMPA	Sang-Cervell	Hidrofòbic PVDF (125 $\mu\text{m}$ )	n-alcà	10 % extracte lipídic porcí	Iso 7.4	Mescla de surfactants	[56]
Skin PAMPA	Pell	Recobert prèviament		Certramides, colesterol, àcids grassos i oli de silicona	Gradient 5.5-7.4	No	[50]

Abreviatures i acrònims (pàgines I-VI)

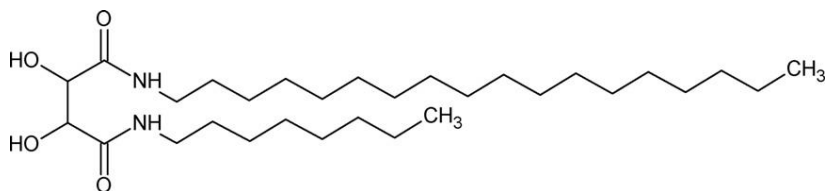


### Protocol general

Durant els 20 anys d'història del PAMPA, en la majoria dels casos, l'objectiu principal ha estat determinar la permeabilitat de compostos purs com un paràmetre cinètic en la primera etapa del descobriment de fàrmacs, sense efecte de cap formulació. La majoria dels protocols s'han desenvolupat per satisfer aquesta necessitat. Per tant, les solucions tampó a diversos valors de pH amb 0.5 % - 5 % de DMSO s'han estudiat com a solució donadora, i les solucions de tampó pur a pH=7.4 com a solució acceptora. La concentració de la solució donadora se selecciona segons els paràmetres físico-químics (solubilitat,  $pK_a$ ,  $\log P_{o/w}$ ) del compost, no obstant de manera general s'utilitza una concentració de referència 50  $\mu\text{M}$ . Els fàrmacs amb bona solubilitat però baixa sensibilitat UV es poden avaluar a una concentració 500  $\mu\text{M}$ .

#### 1.2.4.2.1.4. Assaig skin PAMPA

El primer model publicat de pell artificial va ser el desenvolupat per Ottaviani [46] el qual incorporava oli de silicona i miristat d'isopropil, components no naturals de la pell. Amb el desenvolupament de l'assaig PAMPA durant les últimes dècades, va sorgir el model skin PAMPA que consisteix en una membrana que conté certramides sintètiques, anàlegs de ceramides les quals es troben en l'estrat corni. La Figura 8 mostra l'estructura d'una certramida C8-C18. Les certramides són alternatives més econòmiques a les ceramides naturals amb el potencial d'allargar els temps d'emmagatzematge. Tot i que les certramides són estructuralment diferents a les ceramides, la seva comparable massa molecular, i la seva acidesa i basicitat per pont d'hidrogen les fa actuar com a constituents lipídics de la membrana skin PAMPA juntament amb colesterol, àcid esteàric i oli de silicona [49,50].



**Figura 8.** Estructura de la certramida C8-C18 [50].

Sobre l'aplicació skin PAMPA, pocs articles han estat publicats pel que fa a estudis de permeabilitat en solució aquosa [50,65]. Els estudis s'han ampliat a investigar

sobre les formulacions de fàrmacs, incloent formes semisòlides [66,67] i pegats transdèrmics [68].

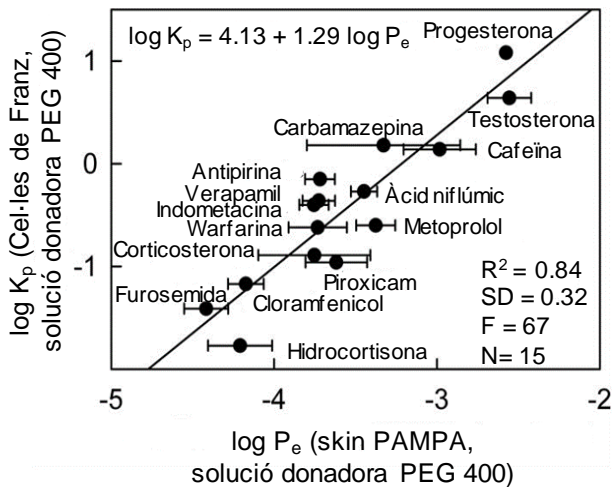
#### *Estudis de permeabilitat skin PAMPA de compostos en solució*

Els estudis de permeabilitat dels compostos en solució són molt importants quan s'investiguen les propietats del principi actiu (API). El protocol d'aquests estudis és similar al protocol PAMPA general, no obstant atès que la membrana de skin PAMPA conté diferents components i és més resistent en comparació a altres membranes PAMPA, s'han de tenir en compte certs factors com per exemple el temps d'incubació. El motiu d'això és que les altres membranes PAMPA estan formades principalment per components lipòfils i, per tant, els compostos lipòfils poden travessar-les ràpidament. La membrana skin PAMPA es compon de dominis lipòfils i hidròfils, de manera que els compostos han de travessar aquests dos dominis fent que els temps de permeació siguin més elevats. Un altre factor important que ha estat investigat per Vizserálek [69] és l'efecte de la temperatura d'incubació en la permeabilitat skin PAMPA, entre altres models. Aquest estudi va demostrar que els resultats skin PAMPA són més sensibles a la temperatura d'incubació que altres models PAMPA.

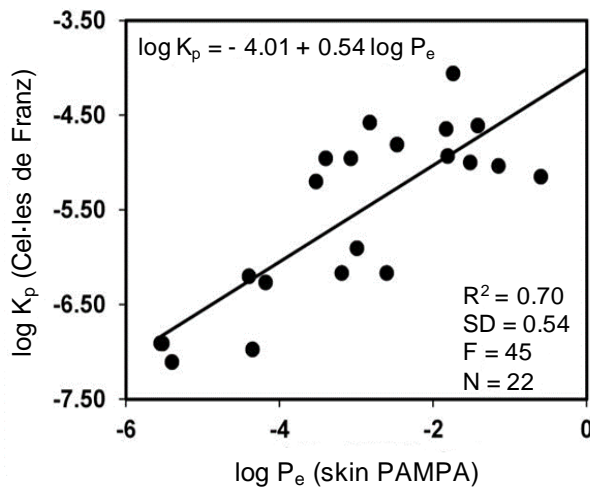
Per a validar els estudis de permeabilitat de compostos en solució, els propis inventors del model skin PAMPA [50] van establir diferents correlacions amb dades de permeabilitat de pell humana. Per a la primera correlació (Figura 9) es van seleccionar dades de  $K_p$  procedents de la base de dades de Lee i col·laboradors [70], la qual contenia resultats de 40 compostos amb mesures de cel·les de difusió de Franz a partir de pell dermatomada, a una temperatura de 32 °C i com a solvent de la fase donadora 45 % v/v PEG 400 i 55 % v/v de tampó fosfat. El PEG 400 s'utilitza com a component de formulacions tòpiques i pot tenir una gran influència potenciant la penetració. Els experiments skin PAMPA es van realitzar amb les mateixes condicions. Només 15 compostos es van utilitzar per a establir la correlació, no obstant, es va obtenir un bon coeficient de correlació ( $R^2=0.84$ ).

Per a la segona correlació (Figura 10), les dades de permeabilitat de pell humana provenien de la base de dades publicada per Hadgraft i Guy [71]. A pesar de ser una base de dades validada, aquesta contenia resultats mesurats en diferents laboratoris i diferents condicions experimentals (diferents membranes de pell, diferent

temperatura d'incubació). La permeabilitat es va investigar a diferents valors de pH utilitzant solució de tampó pur com a solvent en la fase donadora. Correlacionant les dades de 22 compostos amb les obtingudes pels experiments skin PAMPA amb les mateixes condicions, es va obtenir una correlació acceptable ( $R^2=0.70$ ), no obstant s'observa molta incertesa degut a les dades biològiques ( $SD=0.54$ ). A continuació es mostren els gràfics de les dues correlacions:



**Figura 9.** Permeabilitat amb pell vs. permeabilitat skin PAMPA utilitzant com a solvent de la fase donadora 45 % v/v PEG 400 i 55 % v/v de tampó fosfat [65].

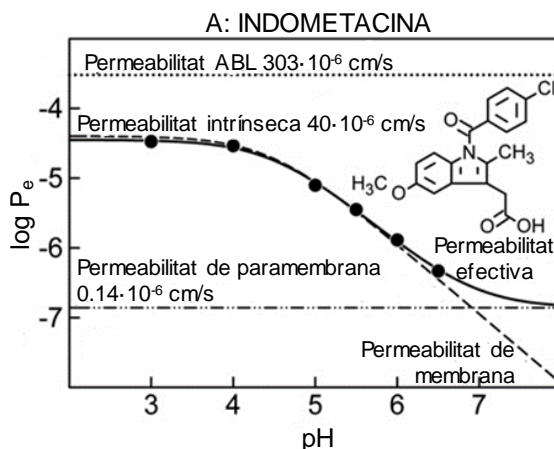


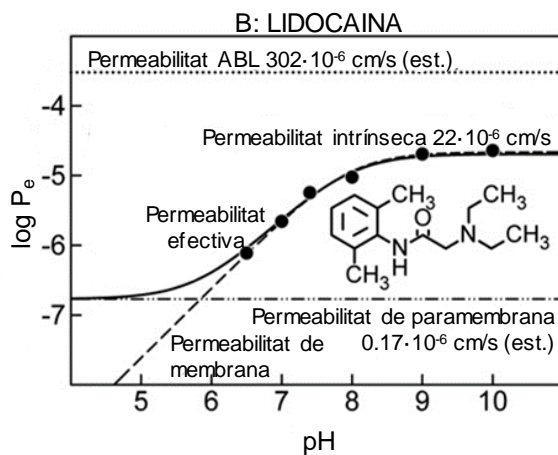
**Figura 10.** Permeabilitat amb pell vs. permeabilitat skin PAMPA utilitzant tampó pur com a solvent de la fase donadora [65].

La correlació acceptable de la Figura 10 indica un bon ordre de classificació dels compostos en solució, de manera que el model és capaç de caracteritzar la permeabilitat i classificar els API's adequadament. La classificació proposada per l'empresa que comercialitza les plaques skin PAMPA (Pion) [72,73] estableix que els compostos amb un valor  $\log P_e < -6$  són compostos poc permeables. Els que tenen valors de  $\log P_e$  entre -5 i -6 es consideren compostos amb una permeabilitat intermèdia. I finalment aquells amb valors  $\log P_e \geq -5$  es classifiquen com a altament permeables. Pion va establir aquest criteri per a unes condicions d'assaig de 4 hores d'incubació i sense agitació.

#### *Influència de la ionització en la permeabilitat skin PAMPA*

En el treball de Sinkó et al. [50] es van realitzar mesures de permeabilitat efectiva skin PAMPA aplicant diferents valors de pH al compartiment donador i obtenint així els perfils de permeabilitat-pH d'un àcid (indometacina) i d'una base (lidocaïna). Els respectius perfils es presenten a la Figura 11. La forma de les corbes i els valors obtinguts de la permeabilitat de paramembrana ( $P_{ABL}$ ) van suggerir que les membranes skin PAMPA també contenen uns canals aquosos dintre de la membrana i, per tant, la permeació dels compostos molt hidrofílics i les espècies iòniques té lloc a través d'aquests porus d'aigua.





**Figura 11.** Perfils del logaritme de la permeabilitat efectiva skin PAMPA a diferents valors de pH del compartiment donador. **A:** Indometacina (àcid) **B:** Lidocaïna (base) [50].

### **1.3. MODELS PER A LA PREDICCIÓ DE L'ABSORCIÓ CUTÀNIA**

Els models *in vitro* per a la determinació de l'absorció cutània són mètodes laboriosos i costosos. Per aquest motiu, té especial rellevància l'obtenció de models predictius que permetin descriure l'absorció cutània d'una manera ràpida, senzilla i pràcticament sense despesa econòmica.

Per predir els coeficients de permeabilitat  $K_p$  i reduir així el nombre d'assaigs *in vitro*, es poden desenvolupar dos tipus de models: empírics o teòrics. Els models empírics correlacionen els valors de  $K_p$  dels compostos amb els seus descriptors físico-químics, com ara descriptors d'hidrofobicitat, polaritat, solubilitat, enllaç d'hidrogen o la mida molecular [74]. En general, els models empírics, com el proposat per Patel et al. [75], revelen l'important paper que juga la lipofilicitat i la mida molecular en la permeació cutània.

Els models teòrics, en canvi, són aproximacions mecanicistes que intenten simular processos dinàmics implicats en la permeació de la pell. Consisteixen en models de transport matemàtic que relacionen l'absorció dèrmica amb paràmetres com els coeficients de difusió i els coeficients de partició, tenint en compte altres factors com possibles rutes de penetració i interaccions entre els productes químics i els constituents de la pell [76–78].

En els últims anys, els models computacionals basats en descriptors calculats [79–81] també s'han convertit en aproximacions molt útils i potents per proporcionar estimacions de valors de  $K_p$ . No obstant, els models basats en descriptors experimentals són preferits quan la predicció de  $K_p$  requereix més precisió i fiabilitat.

#### **1.3.1. Model de paràmetres de solvatació**

Les relacions lineals d'energia lliure (LFER), un tipus particular de relacions quantitatives d'estructura-activitat (QSAR), suposen que el canvi d'energia lliure associada amb la propietat d'interès es relaciona linealment amb els descriptors moleculars del solut. Les relacions lineals d'energia de solvatació (LSER), proposades per Kamlet et al. [82], es basen en el canvi d'energia lliure a causa del procés de solvatació d'un solut en un dissolvent. Les diferents etapes del procés de solvatació [83] es detallen a continuació:

1. Formació d'una cavitat en el solvent amb l'objectiu d'allotjar el solut. Això implica el trencament de les interaccions solvent-solvent per a formar una cavitat amb les característiques adequades de mida i forma del solut.
2. Inserció del solut en la cavitat formada.
3. Establiment d'interaccions solut-solvent. Aquestes poden ser de tipus dispersió (també anomenades interaccions de London), degudes a la presència de dipols i degudes a la formació de ponts d'hidrogen.

Els models basats en LSER reflecteixen, per tant, els principals factors que governen les diferents etapes del procés de solvatació i s'engloben en tres termes: termes de cavitat, de dipolaritat/polaritzabilitat i termes d'enllaç per pont d'hidrogen.

Abraham i els seus col·laboradors van definir els termes anteriors en base als descriptors moleculars del solut, donant lloc al conegut model de paràmetres de solvatació [84]. Aquest model es basa en la següent equació:

$$\log SP = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad \text{(Equació 22)}$$

on SP és la propietat del solut en un sistema de partició donat, per exemple una constant d'equilibri o alguna propietat relacionada amb l'energia lliure. Es pot tractar tant d'una propietat de partició biològica (coeficient de distribució sang-cervell (BB), coeficient de permeabilitat en pell ( $K_p$ ), etc) com d'una propietat de partició fisico-química (coeficient de partició octanol-aigua ( $P_{o/w}$ ), factor de retenció ( $k$ ), etc). Les variables independents E, S, A, B i V són els descriptors dels soluts. E representa la refractivitat molar en excés, S és la dipolaritat/polaritzabilitat del solut, A i B són l'acidesa per pont d'hidrogen i la basicitat per pont d'hidrogen, respectivament, i V és el volum de solut de McGowan.

Els coeficients de l'equació (e,s,a,b,v) són característics del sistema i indiquen les propietats del sistema complementàries al descriptor que acompanyen. Per a qualsevol sistema, els coeficients d'aquesta equació es poden calcular a partir d'una regressió lineal múltiple entre els valors de log SP d'un grup de soluts i els valors dels seus descriptors. El conjunt de soluts fets servir per a la caracterització ha de ser de naturalesa química variada perquè els descriptors d'aquests soluts cobreixin un ampli ventall de valors i puguin aconseguir que la propietat SP estudiada compleixi un ampli interval de valors [84]. Aquests coeficients mostren les diferències entre les

dues fases en les que particiona el solut, i es poden interpretar pel que fa a la seva magnitud i signe [83]:

- Magnitud: Reflecteix la diferència entre la capacitat d'interacció de cadascuna de les dues fases amb el solut, així com la importància d'aquest en el valor de la propietat en estudi.
- Signe: Indica quina de les dues fases té una capacitat d'interacció major amb el solut, és a dir, cap a quina fase estarà més afavorit. Si el signe és positiu, la interacció estarà afavorida cap a la fase de caràcter orgànic, mentre que si és negatiu cap a la fase de caràcter aquós.

L'equació general de solvatació (equació 22) ha sigut establerta només per a soluts neutres i/o espècies neutres. Per tal d'ampliar aquesta equació a espècies iòniques i ions i així contemplar també les interaccions dels ions, Abraham i Acree [85–88] van incorporar a l'equació 22 un terme addicional per a cations ( $j^+$ ,  $J^+$ ) i un altre per a anions ( $j^-$ ,  $J^-$ ). D'aquesta manera, el model de paràmetres de solvatació per a molècules neutres, espècies iòniques i ions es converteix amb:

$$\log SP = c + eE + sS + aA + bB + vV + j^+J^+ + j^-J^- \quad \text{(Equació 23)}$$

$J^+$  i  $J^-$  són descriptors que fan referència a les interaccions ió-solvent per a cations i anions, respectivament. Lògicament,  $J^+$  és zero per a anions,  $J^-$  és zero per a cations i ambdós són zero per a espècies neutres. S'ha de recalcar que el terme "ions" fa referència als ions que provenen d'un compost iònic, per exemple l'ió sodi ( $\text{Na}^+$ ) i l'ió clor ( $\text{Cl}^-$ ), i el terme "espècies iòniques" als ions que deriven de la protonació de compostos bàsics i la desprotonació de compostos àcids.

El model de paràmetres de solvatació s'ha aplicat amb èxit per caracteritzar molts processos biològics, incloent-hi alguns de toxicològics i ambientals, així com una àmplia gamma de processos físico-químics, tots ells governats pel transport passiu de soluts entre dues fases.

#### 1.3.1.1. Aplicació al sistema biològic de la permeabilitat de la pell

El sistema biològic de la permeabilitat de la pell a partir de solucions aquoses va ser caracteritzat per Abraham et al. mitjançant l'aplicació del model de paràmetres de solvatació de soluts neutres [89–92]:



$$\log K_p = - 5.246(\pm 0.101) - 0.106(\pm 0.129)E - 0.473(\pm 0.095)S - 0.473(\pm 0.148)A - 3.000(\pm 0.152)B + 2.296(\pm 0.137)V$$

$$n = 119 \quad R^2 = 0.832 \quad SD = 0.461 \quad F = 112 \quad \textbf{(Equació 24)}$$

n és el nombre de compostos, SD és la desviació estàndard de la regressió, R és el coeficient de correlació i F és l'estadístic F de Fischer. Aquesta equació es va obtenir mitjançant l'anàlisi de 119 compostos de diferent naturalesa química que cobrien una àmplia gamma de valors de  $\log K_p$ . L'eq. 24 mostra que els principals factors que influeixen en  $\log K_p$  són la basicitat per pont d'hidrogen, que contribueix negativament, i el volum del solut, que contribueix positivament. La dipolaritat/polaritzabilitat i l'acidesa per pont d'hidrogen tenen una menor contribució.

Posteriorment, com la majoria de models de predicció de la permeabilitat de la pell no contemplaven la ionització dels compostos ionitzables, ni mencionaven la possibilitat de partició de les espècies iòniques, Zhang et al. [93,94] van aplicar l'equació 23 per a la correlació i la predicció de la permeabilitat de la pell de molècules neutres, ions i espècies ionitzades, i això va representar un dels pocs intents d'incloure les espècies iòniques en els models de predicció de la permeabilitat de la pell:

$$\log K_p = - 5.328(\pm 0.071) + 0.137(\pm 0.082)E - 0.604(\pm 0.057)S - 0.338(\pm 0.094)A - 2.428(\pm 0.090)B + 1.797(\pm 0.079)V - 1.485(\pm 0.121)J^+ + 2.471(\pm 0.113)J^-$$

$$n = 247 \quad R^2 = 0.866 \quad SD = 0.432 \quad F = 22 \quad \textbf{(Equació 25)}$$

El conjunt de dades està format per 247 compostos i espècies, dels quals 35 són espècies iòniques. L'equació 25 mostra millors resultats estadístics que l'equació 24 i els coeficients  $j^+$  i  $j^-$  descriuen que la interacció ió-pell juga un rol molt important en el procés de permeació iònica. Tanmateix, cal destacar que la permeabilitat cutània d'espècies iòniques està influenciada per tots els altres termes i no només per  $J^+$  i  $J^-$ .

### 1.3.1.2. Aplicació a sistemes físico-químics

Són molts els sistemes físico-químics que s'han caracteritzat a partir de l'equació general de solvatació (equació 22) [83,95–100]. A la Taula 3 s'inclouen alguns exemples com els sistemes de partició octanol-aigua, sistemes cromatogràfics com els d'HPLC (Cromatografia de líquids d'alta resolució) i MECK (Cromatografia electrocinètica micel·lar), i diferents sistemes PAMPA. Cal remarcar que PAMPA  $P_0$  es refereix a dades de permeabilitat intrínseca procedents dels assaigs DS PAMPA però amb un conjunt de dades més gran ( $N=147$ ) i PAMPA COS es refereix als assaigs DS PAMPA però amb l'ús de cosolvents en el compartiment donador per a fàrmacs molt poc solubles en aigua.

L'extensió de l'equació general de solvatació amb l'addició dels dos termes extra ( $J^+$  i  $J^-$ ) per a contemplar la interacció de les espècies iòniques i els ions (equació 23), també s'ha aplicat a alguns sistemes físico-químics com per exemple el sistema de distribució octanol-aigua i sistemes d'HPLC (columna C18 i IAM) [88]. A la Taula 4 es mostren els coeficients d'aquests sistemes així com els respectius paràmetres estadístics.

En general, es pot observar que les estadístiques derivades de les equacions dels compostos neutres són més bones no obstant, s'ha de tenir en compte que la incertesa experimental d'espècies iòniques pot ser més gran que la dels compostos neutres.

**Taula 3.** Coeficients i paràmetres estadístics de diferents sistemes físico-químics caracteritzats a través del model de paràmetres de solvatació.

Sistema físico-químic	Propietat SP	Coeficients							Estadístiques			Referència
		c	e	s	a	b	v	n	R <sup>2</sup>	SD	F	
Octanol - aigua	log P <sub>o/w</sub>	0.088	0.562	-1.054	0.034	-3.460	3.814	613	0.997	0.116	23162	[101]
Columna MSC18 - ACN/tampó aquós	log k <sub>HPLC MSC18</sub>	-0.152	0.151	-0.463	-0.424	-1.719	1.759	55	0.994	0.072	764	[102]
Columna RP18 - ACN/tampó aquós	log k <sub>HPLC RP18</sub>	-0.172	0.233	-0.460	-0.260	-1.574	1.582	55	0.996	0.056	1121	[102]
Columna IAM - ACN/tampó aquós	log k <sub>HPLC IAM</sub>	-0.710	0.292	-0.344	0.141	-1.193	1.161	51	0.991	0.047	480	[102]
STC - tampó aquós	log k <sub>MECK STC</sub>	-1.838	0.613	-0.513	0.319	-2.396	2.390	56	0.984	0.112	305	[103]
SDS - tampó aquós	log k <sub>MECK SDS</sub>	-1.680	0.558	-0.596	-0.266	-1.674	2.717	63	0.991	0.120	618	[99]
DS PAMPA - tampó aquós	log P <sub>0(DS PAMPA)</sub>	-3.970	-0.023	-2.170	-0.950	-3.450	5.010	28	0.885	0.900	34	[59]
HDM PAMPA - tampó aquós	log P <sub>0(HDM PAMPA)</sub>	-3.350	0.106	-1.440	-3.180	-4.240	4.090	20	0.789	0.760	11	[59]
DOPC PAMPA - tampó aquós	log P <sub>0(DOPC PAMPA)</sub>	-4.660	0.520	-0.850	-2.570	-4.070	3.990	31	0.796	1.010	21	[59]
P <sub>0</sub> PAMPA - tampó aquós	log P <sub>0(P<sub>0</sub> PAMPA)</sub>	-4.120	0.250	-1.840	-1.480	-2.460	4.020	147	0.798	1.200	112	[59]
COS PAMPA - cosolvent/tampó aquós	log P <sub>0(COS PAMPA)</sub>	-1.500	-0.130	-1.170	-3.650	-2.760	3.330	24	0.817	0.890	17	[59]
BBB PAMPA - tampó aquós	log P <sub>0(BBB PAMPA)</sub>	-4.860	0.250	-1.290	0.250	-2.370	3.030	66	0.737	0.760	34	[59]

Abreviatures i acrònims (pàgines I-VI)

**Taula 4.** Coeficients i paràmetres estadístics d'alguns sistemes físico-químics caracteritzats a través del model de paràmetres de solvatació per a soluts neutres, espècies iòniques i ions.

Sistema físico-químic	Propietat SP	Coeficients							Estadístiques				Referència	
		c	e	s	a	b	v	j <sup>+</sup>	j <sup>-</sup>	n	R <sup>2</sup>	SD		F
Octanol - aigua	log D <sub>o/w</sub>	0.088	0.562	-1.054	0.034	-3.460	3.814	-3.023	2.580	-	-	-	-	[101]
Columna MSC18 - ACN/tampó aquós	log k <sub>HPLC MSC18</sub>	0.029	0.434	-0.208	-0.311	-1.074	1.511	-0.790	0.707	44	0.929	0.178	-	[104]
Columna IAM - ACN/tampó aquós	log k <sub>HPLC IAM</sub>	-0.607	0.881	-0.562	-0.348	-1.794	2.250	-0.245	2.010	68	0.896	0.431	74	[105,106]

### **1.3.2. Eines de comparació entre sistemes biològics i fisicoquímics**

L'aplicació del model de paràmetres de solvatació tant a sistemes biològics com físico-químics té un avantatge fonamental i és que permet comparar els coeficients de l'equació de solvatació (Equació 22) i avaluar el grau de similitud entre ambdós per tal de trobar sistemes biològics i físico-químics similars. Per tant, el model de paràmetres de solvatació no només permet conèixer les interaccions solut-solvent que governen un procés de partició, sinó que també és útil per trobar sistemes físico-químics que modelin processos de biopartició.

Existeixen diferents eines, tant matemàtiques com visuals, que permeten comparar els sistemes entre si i avaluar la seva semblança:

#### **1.3.2.1. Paràmetre de distància $d$**

Un paràmetre útil per a mesurar la similitud entre sistemes físico-químics i biològics, tots ells caracteritzats a través del model de paràmetres de solvatació, és la distància  $d$ , la qual considera els 5 coeficients d'un sistema com a components d'un vector en un espai de 5 dimensions [102].

La longitud del vector és:

$$l = \sqrt{e^2 + s^2 + a^2 + b^2 + v^2} \quad \text{(Equació 26)}$$

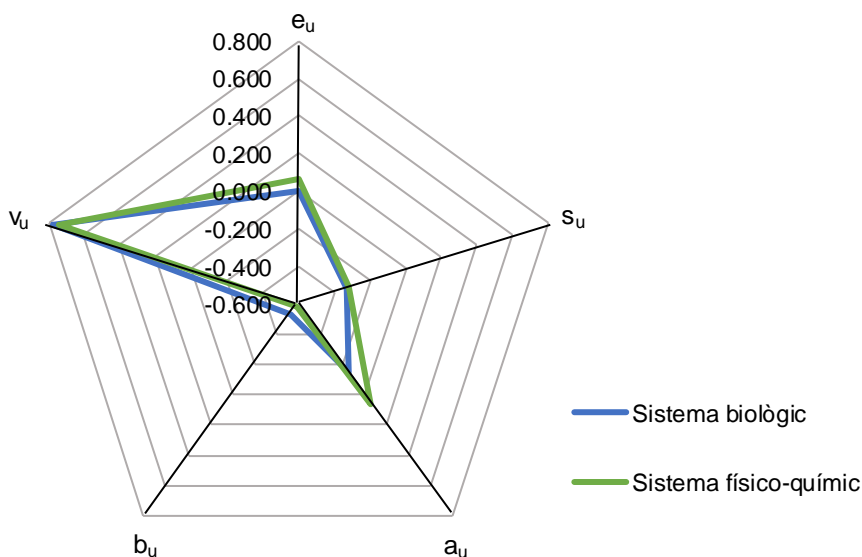
Per a poder comparar els sistemes, els coeficients s'han de normalitzar dividint cada coeficient per la longitud del vector. Per tant, el paràmetre  $d$ , que mesura la distància entre els vectors normalitzats de dos sistemes, es pot calcular d'acord amb la següent expressió:

$$d = \sqrt{(e_{ui} - e_{uj})^2 + (s_{ui} - s_{uj})^2 + (a_{ui} - a_{uj})^2 + (b_{ui} - b_{uj})^2 + (v_{ui} - v_{uj})^2} \quad \text{(Equació 27)}$$

On els subíndexs  $i$  i  $j$  són el sistema biològic i físico-químic respectivament, i el subíndex  $u$  indica que el coeficient està normalitzat.

Com més petit és el valor de la distància  $d$ , més similitud hi ha entre els dos sistemes, considerant que els dos sistemes són similars si  $d$  és inferior a 0.25.

Aquestes distàncies es poden representar de manera simple i visual mitjançant un gràfic radial (gràfic en forma d'estrella). Aquest tipus de gràfic consta de tants vèrtexs com dimensions es representen, en aquest cas els 5 coeficients normalitzats, tal com s'observa a la Figura 12. D'aquesta manera es pot visualitzar fàcilment la semblança que hi ha entre diferents sistemes per cadascun dels coeficients de manera individual.



**Figura 12.** Gràfic radial per a la comparació de sistemes.

### 1.3.2.2. Càlcul de variàncies

Una altra eina que permet conèixer el poder predictiu d'un sistema físico-químic és l'estimació de la variància esperada en correlacionar les dades biològiques i les dades físicoquímiques per a un conjunt representatiu de soluts [107]. D'aquesta manera s'obté una equació tal i com es mostra a continuació:

$$\log SP = q + p \log k$$

**(Equació 28)**

On  $q$  i  $p$  són la intersecció experimental i el pendent de la correlació, respectivament,  $SP$  es correspon a la propietat biològica, i  $k$ , en aquest cas, és el factor de retenció cromatogràfic.

La variància global de la correlació, en aquest cas, és una mesura de la precisió de l'estimació de la propietat biològica. Per aquest motiu, la determinació d'aquesta variància és crucial per avaluar la capacitat predictiva del model de correlació. Es pot considerar que la variància global ( $\sigma_{\text{corr}}^2$ ) és la contribució de tres termes:

$$\sigma_{\text{corr cal}}^2 = \sigma_{\text{bio}}^2 + \sigma_{\text{crom}}^2 + \sigma_{\text{d}}^2 \quad \text{(Equació 29)}$$

On  $\sigma_{\text{bio}}^2$  i  $\sigma_{\text{crom}}^2$  corresponen a la precisió de les dades biològiques i cromatogràfiques, respectivament, i  $\sigma_{\text{d}}^2$  és l'error procedent de la dissimilitud entre els dos sistemes correlacionats. Aquestes variàncies es poden calcular a partir de la desviació estàndard obtinguda de la caracterització dels sistemes biològics i cromatogràfics, respectivament, pel model de paràmetres de solvatació, i la desviació estàndard de la correlació entre els valors calculats de  $\log SP$  i  $\log k$ . Per tant, la variància global pot ser calculada mitjançant la suma d'aquestes tres contribucions:

$$SD_{\text{corr cal}}^2 = SD_{\text{bio}}^2 + (p SD_{\text{crom}})^2 + SD_{\text{d}}^2 \quad \text{(Equació 30)}$$

Quant més petit és el valor  $SD_{\text{corr cal}}^2$ , millor és un sistema físico-químic per emular les propietats d'un sistema biològic concret. A més si  $SD_{\text{d}}^2 < SD_{\text{bio}}^2$  significa que hi ha poc error degut a la dissimilitud entre els sistemes considerats.

### 1.3.3. Validació de models QSAR

El procés de desenvolupament d'un model QSAR es divideix generalment en tres etapes: recopilació de dades, anàlisi de dades i establiment i validació del model. Alhora, l'obtenció d'un model QSAR de bona qualitat depèn de certs factors com la qualitat de les dades biològiques, l'elecció dels descriptors i els mètodes estadístics utilitzats per a la seva validació. Qualsevol model QSAR ha de ser validat adequadament per tal de convertir-se en un model estadísticament robust capaç de realitzar prediccions fiables i precises d'activitats biològiques de compostos no investigats. Per tant, la validació és un aspecte crucial ja que és el procés pel qual la fiabilitat i la rellevància d'un procediment s'establirà per a un propòsit específic [108].

Els passos a seguir per avaluar la validesa dels models QSAR són els següents:

El model requereix una validació interna per avaluar la seva robustesa i una validació externa per avaluar la seva capacitat predictiva. Amb aquesta finalitat, un conjunt de

dades globals utilitzat per establir l'equació del model, es divideix en dos subconjunts, un conjunt de calibratge o *training set* per a la validació interna i un conjunt de predicció o *test set* per a la validació externa [109]. Per construir els dos subconjunts es realitza una representació de *scores* a partir d'una anàlisi de components principals (PCA) basada en els 5 descriptors moleculars d'Abraham dels compostos del conjunt de dades global. Aquesta tècnica s'utilitza per reduir la dimensionalitat d'un conjunt de dades i trobar la seva variabilitat. Els *scores* dels primers dos PCs normalment contenen la majoria d'informació (80 %), per tant un gràfic de *scores* del segon PC en front dels *scores* del primer PC distribueix els soluts d'acord amb les seves propietats físico-químiques, de manera que substàncies pròximes en l'espai dels components principals presenten característiques similars. D'aquesta manera és més fàcil fer una divisió representativa del conjunt global de compostos en els dos subconjunts.

#### 1.3.3.1. Validació interna

El conjunt de calibratge, que té com a objectiu avaluar la robustesa del model, sol tenir al voltant del 50-70 % dels compostos del conjunt de dades global. Els compostos restants s'utilitzen en el conjunt de predicció, que avalua la capacitat predictiva del model. La correlació es repeteix només amb els compostos del *training set*. Els resultats d'aquesta correlació es comparen amb els de la correlació global realitzada prèviament amb el conjunt de dades global. Si el model és robust, els coeficients d'ambdues correlacions han de ser similars. També es consideren, per avaluar la robustesa del model, els paràmetres estadístics tradicionals com el coeficient de correlació (R), la desviació estàndard (SD) i l'estadístic F. Addicionalment, es calcula el coeficient de validació creuada,  $Q^2$  [109,110], que indica la idoneïtat del model per predir noves observacions. Per a l'obtenció d'aquest paràmetre, primer es divideix el conjunt de substàncies en diferents particions de la mateixa mida, a continuació s'elimina un dels subgrups i finalment es calcula l'ajust a partir dels subgrups restants mitjançant la següent equació:

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{\text{training}} (Y - Y_{\text{pred}})^2}{\sum_{i=1}^{\text{training}} (Y - Y_{\text{promig}})^2} \quad \text{(Equació 31)}$$

On  $Y$ ,  $Y_{\text{pred}}$  i  $Y_{\text{promig}}$  són els valors mesurat, predit i promig (aquest últim sobre el conjunt de dades global) de les variables dependents, respectivament. El valor de

$Q^2$  final es calcula a partir del promig de  $Q^2$  de tots els subgrups del *training set*. Un valor de  $Q^2 > 0.6$  és indicatiu de la robustesa del model.

Quan el subconjunt que s'elimina està format per un sol compost, la validació creuada rep el nom de validació creuada deixant un compost fora,  $Q_{LOO}^2$ . En el cas de deixar fora un grup de dades s'anomena validació creuada deixant diversos compostos fora,  $Q_{LSO}^2$ .

### 1.3.3.2. Validació externa

El conjunt de predicció s'utilitza per realitzar la validació externa del model, és a dir, assegurar la seva capacitat predictiva. La validació externa consisteix en predir el valor de la propietat biològica dels compostos del *test set* amb l'equació del conjunt de calibratge. A continuació, els valors calculats de  $\log K_p$  es correlacionen amb els valors experimentals. Per garantir que el model tingui una bona capacitat predictiva, el pendent ha de ser proper a 1 i l'ordenada a l'origen proper a 0. També es calcula el coeficient de la validació creuada mitjançant la següent equació:

$$Q_{ext}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{test} (Y - Y_{pred})^2}{\sum_{i=1}^{test} (Y - Y_{training})^2} \quad \text{(Equació 32)}$$

On  $Y$  i  $Y_{pred}$  són els valors mesurat i predit (amb l'equació obtinguda amb el *training set*) respectivament i  $Y_{training}$  és el promig dels valors de les variables dependents del *training set*. En aquest cas  $Q_{ext}^2$  ha de ser superior a 0.5 [110,111].

### 1.3.4. Habilitat dels sistemes cromatogràfics per a subrogar la permeació de la pell humana

En estudis previs del grup de recerca [112] es va avaluar l'habilitat de diferents sistemes cromatogràfics, concretament cromatografia líquida i cromatografia electrocinètica micel·lar, per subrogar la permeació de la pell de soluts neutres en solució aquosa. Per aquest motiu, els coeficients normalitzats d'aquests sistemes físico-químics es van comparar amb els coeficients normalitzats de l'equació 24 a partir dels paràmetres de la distància  $d$  i l'estudi de variàncies. El sistema de partició octanol-aigua també es va avaluar com a possible sistema de subrogació però no es va tenir en compte ja que la determinació experimental és llarga i tediosa.



La retenció cromatogràfica com a tal no és suficient per a modelar l'absorció dèrmica ja que no engloba tots els factors que controlen aquest procés biològic, principalment la lipofilicitat i la mida molecular del compost, ni amb la mateixa extensió. Per aquest motiu l'addició d'altres variables adequades pot millorar l'estimació de la propietat biològica. Una variable adient és el volum del solut el qual es pot calcular fàcilment per a qualsevol solut a partir de la seva fórmula molecular i el nombre d'anells, utilitzant l'algoritme de Abraham i McGowan per al nombre d'enllaços d'una molècula [84,113]. Per tant, el volum del solut juntament amb un terme relacionat amb la lipofilicitat hauria de millorar considerablement les correlacions. Quan s'aplica la correcció del volum, l'equació de correlació 28 es converteix en la següent equació:

$$\log K_p = q + p (\log k + t/p V) \quad \text{(Equació 33)}$$

La Taula 5 presenta un resum dels coeficients normalitzats del sistema de la permeabilitat en pell i els diferents sistemes cromatogràfics així com el valor de les eines de comparació utilitzades per escollir el sistema d'estudi

Com es pot veure, els valors de  $SD^2_{\text{corr cal}}$ , sense la correcció de volum, són tots força elevats, fet que indica que cap dels sistemes fisicoquímics de la taula és adient per a estimar els coeficients de  $\log K_p$ . D'altra banda, amb la correcció de volum, es pot observar que els sistemes HPLC basats en columnes C18 convencionals són el millor sistema per predir aquesta propietat, ja que tant el paràmetre  $d$  com la variància global calculada tenen valors petits. Per tant, la retenció cromatogràfica d'una columna C18 convencional, corregida pel volum del solut, és un bon paràmetre fisico-químic per estimar el sistema biològic de la permeabilitat de la pell. Aquest sistema es va escollir per establir una metodologia per a la predicció de la permeació de la pell a través de mesures cromatogràfiques [112] i es va desenvolupar només per a soluts neutres a pH 7. L'equació global que es va obtenir es mostra a continuació:

$$\log K_p = - 4.76(\pm 0.18) + 1.44(\pm 0.12) \log k - 1.16(\pm 0.10) V$$

$$n = 27 \quad R^2 = 0.834 \quad SD = 0.390 \quad F = 126 \quad \text{(Equació 34)}$$

**Taula 5.** Coeficients normalitzats, valors de la distancia  $d$  i la predicció de la variància entre el sistema de permeabilitat en pell i els diferents sistemes cromatogràfics amb i sense correcció del volum [112].

Sistema	Coeficients normalitzats					Eines de comparació		
	$e_u$	$s_u$	$a_u$	$b_u$	$v_u$	$d$	$SD_{\text{corr cal}^2}$ sense correcció de volum	$SD_{\text{corr cal}^2}$ amb correcció de volum
<b>Biològic</b>								
Permeabilitat en pell	-0.028	-0.123	-0.123	-0.782	0.598	0.000		
<b>Cromatogràfic</b>								
MSC18 HPLC	0.059	-0.182	-0.167	-0.676	0.692	0.181	0.621	0.258
RP18 HPLC	0.101	-0.200	-0.113	-0.683	0.686	0.200	0.626	0.263
IAM HPLC	0.169	-0.199	0.081	-0.689	0.671	0.316	0.816	0.355
STC MEKC	0.175	-0.147	0.091	-0.686	0.684	0.323	1.045	0.398
SDS MECK	0.169	-0.180	-0.080	-0.507	0.822	0.412	1.229	0.368

#### 1.3.4.1. Influència de la ionització àcid-base en la retenció RP-HPLC

És àmpliament conegut que la retenció de les espècies iòniques en cromatografia líquida de fase inversa (RP-HPLC) és molt menor que la retenció de les espècies neutres. Així, la retenció dels compostos ionitzables, és a dir, compostos amb propietats àcid-base, depèn del seu grau d'ionització [114–119], que al mateix temps depèn del  $pK_a$  del compost i del pH de la fase mòbil. La retenció cromatogràfica d'un anàlit depèn també de la concentració i del tipus de modificador orgànic utilitzat (normalment acetonitril o metanol), que a més de la retenció de l'espècie neutra i iònica també modifica la proporció d'aquestes espècies ja que modifica el  $pK_a$  del compost i el pH de la fase mòbil. Quan s'afegeix un modificador orgànic a un tampó aquós per a preparar una fase mòbil, hi ha un canvi en el  $pK_a$  del tampó i, consegüentment, hi ha una variació en el pH de la mescla hidroorgànica. El pH de la fase mòbil és llavors un paràmetre, addicional a la composició de la fase mòbil, que necessita ser mesurat adequadament.

La correcta mesura del pH en la fase mòbil i la seva influència en la retenció dels soluts ionitzables s'han estudiat prèviament en el grup de recerca [120–123] i en altres [124–129]. Per mesurar el pH d'una fase mòbil s'utilitzen tres procediments diferents. El més fàcil consisteix en calibrar l'elèctrode amb tampons aquosos comercials i mesurar el pH de la solució tampó abans de barrejar-la amb el modificador orgànic ( $^w_p\text{H}$ ). La segona opció consisteix en calibrar l'elèctrode amb tampons comercials preparats en la mateixa composició de solvents que els utilitzats en la fase mòbil i mesurar el pH en aquesta fase mòbil ( $^s_p\text{H}$ ). Per últim, quan l'elèctrode és calibrat amb tampons aquosos comercials però el pH és mesurat en la mescla hidroorgànica, s'obtenen valors de  $^s_p\text{H}$ . La mesura de  $^w_p\text{H}$  no proporciona el grau d'ionització exacte del solut en la fase mòbil, per tant, es recomana mesurar el pH en la fase mòbil, és a dir, l'ús de  $^s_p\text{H}$  i  $^w_p\text{H}$ , per tal d'obtenir bones relacions entre la retenció i el pH. Aquestes dues escales de pH es relacionen mitjançant el paràmetre  $\bar{\delta}$ , constant per a cada composició de fase mòbil [130,131]. No obstant, l'ús de  $^s_p\text{H}$  és especialment útil degut a la seva facilitat de mesura.

La retenció cromatogràfica dels anàlits àcid-base es pot descriure com una funció del pH de la fase mòbil i del  $pK_a$  del solut amb una gràfica sigmoïdal que té un pronunciat salt al voltant del  $pK_a$  [120,121,132]. La derivació de la funció sorgeix de

la definició de la constant de distribució ( $K_C$ ), que és la proporció de les concentracions globals del compost en la fase estacionària ( $C_S$ ) i la fase mòbil ( $C_M$ ) [120]. Atès que les concentracions són difícils de mesurar directament en HPLC, l'equació sol desenvolupar-se en termes de factor de retenció ( $k$ ), que és la proporció de les quantitats de compost en la fase estacionària i la fase mòbil.  $k$  es relaciona amb  $K_C$  a través de la relació entre els volums de la fase estacionària ( $V_S$ ) i fase mòbil ( $V_M$ ):

$$k = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = K_C \frac{V_S}{V_M} \quad \text{(Equació 35)}$$

$V_M$  també s'anomena volum mort [133–136]. La Unió Internacional de Química Pura i Aplicada (IUPAC) defineix el volum mort (temps) en la columna cromatogràfica com el volum de la fase mòbil (o el temps corresponent) necessari per a eluir un component, la concentració del qual en la fase estacionària és insignificant en relació amb la fase mòbil. En altres paraules, aquest component no és gens retingut per la fase estacionària. El volum mort (temps) doncs, és igual al volum de retenció (temps) d'un compost no retingut. Generalment, el volum mort (temps) inclou el volum de la fase mòbil a la columna i també en l'injector, el detector i les diferents connexions. El volum extracolumna, en canvi, depèn del instrument cromatogràfic en particular (injector, detector, longitud i diàmetre intern dels tubs, accessoris dels connectors, etc.). Per tant, és recomanable mesurar la contribució extracolumna per tal d'obtenir dades cromatogràfiques independents de l'instrument utilitzat. Un cop extrets els efectes extracolumna al volum mort, s'obté el volum mort de la columna, és a dir, el volum ocupat per la fase mòbil a la columna. Per aquest motiu, la IUPAC proposa calcular el temps de retenció basat en la correcció pel temps de retenció extracolumna [133]:

$$t_R = t_R^g - t_{\text{excol}} = t'_R + t_M \quad \text{(Equació 36)}$$

on  $t_R$  és el temps de retenció d'un compost,  $t_R^g$  és el temps de retenció observat en el cromatograma des del punt d'injecció fins al detector (temps de retenció brut),  $t_{\text{excol}}$  és la contribució extracolumna,  $t_M$  és el temps d'elució d'un compost no retingut dintre de la columna (temps mort) i  $t'_R$  és el temps addicional que es retarda una molècula

degut a les seves interaccions amb la fase estacionària (temps de retenció ajustat). Donat que  $t'_R = 0$  per a un compost no retingut,  $t_M$  es pot expressar com:

$$t_M = t_M^g - t_{\text{excol}} \quad \text{(Equació 37)}$$

on  $t_M^g$  és el temps mort brut.

Hi ha diversos mètodes per obtenir el temps mort [136,137]: picnometria, sèries homòlogues, marcadors neutres no retinguts i sals inorgàniques. El mètode picnomètric consisteix en omplir la columna amb dos o més solvents de densitats suficientment diferents i el volum mort es calcula a partir de la diferència de pes. En les sèries homòlogues, es representen els temps de retenció de diversos compostos de la mateixa família (n-alquilbenzens, n-alquilalcohols, etc.) en front del corresponent nombre de carbonis i el temps mort es calcula a partir d'una anàlisi de regressió no lineal. Pel que fa als marcadors neutres no retinguts es proposen per a una fase normal no polar el tetraclorometà, el benzè, el toluè, etc., i per a una fase inversa polar la formamida, la tiourea, l'uracil, la urea, etc. En canvi, per a una fase inversa apolar es preferible l'ús de sals inorgàniques ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KBr}$ , etc.) ja que els marcadors neutres es poden retindre parcialment amb la fase estacionària.

Com el volum de la fase estacionària ( $V_s$ ) no es pot mesurar fàcilment i la conversió de  $k$  a  $K_C$  no és gaire factible, el factor de retenció es pot relacionar linealment amb el temps de retenció ajustat o el temps de retenció del compost a través del temps mort:

$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R - t_M^g}{t_M^g - t_{\text{excol}}} \quad \text{(Equació 38)}$$

En el cas d'un compost àcid-base el factor de retenció es pot donar com la suma dels factors de retenció ( $k_i$ ) de totes les espècies àcid-base presents en la solució multiplicats per la fracció molar de cada espècie ( $\alpha_i$ ), és a dir,

$$k = \sum k_i \alpha_i \quad \text{(Equació 39)}$$

L'equació general que relaciona la retenció amb el pH es pot escriure en termes de factor de retenció, temps de retenció ajustat (o volum) o temps de retenció (o volum) [120]. Com que en molts casos no es coneix el temps mort exacte, sembla més

pràctic escriure l'equació en termes de temps de retenció, que és la quantitat directament mesurada. En aquest cas, l'equació general es pot escriure com:

$$t_R = \frac{\sum_{r=0}^n t_{R_{H_n-rA}} 10^{r\text{pH} - \sum_{i=0}^r \text{p}K_{a_i}}}{\sum_{r=0}^n 10^{r\text{pH} - \sum_{i=0}^r \text{p}K_{a_i}}} \quad \text{(Equació 40)}$$

Per a un solut monopròtic, HA, aquesta equació es pot reescriure com:

$$t_R = \frac{t_{R_{HA}} + t_{R_A} 10^{(\text{pH} - \text{p}K_a)}}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_a)}} \quad \text{(Equació 41)}$$

on  $t_{R_{HA}}$  i  $t_{R_A}$  representen el temps de retenció de les formes protonades i no protonades del solut, respectivament (les càrregues s'ometen per simplicitat).

Per a un solut dipròtic, H<sub>2</sub>A, Eq. 40 es pot expressar com:

$$t_R = \frac{t_{R_{H_2A}} + t_{R_{HA}} 10^{(\text{pH} - \text{p}K_{a_1})} + t_{R_A} 10^{(2\text{pH} - \text{p}K_{a_1} - \text{p}K_{a_2})}}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_{a_1})} + 10^{(2\text{pH} - \text{p}K_{a_1} - \text{p}K_{a_2})}} \quad \text{(Equació 42)}$$

on  $t_{R_{H_2A}}$ ,  $t_{R_{HA}}$  i  $t_{R_A}$  representen els temps de retenció del solut diprotonat, monoprotonat i no protonat, respectivament.

L'equació 41 s'aplica a àcids i bases monopròtiques, sent HA i A<sup>-</sup> o HA<sup>+</sup> i A, respectivament, les diferents espècies. De la mateixa manera, l'equació 42 s'aplica per als àcids dipròtics (amb les espècies H<sub>2</sub>A, HA<sup>-</sup> i A<sup>2-</sup>) i per a les bases dipròtiques (amb les espècies H<sub>2</sub>A<sup>2+</sup>, HA<sup>+</sup> i A) i també per als amfòlits (amb les espècies H<sub>2</sub>A<sup>+</sup>, HA i A<sup>-</sup>).

S'ha comprovat extensament que la capacitat d'ajust d'aquestes equacions només es garanteix quan els valors de pH i pK<sub>a</sub> corresponen als de la fase mòbil en particular [122–125, 130, 138, 139].



## **2. OBJECTIUS**





La mesura de la permeabilitat a través de la pell sol ser una tasca llarga, complicada i costosa degut a la complexitat de les mostres biològiques. Per aquest motiu, és necessari trobar mètodes més ràpids, senzills i econòmics per predir aquesta propietat. Els sistemes cromatogràfics i el model de pell artificial skin PAMPA s'estudien per saber si poden ser una bona alternativa.

En aquest sentit, els objectius d'aquest treball són principalment tres:

- Establir i validar estadísticament una metodologia per determinar valors de la permeabilitat de la pell a partir de mesures cromatogràfiques i mesures de permeabilitat skin PAMPA.
- Estudi de l'efecte de la ionització de compostos de caràcter àcid-base en l'estimació de la permeabilitat de la pell.
- Comparar els mètodes anteriors i trobar-ne un que predigui la permeabilitat cutània de forma ràpida, fàcil i segura durant el procés de descobriment de fàrmacs i aplicar-lo a les línies d'investigació d'Esteve Pharmaceuticals, centrades en el tractament del dolor amb administració per via cutània



# **3. MATERIALS I MÈTODES**



### **3.1. SOLUTS ESTUDIATS**

Per a dur a terme els diferents estudis d'aquesta tesi s'han utilitzat un total de 95 anàlits. Es tracta de compostos químicament diversos així com compostos d'interès farmacèutic coneguts en l'àmbit de l'absorció dèrmica. També s'ha tingut en compte per a la selecció dels diferents soluts la disponibilitat de dades biològiques del coeficient de permeabilitat de la pell ( $K_p$ ). La gran majoria dels soluts s'han obtingut de cases comercials com Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanya), Fluka Analytica VWR (West Chester, PA, USA), Riedel-de Haën (Seelze, Alemanya), Merck (Darmstadt, Alemanya), Carlo Erba (Milano, Italy) i Baker (Center Valley, PA, USA). D'altres s'han sintetitzat als laboratoris Esteve (Barcelona, Espanya).

Els soluts estudiats són tant compostos neutres com compostos amb propietats àcid-base: àcids i bases monopròtiques i dipròtiques i soluts amfòters. A l'Annex 1 es detallen els valors dels coeficients de permeabilitat de la pell ( $K_p$ ) [94], els descriptors moleculars d'Abraham de cada solut (E, S, A, B, V, J<sup>+</sup>, J<sup>-</sup>) [140], els coeficients de partició octanol/aigua ( $\log P_{o/w}$ ) i les constants de dissociació àcid-base en aigua ( $pK_a$ ). Tots aquests paràmetres són necessaris per a la discussió dels resultats de la tesi. Els valors experimentals de  $\log P_{o/w}$  s'han recopilat principalment del programa BioLoom [141]. Els valors experimentals de  $pK_a$  s'han obtingut de diferents fonts bibliogràfiques [141–148] amb unes condicions experimentals, en la majoria dels casos, de força iònica igual a zero i una temperatura de 25 °C.

#### **3.1.1. Recopilació de dades biològiques de la permeabilitat de la pell**

Per establir un bon model de predicció és fonamental l'avaluació de la qualitat de les dades biològiques. Idealment, els valors deurien d'estar determinats sota les mateixes condicions experimentals i el mateix equipament de laboratori, no obstant, això resulta complicat sobretot quan les dades procedeixen de diferents fonts bibliogràfiques. Per tal de minimitzar l'efecte de l'entorn experimental en la base de dades de qualitat, aquestes haurien de satisfer els següents criteris:

- a. Utilitzar dades obtingudes a partir de sistemes de difusió *in vitro* com les cel·les de difusió estàtiques o de flux continu.
- b. Emprar membranes de pell extirpada de procedència humana.
- c. Fer servir solucions totalment aquoses en el compartiment donador, sense cap solvent orgànic que pugui afectar a la permeació.

Seguint el criteris anteriors, en aquesta tesi s'han emprat principalment valors de  $K_p$  de la base de dades de Zhang et al. [94] la qual és un recull d'altres fonts bibliogràfiques [93,149]. Aquesta base de dades conté valors experimentals dels coeficients de permeabilitat, com a  $\log K_p$ , d'espècies neutres i espècies iòniques.

### **3.2. REACTIUS AUXILIARS I SOLVENTS**

L'aigua s'ha purificat amb el sistema purificador d'aigua Milli-Q de Millipore (West Chester, PA, USA) amb una resistivitat de 18.2 M $\Omega$  cm.

Com a solvent orgànic per a les fases mòbils s'ha utilitzat acetonitril de qualitat LC-MS, proveït per Fluka Analytical VWR (West Chester, PA, USA), i acetonitril de qualitat HPLC, obtingut a través de Merck (Billerica, MA, USA) i Scharlau (Sentmenat, Espanya).

Els reactius utilitzats per a preparar els tampons de les fases mòbils són fosfat de sodi monohidratat (Sigma-Aldrich,  $\geq 99.0$  %), àcid fòrmic (Scharlau, eluent additive for LC-MS), àcid acètic (Fluka Analytical, eluent additive for LC-MS), etilendiamina (Fluka Analytical,  $\geq 99.5$  %), amoníac al 25 % (Scharlau, extrapur) i acetat d'amoni (Scharlau, qualitat HPLC). Els pH dels diferents tampons s'ajusten amb àcid acètic diluït, amoníac diluït o àcid clorhídric diluït.

En l'assaig de permeació a través de cel·les de Franz, els reactius emprats per a preparar les solucions donadores i acceptores són els següents: àcid cítric monohidratat (Carlo Erba,  $>99.8$  %), citrat de sodi dihidratat (Baker,  $>99$  %), àcid acètic glacial 100 % (Merck), acetat de sodi trihidratat (Merck, pro analysis),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  anhidre (Scharlau, extrapure),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Scharlau, reagent grade), àcid bòric (Scharlau, reagent grade) i tetraborat de sodi,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich,  $> 99.5$  %). El sèrum fisiològic, utilitzat per a hidratar les membranes de pell humana, es prepara dissolent 9 g de NaCl (Scharlau, reagent grade) amb 1 L d'aigua (NaCl al 0.9 %).

En l'assaig skin PAMPA, les solucions donadores i acceptores es preparen a partir d'una solució tamponada universal que rep el nom de PRISMA HT<sup>TM</sup>. Aquesta solució ha sigut dissenyada per Pion Inc (Billerica, MA, USA) i està formada per diversos compostos amb valors de  $pK_a$  espaiats uniformement per tal d'aportar una capacitat amortidora constant al llarg de l'interval de pH 3-10. La força iònica de la

solució original de PRISMA HT™ és aproximadament 10 mM. 25 mL d'aquesta solució concentrada es dilueixen fins a 1 L d'aigua purificada. D'aquesta solució diluïda s'obtenen diferents solucions ajustant els valors de pH entre 3 i 10 amb l'addició gota a gota d'una solució NaOH 0.5 M. Per rehidratar la membrana de pell artificial es requereix una solució d'hidratació comercialitzada per Pion Inc (Billerica, MA, USA).

### **3.3. EXPERIMENTS IN VITRO AMB CEL·LES DE DIFUSIÓ DE FRANZ**

#### **3.3.1. Instruments**

Per a la quantificació de les mostres, s'utilitza un instrument Shimadzu UHPLC Nexera integrat amb dues bombes isocràtiques LC-30AD, autoinjector SIL-30AC i detector en sèrie de díodes SPD-M20A. El control de l'equip i el processat de dades es realitzen amb el software LabSolution. Les dades de retenció cromatogràfica s'obtenen amb una columna analítica Kinetex Evo C18 proporcionada per Phenomenex (Torrance, CA, USA) de 2.6 µm de mida de partícula, 4.6 mm de diàmetre intern i 100 mm de longitud. Les condicions cromatogràfiques són: acetat d'amoni 10 mM i acetonitril com a fase mòbil, cabal de 0.8 mL/min, elució amb gradient lineal (de 25 % a 95 % d'ACN), temps d'anàlisi de 7 minuts, volum d'injecció de 5 µL i detecció per DAD. La temperatura de la columna és de 25 °C.

El pH de les solucions tampó utilitzades com a solucions donadores i acceptores es mesura a través d'un elèctrode combinat Crison 5202 incorporat en un pH-metre Crison 2001 (Hach Lange Espanya, Hospitalet de Llobregat, Espanya) amb una precisió ± 0.01 unitats de pH. Per assegurar la capacitat amortidora del tampó, el pH de la solució donadora es mesura abans i després de l'experiment ja que la concentració de solut és molt elevada i això podria modificar la capacitat amortidora del tampó al llarg de l'assaig.

Per a mesurar el pH del tampó fet servir com a solvent aquós de la fase mòbil s'utilitza un elèctrode combinat CRISON 5014 i un potenciòmetre CRISON model pH METER GLP 22 amb precisió ± 0.002 unitats de pH.

Ambdós elèctrodes es calibren amb solucions comercials de tampó aquós a pH 4.01 i 7.00 (25 °C).



### **3.3.2. Preparació de les mostres de pell**

La pell utilitzada per als assaigs de permeabilitat *in vitro* és pell humana, ja que és la més acceptada per la comunitat científica per a aquest tipus d'estudi. La pell s'obté a través d'una col·laboració amb el servei de cirurgia estètica de l'hospital Clínica Quirón (València, Espanya). S'utilitza pell caucàsica d'abdomen femení de donants entre 35 i 60 anys. Les mostres de pell es netegen eliminant l'excés de greix i els teixits subcutanis i seguidament es congelen a -20 °C durant un màxim de 3 mesos. L'ús de pell humana ha sigut aprovat a través del comitè ètic de la Universitat de València. Els protocols ètics de l'estudi són el número H1381683846659 i H1540295606992 (Annex 2 i 3, respectivament).

El mateix dia de l'experiment les mostres de pell es descongelen i seguidament les membranes epidèrmiques es preparen a través de la tècnica de separació per calor. Es tallen discs de pell de 25 mm de diàmetre amb un punxó i posteriorment la pell es submergeix en un bany d'aigua destil·lada durant 90 segons a una temperatura de 60 °C. Aquestes condicions són òptimes per aconseguir debilitar les unions existents entre la dermis i l'epidermis. Després de 90 segons, la pell es retira del bany i es submergeix en una placa de Petri que conté una solució de NaCl 0.9 % (sèrum fisiològic). Aquesta solució és necessària per refredar la pell i que aquesta es mantingui hidratada. A continuació, l'epidermis es separa de la dermis amb unes pinces de punta corba per a no danyar-la i es col·loca a sobre d'una membrana de diàlisi Spectra/Por™ que serveix de suport i permet només la difusió del fàrmac. Totes aquestes etapes es mostren visualment a la figura següent:



**Figura 13.** Preparació de les mostres de pell. **A:** Bany d'aigua a 60 °C. **B:** Separació de l'epidermis. **C:** Suport de la membrana de diàlisi.

### **3.3.3. Assaig de permeació**

Els estudis de permeació *in vitro* s'han dut a terme amb cel·les de difusió de Franz. Aquestes tenen una àrea de difusió de 1.768 cm<sup>2</sup> i un volum receptor de 12 mL. Pel que fa al seu muntatge, l'epidermis juntament amb la membrana de diàlisi es col·loquen entre el compartiment donador i el compartiment receptor de les cel·les de difusió de manera que l'estrat corni es troba en contacte amb el donador i la membrana de diàlisi amb el receptor. Els dos compartiments queden segellats per una pinça. Es fixa un agitador al compartiment receptor. Les cel·les es col·loquen en un bany d'aigua amb agitació i es deixen equilibrar durant 1 hora. Seguidament es retiren les bombolles d'aire que es formen a les cel·les.

Les solucions donadora i acceptora consisteixen en solucions tampó al mateix valor de pH. Les condicions *sink* s'aconsegueixen igualment gràcies al major volum del compartiment acceptor (12 mL) en comparació amb el del donador (1 mL). Els experiments es realitzen a diferents valors de pH, entre 3.5 i 8. No es duen a terme experiments per sota de pH 3 ni per sobre de pH 8 per tal de no danyar la integritat de la membrana. Les solucions tampó es preparen a partir de l'àcid i la base conjugada a una concentració total de 0.067M. A pH 3.5 es van utilitzar mesclades de cítric/citrat, entre pH 4-5, mesclades acètic/acetat, entre 5.5 i 7.4, mesclades hidrogenfosfat/dihidrogen fosfat i finalment a pH 8, bòric/borat. Per tal de garantir que els experiments es realitzen amb condicions de dosi infinita, s'aplica al compartiment donador 1 mL de solució saturada de fàrmac al 80 %. Aquest es cobreix amb parafilm per tal de prevenir l'evaporació. La temperatura d'incubació és de 32 °C.

Les etapes de preparació de l'assaig es clarifiquen de manera visual a la figura que es mostra a continuació:



**Figura 14.** Preparació de l'assaig de permeació *in vitro* a través de cel·les de Franz. **A:** Preparació de la solució acceptora. **B:** Muntatge de la cel·la de Franz. **C:** Aplicació del fàrmac i inici de l'experiment.

Un cop iniciat l'experiment, la presa de mostra es realitza en el compartiment receptor amb un volum de 400  $\mu\text{L}$  i a intervals de temps predeterminats (1 hora) seguit d'un reemplaçament amb el mateix volum de solució receptora temperada. Al final de l'experiment, s'afegeixen al compartiment donador 200  $\mu\text{L}$  de vermell de fenol per tal de comprovar la integritat de la membrana. Aquest compost comença a difondre a través de l'epidermis a partir d'una hora, no obstant si la pell té algun tipus d'alteració el marcador tenyeix visiblement el compartiment receptor en qüestió de minuts. Si això ocorre és necessari descartar la cel·la de Franz.

El mètode és validat per a cada compost mitjançant una validació intra-dia i inter-dia per tal d'avaluar la linealitat, la precisió i l'exactitud. L'interval de concentració de les corbes de calibratge és 0.05-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

La quantitat acumulada de fàrmac permeat es representa en front del temps. L'estat estacionari de la difusió s'identifica per la linealitat de la corba concentració acumulada vs. temps. El flux correspon al pendent de la corba i el coeficient de permeabilitat es calcula a partir de l'equació 4. Els resultats són la mitjana de 4 replicats.

### **3.4. SISTEMA CROMATOGRÀFIC**

#### **3.4.1. Instruments**

Les mesures cromatogràfiques es realitzen mitjançant un instrument HPLC Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) 1200 Series equipat amb una bomba binària G1312B i un autoinjector G1367D. S'utilitza un detector UHD 6540 Accurate-Mass Q-TOF amb ionització per electrospray (mode positiu o mode negatiu) per a la majoria de compostos. No obstant, amb el tampó fosfat s'empra un detector de fila de díodes (DAD) G1315C a 254 nm. El control de l'equip i el processat de dades es realitzen amb el software Mass Hunter 4.0. Les dades de retenció cromatogràfica s'obtenen amb una columna analítica Kinetex Evo C18 proporcionada per Phenomenex (Torrance, CA, USA) de 2.6  $\mu\text{m}$  de mida de partícula, 4.6 mm de diàmetre intern i 100 mm de longitud. Aquesta columna aporta una tecnologia core-shell i és estable en un interval de pH 1-12.

Les mesures de pH de la fase mòbil es fan amb un elèctrode combinat Crison 5202 incorporat en un pH-metre Crison 2001 (Hach Lange Espanya, Hospitalet de

Llobregat, Espanya) amb una precisió  $\pm 0.01$  unitats de pH. L'elèctrode es calibra amb solucions comercials de tampó aquós a pH 4.01 i 7.00 (25 °C).

### **3.4.2. Procediment**

Els diferents anàlits s'injecten en el sistema HPLC a 6 valors diferents de pH, entre 2 i 11. La composició de la fase mòbil és 40 % acetonitril i 60 % tampó aquós. Segons la solució del tampó, s'utilitza un mode de detecció o altre. En l'interval de pH de 3 a 11, s'utilitzen com a tampó solucions volàtils, compatibles amb espectrometria de masses, per aquest motiu el mode de detecció és aquest mateix. A pH 3, 5 i 9 es fa servir àcid fòrmic, àcid acètic i amoníac al 25 %, respectivament. L'etilendiamina, en canvi, s'utilitza a pH 7 i 11. Les concentracions de tampó a pH 3, 5, 7, 9 i 11 són 10 mM i s'ajusten mitjançant l'addició d'àcid acètic diluït o amoníac diluït. A pH 2, la detecció es realitza per UV ja que s'utilitza com a solució tampó una barreja d'àcid fosfòric i dihidrogenfosfat sòdic a una concentració 50 mM. El pH d'aquest s'ajusta amb àcid clorhídric diluït.

Els valors de pH dels tampons HPLC aquosos es mesuren abans i després de barrejar-los amb el modificador orgànic, obtenint així els valors de  $^w_p\text{pH}$  i  $^s_p\text{pH}$ .

Pel que fa als anàlits, primer es preparen solucions stock a una concentració de 5 mg/mL dissolent la quantitat corresponent de solut en metanol. A partir de les solucions stock, es preparen solucions més diluïdes (0.1 mg/mL) mitjançant la dilució d'una alíquota de la solució stock anterior en una barreja de ACN-H<sub>2</sub>O (40:60). Es fan servir condicions isocràtiques amb un cabal d'1 mL/min i un volum d'injecció de 10 µL. La temperatura de la columna és de 25 °C.

#### **3.4.2.1. Mesura del temps extracolumna i del temps mort**

Donat que s'utilitzen diferents sistemes de detecció, és necessari tenir en compte el temps extracolumna. Per a mesurar els temps extracolumna s'utilitza una connexió cromatogràfica amb un volum mort insignificant.

Els temps extracolumna i també els temps morts s'han mesurat mitjançant injeccions de solucions aquoses de bromur de potassi, detectades per UV a 200 nm, dimetilsulfòxid, detectades per ESI+, i iodur de potassi, detectades per ESI-. La concentració d'aquestes solucions és de 0.1 mg/mL.

El temps mort també s'ha mesurat mitjançant la tècnica de la picnometria. La columna s'omple de manera successiva amb aigua pura, metanol i acetonitril a una temperatura constant de 25 °C. Aquests dissolvents es bombegen a través de la columna amb un cabal constant d'1 mL/min durant una hora. Immediatament després, la bomba s'atura, l'entrada i la sortida de la columna es segella amb taps de rosca i es pesa. Aquest procés es repeteix tres cops. A partir del pes i les densitats de cada solvent es calcula el volum mort (o temps mort).

A tots els temps de retenció mesurats (incloent els temps morts) se'ls ha restat el temps extracolumna. Els valors de temps extracolumna obtinguts són 0.048 min per a la detecció UV i 0.249 min per a la detecció de MS.

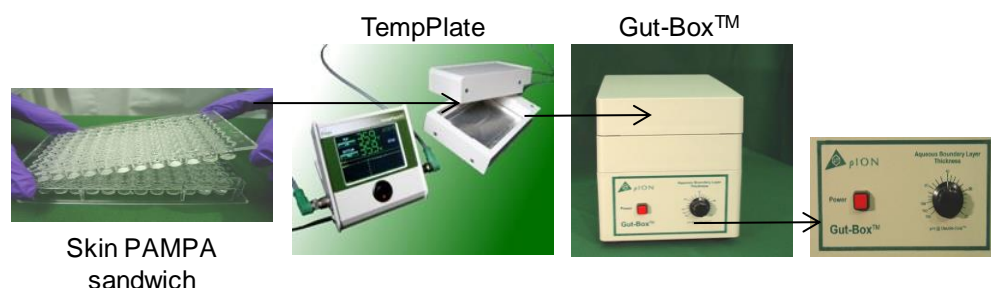
A l'Annex 4 es mostren tots els valors dels temps retenció mesurats als diferents valors de pH de la fase mòbil ( $\text{pH}_w^S$ ).

### **3.5. ASSAIG SKIN PAMPA**

#### **3.5.1. Instruments**

Les mesures de permeabilitat s'han dut a terme amb l'instrument PAMPA Explorer Permeability Assay, de Pion Inc (Billerica, MA, USA). Aquest instrument està format per dos components: el Gut-Box™ i el TempPlate. El Gut-Box™ és un dispositiu mecànic que s'utilitza en els assaig PAMPA per reduir el gruix de la capa aquosa limitant (ABL). El TempPlate es fa servir per a controlar la temperatura durant la incubació de les plaques.

A la següent figura es mostren els diferents components de l'instrument PAMPA Explorer:



**Figura 15.** Components de l'instrument PAMPA Explorer Permeability Assay [150].

Les mesures cromatogràfiques per a la quantificació de les mostres es realitzen amb un instrument Waters (Milford, MA, USA) I-Class UPLC equipat amb un detector DAD i un Agilent (Santa Clara, CA, USA) 1290 Infinity II UHPLC equipat amb un detector DAD i un sistema de quadrupol simple 6120 el qual opera amb ionització per electrospray en mode positiu i negatiu. Ambdós sistemes integrats amb autoinjector de plaques. El control de l'equip i el processat de dades es realitzen amb el software Empower i OpenLab, respectivament. Les columnes necessàries per a les determinacions són: Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) i Zorbax RRHD SB-C18 (50 x 2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ). Les condicions cromatogràfiques són: àcid fòrmic al 0.1 % i acetonitril com a fase mòbil, cabal de 0.8 mL/min, elució amb gradient lineal (de 2 % a 98 % d'ACN), temps d'anàlisi de 2.5 minuts, volum d'injecció de 5  $\mu\text{L}$  i detecció per DAD. La temperatura de la columna és de 35  $^{\circ}\text{C}$ .

Les mesures de pH de les solucions donadores i acceptores es fan amb un elèctrode combinat Crison 5202 incorporat en un pH-metre Crison 2001 (Hach Lange Espanya, Hospitalet de Llobregat, Espanya) amb una precisió  $\pm 0.01$  unitats de pH. L'elèctrode es calibra amb solucions comercials de tampó aquós a pH 4.01 i 7.00 (25  $^{\circ}\text{C}$ ).

### **3.5.2. Mètode Skin PAMPA**

Primer de tot, la part superior del skin PAMPA *sandwich*, que conté la membrana, s'hidrata durant tota la nit amb la solució d'hidratació mencionada en l'apartat 3.2.

Pel que fa a les solucions dels anàlits, primer es preparen solucions stock a una concentració 10 mM dissolent la quantitat corresponent de solut en DMSO (Carlo Erba, Milano, Italia). A continuació, es preparen solucions més diluïdes (50  $\mu\text{M}$ ) mitjançant la dilució de 5  $\mu\text{L}$  de solució stock en 1 mL de solució diluïda de tampó PRISMA HT<sup>TM</sup> a diversos valors de pH. Per tal de crear condicions *sink*, es duen a terme assajos sota condicions de gradient de pH, és a dir, el compartiment donador (placa inferior) varia el seu valor de pH de 3 a 10 mentre que el compartiment acceptor (placa superior) manté el pH a 7.4. Abans de començar l'assaig, la placa donadora s'omple amb 180  $\mu\text{L}$  (per a assaigs amb agitació) o 200  $\mu\text{L}$  (per a assaigs sense agitació) de solució d'anàlit i la placa acceptora s'omple amb 200  $\mu\text{L}$  de solució diluïda de tampó PRISMA HT<sup>TM</sup> a pH 7.4. El volum del donador s'ha de disminuir en els assaigs amb agitació ja que els imants d'agitació tenen un volum de 20  $\mu\text{L}$  i això

pot crear un desbordament del líquid. El Gut-Box™ s'utilitza per agitar tant el compartiment donador com l'acceptor. Per tal de minimitzar la contribució de la capa ABL a la permeabilitat mesurada s'empra una agitació vigorosa, amb una velocitat d'agitació fixada per tal de produir un gruix de la capa ABL d'aproximadament 60  $\mu\text{m}$ .

El skin PAMPA *sandwich* s'incuba a una temperatura de 32 °C amb l'ajuda del dispositiu TemPlate. Un cop transcorregut el temps de permeació, es separen les plaques i es quantifiquen les concentracions d'acceptor ( $C_A(t)$ ), donador ( $C_D(t)$ ) i referència (solucions inicials de mostra,  $C_D$  a  $t = 0$ ) mitjançant els sistemes cromatogràfics mencionats. L'interval de concentració de les corbes de calibratge és 0.02-50  $\mu\text{g/mL}$

Per a calcular els valors de la permeabilitat efectiva s'utilitza l'equació 14. Els valors constants dels diferents paràmetres d'aquesta equació són: volum de solució en el compartiment donador,  $V_D = 180 \mu\text{L}$  (assaig amb agitació) o  $V_D = 200 \mu\text{L}$  (assaig sense agitació), àrea de la membrana,  $A = 0.3 \text{ cm}^2$ , i porositat aparent de la membrana,  $\varepsilon_a = 0.76$ .

A l'Annex 5 es presenten els valors de les permeabilitats efectives skin PAMPA de 74 anàlits, mesurades a diferents valors de pH.

### **3.6. TRACTAMENT DE DADES**

Per als càlculs i les anàlisis de regressió lineal s'ha fet servir el Microsoft Excel 2016.

Les regressions no lineals de la retenció experimental, la permeabilitat efectiva skin PAMPA i la permeació de la pell amb el pH es realitzen utilitzant el software comercial TableCurve 3D 4.0.

Per a l'anàlisi dels components principals s'ha utilitzat el programa quimiomètric MATLAB® (MathWorks).

# **4. RESULTATS I DISCUSSIÓ**





## **4.1. ESTABLIMENT DE MODELS D'ESTIMACIÓ DE LA PERMEABILITAT A TRAVÉS DE LA PELL PER SOLUTS I ESPÈCIES NEUTRES**

El model *in vitro* de les cel·les de difusió de Franz és el mètode de referència per a la determinació dels coeficients de permeabilitat a través de la pell ( $K_p$ ), no obstant això, és laboriós, costos i èticament qüestionable, a més de sofrir de baixa reproduïbilitat intra- i inter-laboratori [27]. Per tant, és important trobar mètodes més ràpids, senzills i econòmics per predir la propietat biològica de la permeabilitat de la pell. El sistema cromatogràfic amb columnes C18 convencionals i el sistema de membrana artificial skin PAMPA poden ser una bona alternativa.

### **4.1.1. Model cromatogràfic**

Com s'ha comentat a la part introductòria, en estudis previs es va avaluar l'habilitat de diferents sistemes cromatogràfics per subrogar la permeació de la pell i es va observar que la retenció cromatogràfica d'una columna C18 convencional, corregida pel volum del solut, és un bon paràmetre físico-químic per estimar el sistema biològic de la permeabilitat de la pell de substàncies neutres. Així doncs, aquest sistema es va escollir per establir una metodologia per a la predicció de la permeació de la pell de nous compostos mitjançant una correlació entre els paràmetres  $\log K_p$  i  $\log k$  i  $V$ . En aquest treball l'estudi també s'aplica a compostos en la seva forma neutra, però s'amplia a substàncies d'interès farmacèutic amb un ampli interval de valors de  $pK_a$  que contenen tant funcions àcides com bàsiques. A més, s'utilitza una columna amb especificacions diferents a les estudiades prèviament (XTerra MSC18 i XTerra RP18). Les columnes C18 són en general molt similars pel que fa a les propietats de partició, tanmateix, poden canviar lleugerament degut a les modificacions en el procés de manufacturació, l'ús de la columna, diferent fabricant o diferents especificacions. Per aquest motiu, és necessària la caracterització i calibració de les columnes utilitzades.

#### **4.1.1.1. Caracterització a través del model de paràmetres de solvatació del sistema Kinetex Evo C18 i comparació de sistemes cromatogràfics**

Un cop injectats els 95 anàlits en el sistema HPLC, els factors de retenció ( $k$ ) es calculen mitjançant l'equació 38. Els temps de retenció dels soluts neutres i espècies

neutres dels compostos ionitzables es determinen a partir dels temps de retenció mesurats al pH o l'interval de pH on els compostos es troben en forma neutra. Com a temps mort s'utilitza el determinat a partir d'una solució de DMSO, un marcador neutre no retingut. El temps de retenció d'aquest compost ( $0.83 \pm 0.01$  minuts, valor promig als diferents valors de pH) és molt similar als obtinguts mitjançant les mesures picnomètriques: la columna s'omple successivament amb tres solvents de diferents densitats; aigua pura, metanol i acetonitril, i seguidament es pesa amb cada solvent [135,136]. Els valors de les densitats són  $0.9971$ ,  $0.7866$  i  $0.7766$  g/mL a  $25$  °C per a aigua pura, metanol i acetonitril, respectivament [151,152]. Els resultats obtinguts per a la columna utilitzada són  $0.84 \pm 0.01$  mL i  $0.86 \pm 0.01$  mL utilitzant els parells de solvents aigua/metanol i aigua/acetonitril, respectivament. Tenint en compte que el cabal és d'1 mL/min, els valors del volum mort es corresponen amb temps mort de  $0.84$  i  $0.86$  min (valor promig igual a  $0.85$  min). Per tant s'assumeix que  $0.83$  es pot prendre com el temps mort de substàncies neutres i espècies neutres. Substituint aquest valor a l'equació 38, s'obté la següent expressió:

$$k = \frac{t_{R_{\text{neutres}}} - t_{M_{\text{neutres}}}}{t_{M_{\text{neutres}}}} = \frac{t_{R_{\text{neutres}}} - 0.83}{0.83} \quad \text{(Equació 43)}$$

Els valors dels factors de retenció en forma logarítmica,  $\log k$ , dels 95 anàlits es mostren a la taula següent:

**Taula 6.** Recull de valors de  $\log k$  calculats a partir dels temps de retenció experimentals al pH o l'interval de pH on el solut es troba en forma neutra. Els valors dels temps retenció mesurats als diferents valors de pH de la fase mòbil es troben a l'Annex 4. Per a cada compost es mostra la seva desviació estàndard.

Soluts	$\log k$
2,4-Diclorofenol	$0.446 \pm 0.005$
2-Amino-4-nitrofenol	$-0.232 \pm 0.070$
2-Clorofenol	$0.119 \pm 0.008$
2-Feniletanol	$-0.155 \pm 0.008$
2-Isopropil-5-Metilfenol (timol)	$0.743 \pm 0.005$
2-Naftol	$0.302 \pm 0.006$
2-Nitrofenol	$0.232 \pm 0.007$
2-Nitro-p-fenilendiamina	$-0.426 \pm 0.017$
2-Toluïdina	$0.025 \pm 0.011$
3-Metilfenol (m-cresol)	$0.042 \pm 0.006$
3-Nitrofenol	$0.021 \pm 0.009$
3-Xilè	$0.967 \pm 0.005$

(Continuació Taula 6)

<b>Soluts</b>	<b>log k</b>
4-Amino-2-nitrofenol	-0.174 ± 0.016
4-Bromofenol	0.242 ± 0.006
4-Cloro-3-metilfenol (4-cloro-cresol)	0.359 ± 0.006
4-Clorofenol	0.177 ± 0.007
4-Etilfenol	0.261 ± 0.008
4-Hidroxifenilacetamida	-0.891 ± 0.082
4-Hidroxi-metilfenilacetat	-0.368 ± 0.009
4-Metilfenol (p-cresol)	0.039 ± 0.006
4-Nitrofenol	-0.036 ± 0.021
5-Fluorouracil	-1.595 ± 0.691
8-Metoxipsoralè	0.253 ± 0.008
Àcid 2-hidroxibenzoic (àcid salicílic)	-0.035 ± 0.001
Àcid 4-hidroxifenilacètic	-0.670 ± 0.001
Àcid 5,5-dietilbarbitúric (barbital)	-0.564 ± 0.017
Àcid 5-etil-5-fenilbarbitúric (fenobarbital)	-0.198 ± 0.009
Àcid benzoic	-0.183 ± 0.014
Alcohol 4-hidroxibenzílic	-0.839 ± 0.062
Alcohol benzílic	-0.290 ± 0.008
Aminopirina	-0.230 ± 0.009
Anilina	-0.163 ± 0.012
Antipirina	-0.511 ± 0.058
Aspirina (àcid acetilsalicílic)	-0.278 ± 0.034
Atrazina	0.302 ± 0.011
Atropina	0.418 ± 0.004
Benzaldehid	0.087 ± 0.006
Benzè	0.473 ± 0.005
Benzil nicotinat	0.447 ± 0.009
Cafeïna	-0.798 ± 0.062
Capsaïcina	0.761 ± 0.005
Catecol	-0.472 ± 0.024
Clorfeniramina	0.900 ± 0.007
Codeïna	-0.065 ± 0.063
Cortexolona	0.147 ± 0.010
Corticosterona	0.097 ± 0.011
Cortisona	-0.162 ± 0.013
Cumè	1.171 ± 0.006
Dexametasona	0.034 ± 0.028
Diclofenac	0.894 ± 0.008
Dietilcarbamazina	-0.274 ± 0.069
Digitoxina	0.530 ± 0.011
Efedrina	0.158 ± 0.002
Escopolamina	-0.257 ± 0.041
Estradiol	0.422 ± 0.007
Estriol	-0.325 ± 0.016
Estrona	0.589 ± 0.007
Etilbenzè	0.960 ± 0.005
Famotidina	-0.821 ± 0.021
Fenol	-0.152 ± 0.010
Fentanil	1.037 ± 0.004
Fluocinonida	0.797 ± 0.008

(Continuació Taula 6)

Soluts	log <i>k</i>
Flurbiprofèn	0.784 ± 0.008
Griseofulvina	0.379 ± 0.011
Hidrocortisona	-0.222 ± 0.015
Hidroquinona	-0.830 ± 0.072
Hidroxiprogesterona	0.600 ± 0.008
Ibuprofèn	0.906 ± 0.006
Indometacina	0.900 ± 0.009
Isoquinolina	0.071 ± 0.010
Ketoprofèn	0.434 ± 0.011
Ketorolac	0.171 ± 0.023
Lidocaïna	0.647 ± 0.004
Metil 4-hidroxibenzoat	-0.133 ± 0.008
Metil fenil èter (anisolet)	0.427 ± 0.003
Morfina	-0.327 ± 0.004
N,N-Dimetilanilina	0.587 ± 0.007
Naproxèn	0.454 ± 0.008
Nicotina	-0.132 ± 0.045
o-Fenilendiamina	-0.611 ± 0.014
Oxicodona	0.298 ± 0.013
p-Fenilendiamina	-0.891 ± 0.096
Piridina	-0.441 ± 0.006
Piroxicam	0.191 ± 0.002
Prednisolona	-0.261 ± 0.017
Pregnenolona	1.037 ± 0.005
Progesterona	1.026 ± 0.008
Propranolol	0.748 ± 0.001
Ranitidina	-0.384 ± 0.124
Resorcinol	-0.640 ± 0.023
Sufentanil	1.274 ± 0.009
Testosterona	0.441 ± 0.009
Toluè	0.718 ± 0.005
Tramadol	0.688 ± 0.002
Warfarina	0.636 ± 0.009

A continuació, per a la caracterització del sistema Kinetex Evo C18 es realitza una regressió lineal múltiple entre log *k* i els 5 descriptors moleculars d'Abraham de cada solut, els quals es detallen a l'Annex 1. L'equació del model de paràmetres de solvatació (equació 22) es converteix en:

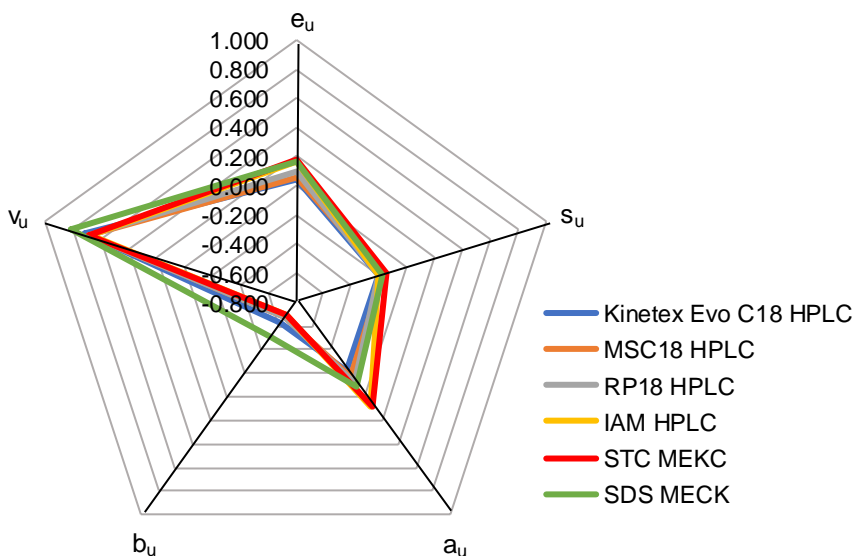
$$\log k = -0.386(\pm 0.043) + 0.103(\pm 0.050)E - 0.445(\pm 0.028)S - 0.495(\pm 0.044)A - 1.417(\pm 0.047)B + 1.632(\pm 0.045)V$$

$$n = 91 \quad R^2 = 0.950 \quad SD = 0.121 \quad F = 326$$

**(Equació 44)**

De les 95 substàncies s'exclouen de la regressió el 5-fluorouracil, la digitoxina, la famotidina i l'oxicodona, ja que els seus residus estàndard són superiors a 2.5 en valor absolut (*outliers*).

Un cop caracteritzat el sistema Kinetex Evo C18, els seus coeficients es normalitzen per tal de ser representats en un gràfic radial i així poder-los comparar visualment amb els coeficients normalitzats dels altres sistemes cromatogràfics ja caracteritzats prèviament (Taula 5, pàgina 49) [112]. D'aquesta manera, cadascun dels coeficients de l'equació 44 es divideixen per la longitud del vector (equació 26) obtenint així els valors següents:  $e_u = 0.045$ ,  $s_u = -0.197$ ,  $a_u = -0.219$ ,  $b_u = -0.626$ ,  $v_u = 0.721$ . El gràfic radial resultant de la representació dels coeficients normalitzats dels diferents sistemes cromatogràfics és el següent:



**Figura 16.** Representació radial de diferents sistemes cromatogràfics.

El gràfic mostra que els 3 sistemes cromatogràfics amb columnes C18 convencionals (Kinetex Evo C18, MSC18 i RP18) estan molts propers entre si. Com s'ha vist en estudis previs del grup de treball [153], els termes que presenten major contribució, és a dir els coeficients amb major valor absolut, són la basicitat per pont d'hidrogen i el volum del solut. El fet que  $b$  sigui negatiu significa que com més bàsic és el solut per pont d'hidrogen (més elevat el descriptor B), més desfavorida estarà la seva transferència des de la fase aquosa (fase mòbil) fins la fase estacionària, reduint així

la retenció cromatogràfica. D'altra banda, el coeficient  $v$  és positiu i per tant, contribueix positivament a la partició dels soluts cap a la fase estacionària de manera que quan més gran sigui el volum del solut més gran serà la retenció cromatogràfica. Els coeficients  $e$ ,  $s$  i  $a$  tenen una menor contribució ja que no tenen un valor absolut gaire gran. El signe negatiu de  $a$  i  $s$  indica que l'augment de l'acidesa del solut per pont d'hidrogen i la seva dipolaritat/polaritzabilitat desfavoreixen la transferència del solut cap a la fase estacionària.

Per una altra banda, el gràfic anterior també mostra que els sistemes cromatogràfics IAM i STC MECK estan molt propers entre si. En aquests sistemes, a diferència dels altres, el signe del coeficient  $a$  és positiu.

De manera general, es pot concloure que si un sistema HPLC amb una fase estacionària C18 en concret és adequat per predir valors de  $K_p$ , tots els altres sistemes HPLC amb columnes C18 seran igual d'adequats.

#### 4.1.1.2. Estimació de la permeació de la pell humana a partir de mesures cromatogràfiques

##### *4.1.1.2.1. Establiment i validació del model cromatogràfic per predir valors de $\log K_p$*

Dels 95 anàlits utilitzats per a la caracterització de la columna Kinetex Evo C18, se n'han seleccionat 84 per establir el model cromatogràfic per a soluts neutres i espècies neutres. Aquests compostos cobreixen una ampla gamma de valors de  $K_p$  i inclouen una gran varietat pel que fa a la naturalesa química i complexitat estructural.

Com s'ha comentat en la part introductòria, la retenció cromatogràfica com a tal no és suficient per modelar l'absorció dèrmica ja que no engloba tot els factors que controlen principalment aquest procés biològic (lipofilicitat i volum molecular). Tot i així, abans d'establir el model es presenten a la Figura 17 els gràfics de les correlacions de la permeabilitat de la pell a través de mesures cromatogràfiques amb i sense correcció de volum, que permetran una demostració visual clara que la correlació millora de manera molt significativa quan s'afegeix  $V$  com a variable independent. Aleshores, amb els 84 compostos seleccionats es realitza, per una banda, una correlació entre els valors experimentals de  $\log K_p$  i  $\log k_i$ , per una altra, una correlació entre aquests paràmetres i el volum de McGowan ( $V$ ) mitjançant una

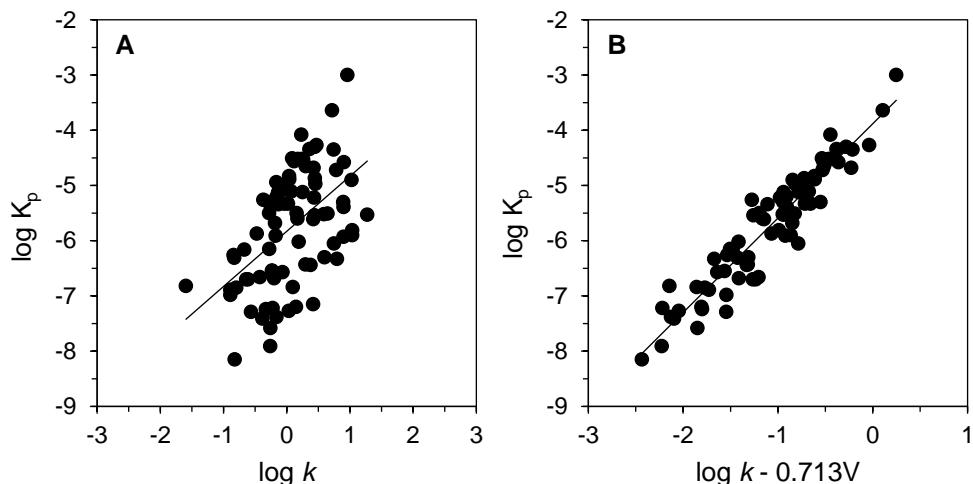
anàlisi de regressió lineal múltiple. Els valors de  $K_p$  i  $V$  es troben detallats en l'Annex 1. Els resultats es mostren a través de l'equació 45 i 46 i la Figura 17:

$$\log K_p = -5.830(\pm 0.100) + 0.998(\pm 0.181)\log k$$

$$n = 83 \quad R^2 = 0.274 \quad SD = 0.901 \quad F = 31 \quad \text{(Equació 45)}$$

$$\log K_p = -3.881(\pm 0.101) + 1.709(\pm 0.078)\log k - 1.219(\pm 0.059)V$$

$$n = 80 \quad R^2 = 0.892 \quad SD = 0.351 \quad F = 319 \quad \text{(Equació 46)}$$



**Figura 17.** Correlació entre els valors experimentals de  $\log K_p$  i  $\log k$ . **A:** Sense correcció de volum. **B:** Amb correcció de volum.

Com es pot observar en la figura anterior i tal i com s'ha vist en estudis previs [112], els valors de SD i l'ajust de la correlació de la permeabilitat de la pell en front de la retenció cromatogràfica milloren considerablement amb la correcció del volum molecular ( $V$ ).

Per establir l'equació del model s'utilitza, per tant, l'equació de regressió 46 (amb correcció del volum). De les 84 substàncies, només s'exclouen de la regressió el 2-amino-4-nitrofenol, l'atropina, la clorfeniramina i la digitoxina, ja que els seus residus estàndard són superiors a 2.5 en valor absolut. Els coeficients de l'equació mostren que tenen un significat estadístic amb un nivell de confiança del 95 % i que  $\log k$  té la major contribució a la permeació de la pell.  $\log k$  contribueix de manera positiva, el que suggereix que un factor de retenció elevat implica una millor absorció dèrmica.



El coeficient  $V$  implica una correcció negativa al valor  $\log K_p$ , més important per a aquells amb un major volum.

L'equació 46 és força similar a l'equació 34, no obstant, el valor del coeficient  $R^2$  i el paràmetre estadístic  $F$  milloren significativament. La comparació directa dels paràmetres revela gairebé els mateixos valors per al coeficient  $V$ , només una petita diferència és observada en l'ordenada a l'origen i el coeficient  $\log k$ . Aquesta diferència s'atribueix principalment al nombre i varietat dels compostos actuals estudiats, i a les diferents especificacions de la columna. Atès que el present treball cobreix un nombre més gran de compostos i són més representatius d'un ampli espai químic, l'equació 46 es considera més representativa que l'equació 34.

Per validar el model, el conjunt global de 80 compostos es divideix en dos subconjunts a partir d'una anàlisi de components principals (descriu en l'apartat 1.3.3. de la introducció): el conjunt de calibratge o *training set* (53 compostos) i el conjunt de predicció o *test set* (27 compostos). Es realitza de nou una regressió lineal múltiple entre els valors experimentals de  $\log K_p$  i  $\log k$  i  $V$  amb els 53 compostos del *training set*. L'equació 47 i la Figura 18A mostren els resultats de la regressió:

$$\log K_p = -3.940(\pm 0.117) + 1.812(\pm 0.097)\log k - 1.167(\pm 0.071)V$$

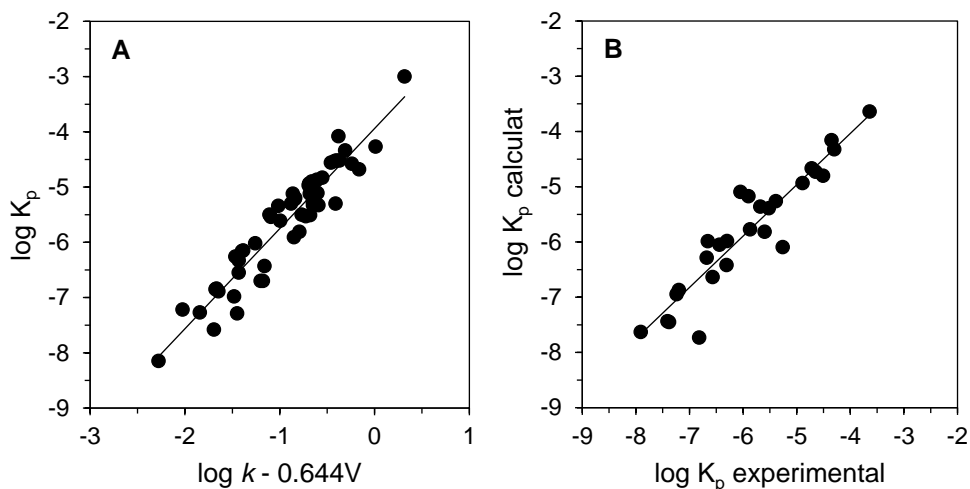
$$n = 53 \quad R^2 = 0.897 \quad SD = 0.335 \quad F = 217 \quad Q_{LSO}^2 = 0.898 \quad \text{(Equació 47)}$$

La comparació de l'ordenada a l'origen i els coeficients de l'eq. 47 als de l'eq. 46 demostren que amb menys compostos gairebé s'obté la mateixa equació, el que significa que el model és robust, és a dir, amb menys punts el significat físic dels coeficients no canvia. S'obtenen uns paràmetres estadístics adequats i el valor de  $Q_{LSO}^2$  és superior a 0.6, la qual cosa assegura que cap dels compostos presents en el *training set* té una gran influència en l'equació del model (equació 46).

Per a realitzar la validació externa, es calculen els valors  $\log K_p$  dels 27 compostos del *test set* a través de l'equació del *training set* (Eq. 47). La concordança entre els valors  $\log K_p$  calculats i experimentals es mostra a la Figura 18B i a través de l'equació 48:

$$\log K_p \text{ calculat} = -0.319(\pm 0.426) + 0.929(\pm 0.071)\log K_p \text{ experimental}$$

$$n = 27 \quad R^2 = 0.873 \quad SD = 0.402 \quad F = 171 \quad Q_{LSO}^2 = 0.915 \quad \text{(Equació 48)}$$



**Figura 18. A:** Correlació entre els valors experimentals de  $\log K_p$  i  $\log k$  i V del conjunt de compostos del *training set*. **B:** Valors  $\log K_p$  calculats front  $\log K_p$  experimentals dels compostos del *test set*.

Segons els paràmetres estadístics, el model mostra una bona capacitat de predicció: el pendent i l'ordenada a l'origen no són significativament diferents de la unitat i zero, respectivament, al nivell de confiança del 95 % segons el test t de Student. El valor de  $R^2$  és superior a 0.6, el coeficient de validació creuada és superior a 0.5 i el paràmetre F de Fisher és significatiu.

El model cromatogràfic per a soluts neutres i espècies neutres ha sigut establert i validat amb molt bons resultats, per aquest motiu, es pot concloure que el sistema cromatogràfic amb la columna Kinetex Evo C18 i aplicant una correcció de volum és un sistema capaç d'emular la permeabilitat de la pell de soluts neutres i espècies neutres en solució aquosa.

#### 4.1.1.2.2. Predicció de valors de $\log K_p$ a partir de mesures cromatogràfiques

Els coeficients de permeabilitat d'un conjunt diferent d'11 compostos s'han determinat, un cop obtinguts els factors de retenció de les espècies neutres, a partir de l'equació del model (Eq. 46). La Taula 7 mostra valors experimentals de  $\log K_p$

d'alguns compostos provinents de la base de dades de Hadgraft i Guy [71], així com els valors de  $\log K_p$  calculats a través del model cromatogràfic (Eq. 46), a través del model de paràmetres de solvatació d'Abraham i Martins (Eq. 24) utilitzant els descriptors dels soluts que es troben en l'Annex 1, i també els valors de  $\log K_p$  calculats pel model establert per Patel [75].

**Taula 7.** Comparació de valors  $\log K_p$  experimentals i valors  $\log K_p$  calculats a través de diferents models.

Solut	$\log K_p$ (experimental)	$\log K_p$ (calculat)		
		Model cromatogràfic (Equació 46)	Model paràmetres de solvatació (Equació 24)	Model Patel [75]
Antipirina	-7.74	-6.56	-7.13	-
Atrazina	-5.56	-5.34	-5.56	-
Estriol	-7.95	-7.19	-6.67	-
2-Toluídina	-	-5.00	-5.22	-5.83
3-Xilè	-	-3.45	-3.93	-4.41
Cumè	-	-3.27	-3.59	-6.14
N,N-Dimetilanilina	-	-4.22	-4.62	-5.29
Piridina	-	-5.46	-5.90	-6.10
Capsaïcina	-	-5.75	-5.25	-
Tramadol	-	-5.43	-5.02	-
Warfarina	-	-5.61	-6.07	-

Es pot observar en la taula anterior que hi ha bastanta bona concordança entre els valors  $\log K_p$  experimentals i els obtinguts a través de l'equació del model cromatogràfic (Eq. 46), l'error es troba al voltant del 10-15 %, que és similar a l'error presentat pel model de paràmetres de solvatació d'Abraham (Eq. 24). Com indica la Taula 7, la comparació directa de les dades senyalen que els valors obtinguts a través de l'equació 46 i a través de l'equació 24 són en general consistents. No obstant, les prediccions obtingudes per Patel són sistemàticament més baixes comparades als altres dos models. Finalment, valors de  $\log K_p$  de 3 compostos d'interès farmacèutic (capsaïcina, tramadol i warfarina) són proposats per primer cop.

Cal destacar que el principal avantatge d'aquesta metodologia és que  $K_p$  es pot obtenir directament de simples mesures de retenció cromatogràfica i el volum molecular de McGowan dels soluts, sense la necessitat de determinar descriptors moleculars addicionals.

## **4.1.2. Model skin PAMPA**

### **4.1.2.1. Optimització assaig skin PAMPA: temps d'incubació i agitació**

Per tal d'establir unes condicions generals d'assaig per a les determinacions skin PAMPA en solució, s'avaluen els diferents paràmetres que afecten a la permeabilitat skin PAMPA com són el temps d'incubació i l'efecte de l'agitació. Per a aquest propòsit, s'investiga la permeabilitat skin PAMPA de 9 anàlits amb diferents propietats àcid-base, diferents lipofilitats i diferents valors de  $\log K_p$  (Annex 1). Per a la realització de les mesures, els compostos àcids (flurbiprofèn, ibuprofèn, naproxèn i 5-fluorouracil) es dissolen en la solució diluïda de PRISMA HT™ a pH 3 per tal d'assegurar la seva forma neutra. L'aminopirina, compost bàsic amb un  $pK_a$  igual a 5, es dissol en la solució tamponada a pH 7 pel mateix motiu. Els compostos neutres (progesterona, griseofulvina, digitoxina i hidrocortisona) es dissolen amb la solució tamponada a pH 3. Les plaques skin PAMPA s'incuben (amb i sense agitació) durant 30 min, 4 hores i 24 hores. La Taula 8 mostra els valors del logaritme de la permeabilitat efectiva ( $\log P_e$ ) amb i sense agitació als diferents temps d'incubació, així com la retenció en membrana ( $R_M$ ) corresponent.

En primer lloc, per estudiar l'efecte del temps d'incubació i l'agitació en la determinació de la permeabilitat de la pell a través de la permeabilitat skin PAMPA, els valors de  $\log K_p$  dels diferents compostos es correlacionen amb els valors  $\log P_e$  obtinguts dels assaigs skin PAMPA a cada temps d'incubació. Per a un temps d'incubació de 30 minuts, les correlacions obtingudes per als assaigs amb i sense agitació es presenten en l'equació 49 i 50, respectivament:

$$\log K_p = - 2.759(\pm 0.248) + 0.640(\pm 0.058)\log P_e$$

$$n = 6 \quad R^2 = 0.968 \quad SD = 0.179 \quad F = 120 \quad \text{(Equació 49)}$$

$$\log K_p = - 1.619(\pm 0.772) + 0.821(\pm 0.166)\log P_e$$

$$n = 6 \quad R^2 = 0.859 \quad SD = 0.373 \quad F = 24 \quad \text{(Equació 50)}$$

**Taula 8.** Valors de log  $P_e$  i retenció en membrana de 9 soluts de diferent lipofilicitat a temps d'incubació de 30 minuts, 4 hores i 24 hores. Els experiments es realitzen amb i sense agitació.

Solut	Amb agitació						Sense agitació					
	30 min		4 h		24 h		30 min		4 h		24 h	
	log $P_e$	$R_M$	log $P_e$	$R_M$	log $P_e$	$R_M$	log $P_e$	$R_M$	log $P_e$	$R_M$	log $P_e$	$R_M$
5-Fluorouracil	-	0.00	-5.77	0.02	-6.16	0.08	-	0.00	-6.47	0.01	-6.07	0.05
Aminopirina	-5.88	0.00	-5.65	0.00	-5.17	0.05	-5.79	0.00	-5.46	0.04	-5.22	0.05
Digitoxina	-	0.00	-	0.22	-6.42	0.29	-	0.00	-	0.09	-6.34	0.25
Flurbiprofèn	-2.98	0.18	-3.69	0.00	-	0.00	-3.54	0.13	-3.85	0.00	-	0.00
Griseofulvina	-5.61	0.06	-5.25	0.19	-5.12	0.24	-5.65	0.03	-5.33	0.16	-5.20	0.20
Hidrocortisona	-	0.01	-6.13	0.01	-6.04	0.08	-	0.00	-6.30	0.04	-6.14	0.07
Ibuprofèn	-2.71	0.22	-3.61	0.00	-	0.00	-3.59	0.19	-3.65	0.06	-	0.00
Naproxèn	-3.96	0.13	-4.19	0.00	-	0.00	-3.99	0.09	-4.24	0.04	-	0.00
Progesterona	-3.25	0.50	-4.11	0.74	-4.59	0.88	-4.81	0.33	-4.88	0.62	-4.69	0.83

Per a 4 hores, les equacions de correlació amb i sense agitació són les següents:

$$\log K_p = -0.677(\pm 0.260) + 1.061(\pm 0.053)\log P_e$$

$$n = 8 \quad R^2 = 0.985 \quad SD = 0.142 \quad F = 400 \quad \text{(Equació 51)}$$

$$\log K_p = -0.982(\pm 0.740) + 0.954(\pm 0.145)\log P_e$$

$$n = 8 \quad R^2 = 0.879 \quad SD = 0.410 \quad F = 44 \quad \text{(Equació 52)}$$

Per a 24 hores, les relacions lineals entre els dos paràmetres, amb i sense agitació, són les següents:

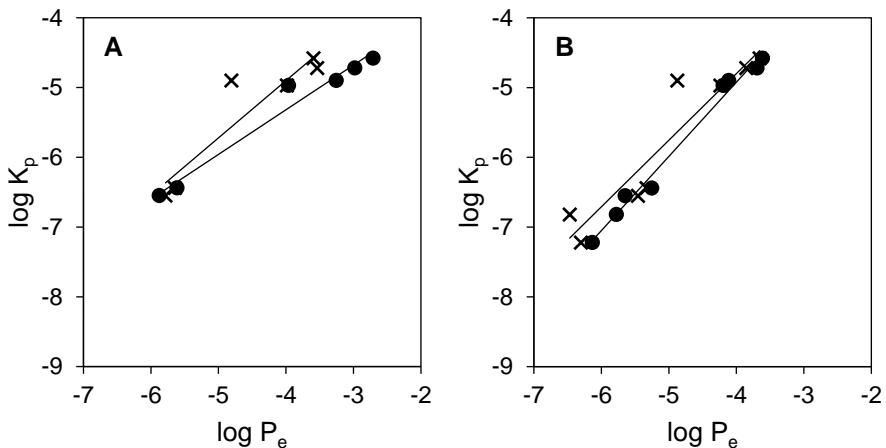
$$\log K_p = 0.785(\pm 1.789) + 1.337(\pm 0.318)\log P_e$$

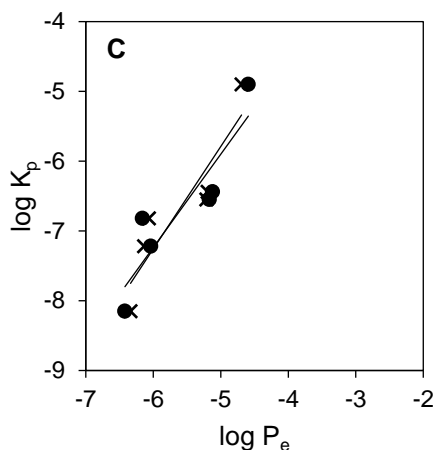
$$n = 6 \quad R^2 = 0.815 \quad SD = 0.514 \quad F = 18 \quad \text{(Equació 53)}$$

$$\log K_p = 1.545(\pm 1.928) + 1.467(\pm 0.342)\log P_e$$

$$n = 6 \quad R^2 = 0.822 \quad SD = 0.505 \quad F = 18 \quad \text{(Equació 54)}$$

Les correlacions obtingudes es presenten en la Figura 19 A-C. Cada subfigura conté dues correlacions diferents, una per als assaigs amb agitació i l'altra per als assaigs sense agitació:





**Figura 19.** Efecte del temps d'incubació i l'agitació en la determinació de la permeabilitat de la pell ( $\log K_p$ ) a través de la permeabilitat skin PAMP ( $\log P_e$ ). Temps d'incubació: **A:** 30 minuts. **B:** 4 hores. **C:** 24 hores. Assaig amb agitació (●), Assaig sense agitació (×).

Com es pot observar, el nombre de compostos que es poden determinar amb 4 hores ( $n=8$ ) és major que amb 30 minuts ( $n=6$ ) i 24 hores ( $n=6$ ). Per a alguns compostos amb baixos valors de  $\log K_p$  com el 5-fluorouracil, la hidro cortisona i la digitoxina, un temps d'incubació de 30 minuts no és suficient per aconseguir l'estat estacionari, per aquest motiu, no s'han pogut determinar els corresponents valors de permeabilitat efectiva skin PAMPA. Després de 4 hores d'incubació, es poden determinar tots els compostos excepte la digitoxina. Aquest compost es considera molt poc permeable ja que el valor del coeficient de permeabilitat de la pell és molt baix ( $\log K_p = -8.15$ ), per tant, un temps d'incubació de 4 hores tampoc és suficient per aconseguir l'estat estacionari. Després de 24 hores d'incubació, en canvi, la digitoxina es capaç d'arribar a l'estat estacionari. Compostos com el flurbiprofèn, l'ibuprofèn i el naproxèn (tots ells amb valors alts de  $\log K_p$ ) no s'han pogut determinar amb un temps d'incubació de 24 hores. Quan es tracta de compostos molt permeables, els temps d'incubació llargs juntament amb condicions de gradient de pH poden provocar que tota la mostra del compartiment donador es mogui cap al compartiment acceptor. D'aquesta manera les concentracions del compartiment donador i acceptor aconseguixin valors d'equilibri dificultant així la determinació dels valors de permeabilitat.

Amb relació als experiments amb i sense agitació, la Taula 8 presenta els resultats obtinguts a diferents temps d'incubació. Amb un temps de 30 minuts i amb agitació, el flurbiprofèn, la progesterona i l'ibuprofèn mostren valors de  $\log P_e$  elevats en comparació amb el assajos sense agitació. Aquesta diferència es pot atribuir a la presència de la capa aquosa ABL degut al caràcter lipòfil dels compostos ( $\log P_{o/w} > 3$ ). En aquest cas la capa aquosa actua com a etapa limitant del transport obtenint valors de permeabilitat més baixos. A un temps d'incubació de 4 hores, els valors  $\log P_e$  obtinguts dels experiments amb i sense agitació són pràcticament similars a excepció de la progesterona ( $\log P_e$  igual a - 4.05 i -4.88, respectivament) i el 5-fluorouracil ( $\log P_e$  igual a - 5.77 i -6.47, respectivament). En el cas de la progesterona aquesta diferència es pot justificar per la presència de la capa aquosa o bé per l'elevada retenció en membrana. El motiu per al 5-fluorouracil és desconegut ja que és un compost molt hidrofílic ( $\log P_{o/w} = -0.89$ ) i per tant la diferència de valors no es pot atribuir a l'efecte de la capa aquosa. En aquest cas l'etapa limitant de la difusió global és la membrana. En general, amb un temps d'incubació de 4 hores la capa aquosa sembla no tenir gaire efecte per a la majoria del compostos, i amb 24 hores, excepte per al flurbiprofèn, l'ibuprofèn i el naproxèn el quals no es poden avaluar, els resultats obtinguts amb i sense agitació són quasi similars.

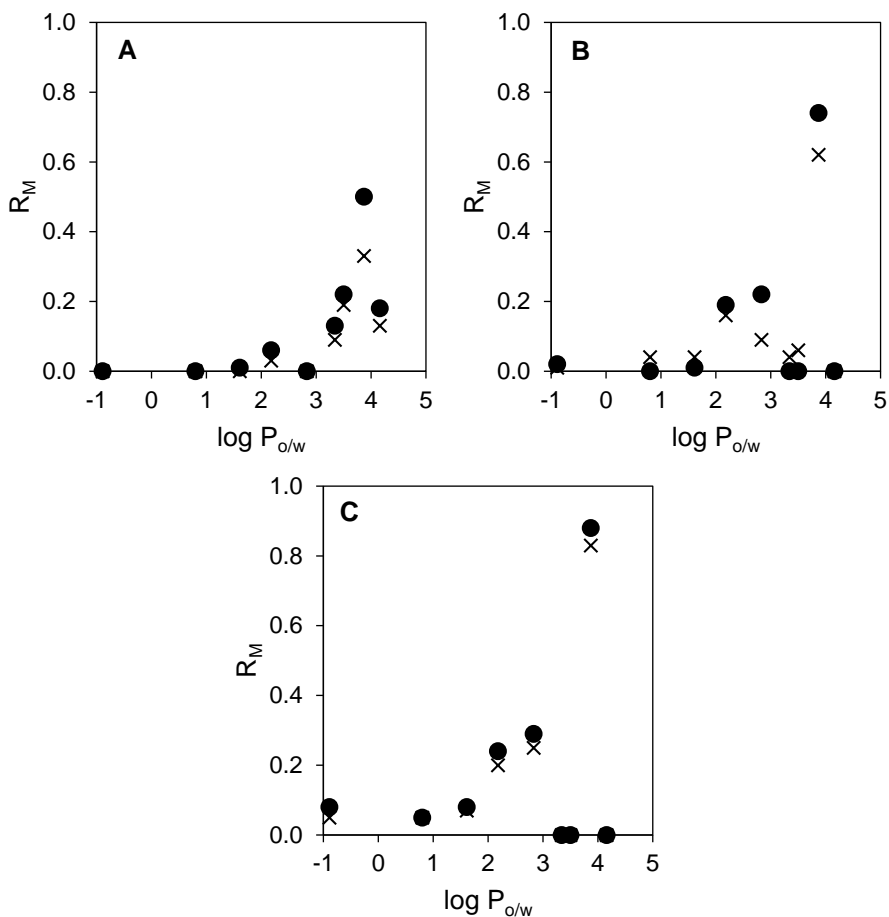
Els valors de la retenció en membrana sovint són força elevats segons la composició de la membrana PAMPA. Per exemple, membranes formades per un 2 % de dioleilfosfatidilcolina dissolt en dodecà poden tenir valors superiors a 0.80 [53]. En el cas de la membrana skin PAMPA, la retenció és en general baixa i va de 0 fins a 0.30 (Veure Taula 8) excepte la progesterona que té valors força elevats (0.50-0.80). Aquest fet es pot atribuir a alguna interacció específica amb la membrana. Aquest paràmetre també depèn del temps d'incubació: la retenció en membrana de la digitoxina, la griseofulvina i la progesterona augmenta amb el temps d'incubació, en canvi el 5-fluorouracil, l'aminopirina i la hidrocortisona només tenen un lleuger augment. En el cas del flurbiprofèn, ibuprofèn i naproxèn,  $R_M$  disminueix a mesura que augmenta el temps d'incubació. Per a la majoria de compostos aquest paràmetre roman constant entre els experiments amb agitació i sense agitació.

A partir de les correlacions anteriors així com els paràmetres estadístics associats, es pot observar que per a un temps d'incubació de 4 hores i aprofitant l'agitació per reduir tant com sigui possible el gruix de la capa aquosa, els resultats obtinguts són



els més adequats ( $R^2=0.985$ ; pendent=1.061). A més, treballant sota aquestes condicions és possible determinar el major nombre de compostos, tot i que en alguns casos, com la digitoxina, es requereixen temps d'incubació llargs.

Per una altra banda, els valors de la retenció en membrana (amb i sense agitació) es correlacionen amb els valors de  $\log P_{o/w}$  per comprovar si aquest paràmetre es relaciona amb la lipofilicitat (Figura 20).



**Figura 20.** Efecte del temps d'incubació i l'agitació en la determinació de la retenció en membrana ( $R_M$ ) segons els valors de la lipofilicitat ( $\log P_{o/w}$ ). Temps d'incubació: **A:** 30 minuts. **B:** 4 hores. **C:** 24 hores. Assaig amb agitació (●), Assaig sense agitació (×).

La Figura 20 mostra que no hi ha una clara relació entre  $R_M$  i els valors de la lipofilitat, no obstant, de manera general es pot observar que la retenció en membrana dels compostos amb valors  $\log P_{o/w}$  inferiors a 2 és pràcticament 0, i a partir de  $\log P_{o/w} > 2$  augmenta.

#### 4.1.2.2. Caracterització a través del model de paràmetres de solvatació del sistema skin PAMPA i comparació de sistemes PAMPA

Un gran nombre de models PAMPA han estat caracteritzats a través del model de paràmetres de solvatació: DS PAMPA, HDM PAMPA, DOPC PAMPA,  $P_0$  PAMPA, COS PAMPA i BBB PAMPA [100]. Tots ells es troben descrits a la Taula 2 i 3 (pàgina 31 i 42, respectivament). Pel que fa a l'assaig skin PAMPA, no es va poder caracteritzar en el treball de He et al. [100] per falta de dades ja que només disposaven d'un conjunt de dades que incloïa 22 compostos [50] i no era suficient per establir un model general.

En aquest treball, la permeabilitat skin PAMPA de soluts neutres i espècies neutres s'ha determinat mesurant la permeabilitat skin PAMPA efectiva ( $\log P_e$ ) al pH o interval de pH en el qual la substància es troba en forma neutra i negligint l'efecte de la capa aquosa. Les mesures s'han realitzat a partir de les condicions òptimes d'assaig prèviament discutides en la secció d'optimització: 4 hores d'incubació i utilitzant agitació, a excepció de la digitoxina que s'ha determinat a 24 h d'incubació. A continuació es mostren els valors de la permeabilitat skin PAMPA en forma logarítmica,  $\log P_e$ , de 54 soluts neutres i espècies neutres.

**Taula 9.** Recull de valors de  $\log P_e$  mesurats al pH o l'interval de pH on el solut es troba en forma neutre (Annex 5).

<b>Soluts</b>	<b><math>\log P_e</math></b>
2,4-Diclorofenol	-3.92 ± 0.00
2-Isopropil-5-Metilfenol (timol)	-4.01 ± 0.00
2-Nitro-p-fenilendiamina	-5.25 ± 0.02
2-Toluïdina	-4.13 ± 0.00
3-Metilfenol (m-cresol)	-4.33 ± 0.01
4-Amino-2-nitrofenol	-4.59 ± 0.02
4-Clorofenol	-4.27 ± 0.02
4-Etilfenol	-4.19 ± 0.02
4-Hidroxifenilacetamida	-6.07 ± 0.08
4-Hidroxi-metilfenilacetat	-5.07 ± 0.09
4-Nitrofenol	-4.91 ± 0.02
5-Fluorouracil	-5.77 ± 0.02

(Continuació Taula 9)

<b>Soluts</b>	<b>log <i>k</i></b>
8-Metoxipsoralè	-4.30 ± 0.03
Àcid 5,5-dietilbarbitúric (barbital)	-5.75 ± 0.05
Àcid 5-etil-5-fenilbarbitúric (fenobarbital)	-6.05 ± 0.01
Àcid benzoic	-4.82 ± 0.07
Alcohol 4-hidroxibenzílic	-5.85 ± 0.01
Aminopirina	-5.67 ± 0.03
Anilina	-4.55 ± 0.00
Antipirina	-5.63 ± 0.04
Atrazina	-4.67 ± 0.01
Benzil nicotinat	-4.16 ± 0.02
Cafeïna	-5.45 ± 0.02
Capsaïcina	-4.63 ± 0.07
Catecol	-5.39 ± 0.00
Cortexolona	-5.45 ± 0.03
Corticosterona	-5.59 ± 0.01
Cortisona	-6.09 ± 0.02
Dexametasona	-6.25 ± 0.03
Diclofenac	-3.79 ± 0.02
Digitoxina	-6.38 ± 0.15
Estradiol	-4.15 ± 0.07
Estriol	-6.07 ± 0.09
Fluocinonida	-5.38 ± 0.06
Flurbiprofèn	-3.69 ± 0.01
Griseofulvina	-5.28 ± 0.06
Hidrocortisona	-6.17 ± 0.05
Hidroquinona	-5.87 ± 0.06
Hidroxiprogesterona	-4.70 ± 0.05
Ibuprofèn	-3.61 ± 0.06
Indometacina	-4.40 ± 0.04
Isoquinolina	-4.20 ± 0.01
Ketoprofèn	-4.68 ± 0.03
Metil 4-hidroxibenzoat	-4.88 ± 0.04
Metil fenil èter	-4.34 ± 0.04
N,N-Dimetilanilina	-3.95 ± 0.02
Naproxèn	-4.19 ± 0.04
o-Fenilendiamina	-5.42 ± 0.02
Piridina	-4.49 ± 0.01
Piroxicam	-4.67 ± 0.05
Prednisolona	-6.42 ± 0.02
Progesterona	-4.13 ± 0.02
Testosterona	-4.52 ± 0.03
Warfarina	-4.62 ± 0.11

Per a la caracterització del sistema skin PAMPA s'ha dut a terme una regressió lineal múltiple entre log  $P_e$  i els 5 descriptors moleculars de cada compost. Per tant, l'equació 22 es converteix en:

$$\log P_e (\text{skin PAMPA}) = -4.397(\pm 0.121) + 0.352(\pm 0.137)E - 0.638(\pm 0.075)S - 0.889(\pm 0.115)A - 2.203(\pm 0.137)B + 1.606(\pm 0.115)V$$

$$n = 52 \quad R^2 = 0.906 \quad SD = 0.247 \quad F = 88 \quad \text{(Equació 55)}$$

De les 54 substàncies s'exclouen de la regressió la digitoxina i el fenobarbital, ja que els seus residus estàndard eren superiors a 2.5 en valor absolut (*outliers*).

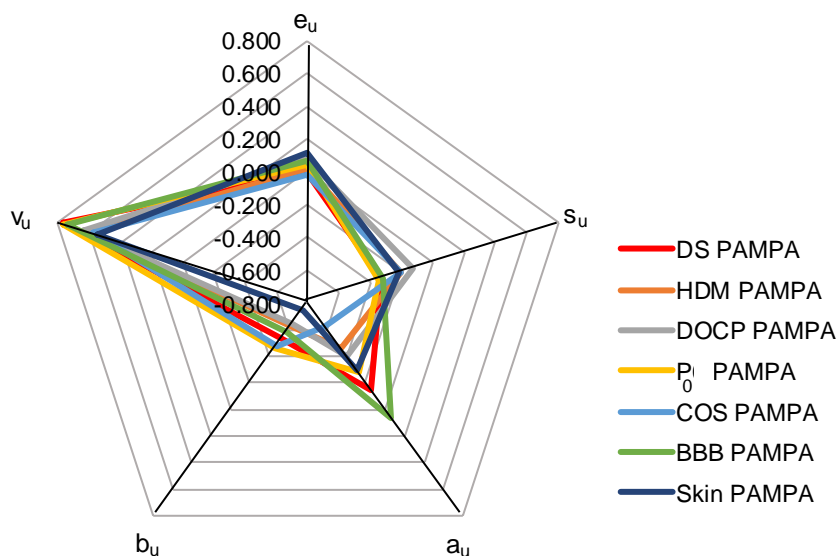
Per a poder comparar el sistema skin PAMPA amb els diferents sistemes PAMPA caracteritzats en el treball de He et al. (Taula 3, pàgina 42), els coeficients dels diferents sistemes es normalitzen dividint cadascun d'ells per la longitud del seu vector (equació 26), obtenint així els valors que es presenten en la taula següent:

**Taula 10.** Coeficients normalitzats dels diferents sistemes PAMPA caracteritzats a través del model de paràmetres de solvatació.

Sistema	Coeficients normalitzats				
	$e_u$	$s_u$	$a_u$	$b_u$	$v_u$
DS PAMPA	-0.004	-0.332	-0.146	-0.528	0.767
HDM PAMPA	0.015	-0.210	-0.464	-0.619	0.597
DOCP PAMPA	0.082	-0.134	-0.406	-0.643	0.630
P <sub>0</sub> PAMPA	0.047	-0.349	-0.280	-0.466	0.762
COS PAMPA	-0.022	-0.202	-0.631	-0.477	0.576
BBB PAMPA	0.061	-0.317	0.061	-0.582	0.744
Skin PAMPA	0.119	-0.216	-0.300	-0.745	0.543

Abreviatures i acrònims (pàgines I-VI)

A continuació, els coeficients normalitzats de cada sistema es representen de forma visual a través d'un gràfic radial:



**Figura 21.** Representació radial de diferents sistemes PAMPA.

Es poden observar tendències comunes entre les caracteritzacions presentades a la Taula 10. Per a tots els sistemes PAMPA caracteritzats el coeficient  $b$  és negatiu i el coeficient  $v$  positiu. A part, aquestes caracteritzacions també tenen en comú que el coeficient  $s$  és negatiu. El fet que  $b$  i  $s$  siguin negatius indica que com més gran és el descriptor  $B$  (basicitat per pont d'hidrogen) i  $S$  (polaritat/dipolaritzabilitat), més desfavorida estarà la transferència del solut cap a la fase orgànica (membrana lípídica artificial), reduint així la permeabilitat en tots els casos. D'altra banda, el coeficient  $v$  és positiu, per tant, indica que aquest paràmetre contribueix positivament a la transferència del solut a la fase orgànica, de manera que quan més gran és  $V$ , més gran és la permeabilitat en tots els casos.

El coeficient  $a$  també presenta un comportament general pel que fa al signe. En tots els casos aquest coeficient és negatiu a excepció del sistema BBB PAMPA. En la majoria dels sistemes PAMPA el coeficient  $a$  contribueix a disminuir el coeficient de permeabilitat. En canvi el valor positiu del sistema BBB PAMPA indica que l'acidesa del solut per pont d'hidrogen ( $A$ ) contribueix de manera positiva a la transferència del solut cap a la membrana artificial formada d'un filtre hidrofòbic de PVDF impregnat d'un 10 % d'extracte lipídic porcí dissolt en  $n$ -alcà.

Pel que fa a la magnitud dels coeficients, un altre tret en comú dels sistemes PAMPA, a excepció del COS PAMPA, és que els coeficients amb major valor absolut són els coeficients  $b$  i  $v$ . Com a conseqüència, la basicitat del solut per pont d'hidrogen ( $B$ ) i el volum del solut ( $V$ ) són els descriptors que més influeixen en les propietats físico-químiques d'aquests sistemes. En el cas de COS PAMPA, els coeficients amb major valor absolut són  $a$  i  $v$ . Per tant, això implica que les dues fases que formen el sistema es diferencien majoritàriament per la basicitat per pont d'hidrogen ( $a$ ) i la hidrofobicitat ( $v$ ). Això podria explicar-se degut a l'efecte del cosolvent en la fase aquosa on es troba dissolt el solut.

El coeficient  $e$  és en general proper a zero excepte en el sistema skin PAMPA. El fet que  $e$  no sigui significatiu vol dir que la fase orgànica del sistema en concret (membrana lipídica) i l'aigua tenen una refractivitat molar en excés equivalent, per aquest motiu, el descriptor  $E$  no té cap influència en la permeabilitat.

La representació radial mostra que els sistemes HDM PAMPA i DOCP PAMPA es troben propers entre si, per tant, la membrana de policarbonat i *n*-hexadecà (HDM PAMPA) és molt similar, en quant a propietats físico-químiques, a la membrana de PVDF impregnada de 2 % DOPC dissolt en *n*-dodecà (DOCP PAMPA). Respecte al significat biològic, aquests dos sistemes poden emular el tracte gastrointestinal de la mateixa manera.

#### 4.1.2.3. Estimació de la permeació de la pell a partir del sistema skin PAMPA

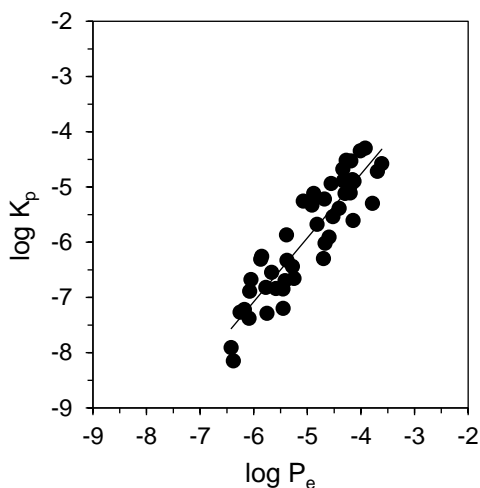
##### *4.1.2.3.1. Establiment i validació del model skin PAMPA per predir valors de $\log K_p$*

Donat el baix nombre de compostos utilitzats per Sinkó et al. [50,65] per a la correlació entre la permeació a través de la pell humana i la permeabilitat skin PAMPA, en aquesta tesi s'estableix una nova correlació amb un conjunt de dades més gran i amb dades obtingudes amb les condicions òptimes d'assaig prèviament discutides. Per tant, els valors de  $\log K_p$  de la base de dades de Zhang [94] disponibles es correlacionen amb els valors  $\log P_e$  (skin PAMPA) determinats prèviament. L'equació de regressió i la figura corresponent a la correlació (Figura 22) es mostren a continuació:

$$\log K_p = -0.143(\pm 0.403) + 1.156(\pm 0.080)\log P_e$$

$$n=46 \quad R^2 = 0.826 \quad SD = 0.434 \quad F = 208$$

(Equació 56)



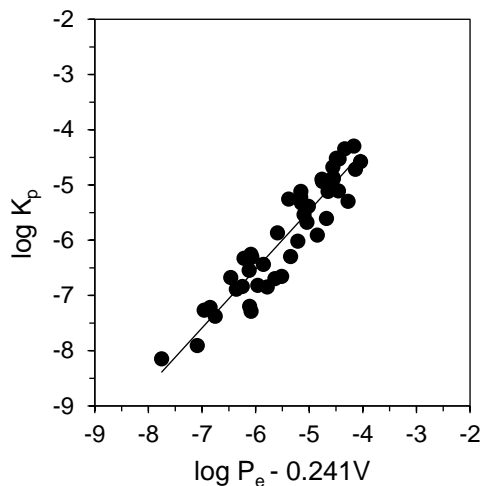
**Figura 22.** Correlació dels valors  $\log K_p$  front  $\log P_e$  d'un conjunt de 46 compostos.

La Figura 22 mostra una correlació força elevada ( $R^2 = 0.826$ ) ja que el valor del coeficient de correlació es troba proper a la unitat. Si es comparen els paràmetres estadístics de la correlació 56 amb els obtinguts per Sinkó et al a la Figura 10 ( $n=22$ ,  $R^2=0.70$ ;  $SD=0.54$ ;  $F=45$ ) es pot deduir que hi ha una millora en quant al valor de  $R^2$  i a la desviació estàndard experimental de la correlació. Això últim es pot justificar per l'elevada incertesa causada per les dades biològiques obtingudes a partir de la base de dades de Hadgraft and Guy [71].

A diferència del sistema cromatogràfic, el sistema de subrogació de membrana artificial skin PAMPA engloba els principals factors que controlen el procés biològic de la permeació de la pell, com són la lipofilitat i el volum molecular del compost, ja que la composició de la membrana artificial és molt semblant als constituents de l'estrat corni. Per tant, en un principi no és necessari l'addició de la variable independent del volum per a millorar la correlació. Malgrat això, la correlació anterior s'ha recalculat amb l'addició del volum per veure si hi ha una millora significativa. La nova regressió es mostra a continuació:

$$\log K_p = -0.156(\pm 0.343) + 1.062(\pm 0.072)\log P_e - 0.256(\pm 0.061)V$$

$$n=46 \quad R^2 = 0.876 \quad SD = 0.369 \quad F = 152$$

**(Equació 57)**

**Figura 23.** Correlació de  $\log K_p$  front  $\log P_e$  i l'addició del paràmetre del volum de McGowan (V).

A partir dels paràmetres estadístics anteriors es pot concloure que no hi ha una millora significativa en l'addició del volum a la correlació.

Per provar la validesa del model skin PAMPA, el conjunt global de 46 compostos es divideix en els dos subconjunts mencionats anteriorment: el *training set* amb 33 compostos i el *test set* amb 13 compostos. Es realitza de nou una regressió lineal entre els valors experimentals de  $\log K_p$  i  $\log P_e$  amb els 33 compostos del *training set*. L'equació 58 i la Figura 24A mostren els resultats de la regressió:

$$\log K_p = -0.034(\pm 0.462) + 1.175(\pm 0.092)\log P_e$$

$$n=33 \quad R^2 = 0.841 \quad SD = 0.437 \quad F = 164 \quad Q_{LSO}^2 = 0.847$$

**(Equació 58)**

La comparació de l'ordenada a l'origen i el pendent de l'eq. 58 amb l'eq. 56 demostra que el model és robust ja que amb menys compostos els valors d'aquests paràmetres pràcticament no varien. A més s'obtenen uns paràmetres estadístics adequats:  $R^2$  té un valor superior a 0.6, el valor de la desviació estàndard indica que



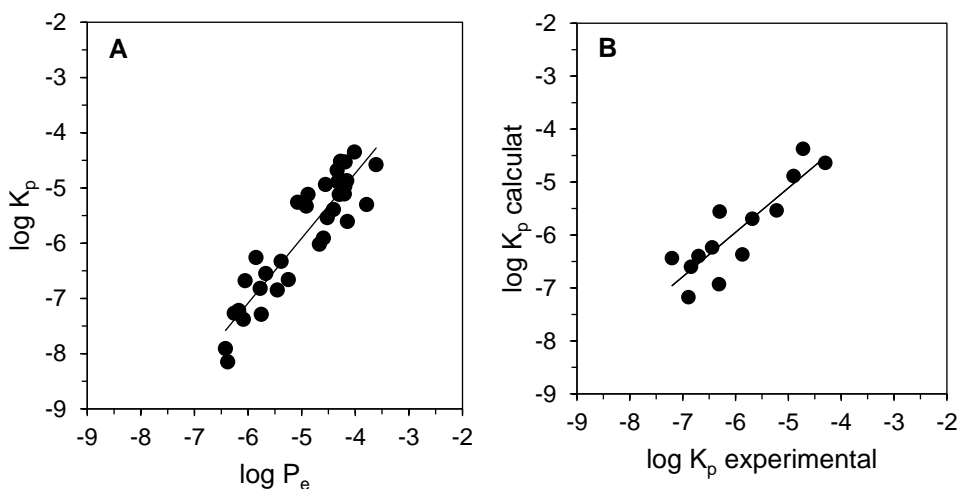
l'error de la correlació ve donat principalment pels valors biològics ( $\log K_p$ ), el paràmetre F és elevat i el valor de  $Q^2_{LSO}$  és superior a 0.6.

El *test set* s'utilitza per realitzar la validació externa, és a dir, per assegurar la capacitat predictiva. Per aquest propòsit, es calculen els valors  $\log K_p$  dels 14 compostos del *test set* a través de l'equació del *training set* (Eq. 58) i es correlacionen amb els valors experimentals. La concordança entre els valors  $\log K_p$  calculats i experimentals es mostra a la Figura 24B i a través de l'equació 59:

$$\log K_p \text{ calculat} = -0.919(\pm 0.818) + 0.839(\pm 0.136)\log K_p \text{ experimental}$$

$$n = 13 \quad R^2 = 0.776 \quad SD = 0.435 \quad F = 38 \quad Q^2_{LSO} = 0.784 \quad \text{(Equació 59)}$$

Segons els paràmetres estadístics, el model mostra una bona capacitat de predicció: el pendent i l'ordenada a l'origen de la línia de tendència no són significativament diferents de la unitat i zero, respectivament, al nivell de confiança del 95 % segons el test t de Student. El valor de  $R^2$  és superior a 0.6, el coeficient de validació creuada és superior a 0.5 i el paràmetre F de Fisher és significatiu.



**Figura 24. A:** Correlació entre els valors experimentals de  $\log K_p$  i  $\log P_e$  del conjunt de compostos del *training set*. **B:** Valors  $\log K_p$  calculats front  $\log K_p$  experimentals dels compostos del *test set*.

El model skin PAMPA ha sigut validat amb molt bons resultats, per tant, es pot concloure que sense la correcció de volum és un sistema capaç d'emular la permeabilitat de la pell de soluts neutres i espècies neutres en solució aquosa.

#### 4.1.2.3.2. Predicció de valors de $\log K_p$ a partir de mesures de permeabilitat skin PAMPA

Seguint el mateix procediment descrit en l'apartat 4.1.1.1., els coeficients de permeabilitat d'un conjunt de 8 compostos es determinen a partir de l'equació del model skin PAMPA (Eq. 56) i es comparen amb alguns valors  $\log K_p$  experimentals i els calculats través del model cromatogràfic establert prèviament (Eq. 46), a través del model de paràmetres de solvatació d'Abraham i Martins (Eq. 24), i els valors de  $\log K_p$  calculats pel model establert per Patel [75] (Taula 11).

En la Taula 11 es pot observar que hi ha bona concordança entre els valors  $\log K_p$  experimentals i els obtinguts a través de l'equació del model skin PAMPA (Eq.56). La comparació directa de les dades senyalen que els valors obtinguts a través de l'equació 56, 46 i 24 són força consistents. En canvi, com ja s'ha vist a l'apartat 4.1.1.2.2., les prediccions obtingudes per Patel són sistemàticament més baixes en comparació amb els altres tres models.

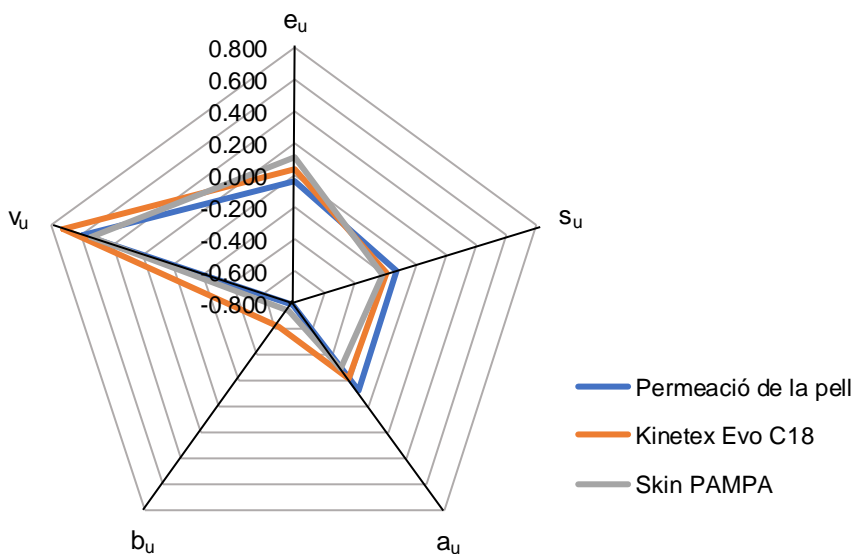
**Taula 11.** Comparació de valors  $\log K_p$  experimentals i valors  $\log K_p$  calculats a través de diferents models, incloent en aquest cas el model skin PAMPA.

<b>Soluts</b>	<b><math>\log K_p</math> experimental</b>	<b><math>\log K_p</math> calculat</b>			
		Model skin PAMPA (Equació 56)	Model cromatogràfic (Equació 46)	Model paràmetres de solvatació (Equació 24)	Model Patel [75]
Antipirina	-7.74	-6.65	-6.56	-7.13	-
Atrazina	-5.56	-5.54	-5.34	-5.56	-
Estriol	-7.95	-7.16	-7.19	-6.67	-
2-Toluïdina	-	-4.91	-5.00	-5.22	-5.83
N,N-Dimetilanilina	-	-4.71	-4.22	-4.62	-5.29
Piridina	-	-5.33	-5.46	-5.90	-6.10
Capsaicina	-	-5.49	-5.75	-5.25	-
Warfarina	-	-5.49	-5.61	-6.07	-

### **4.1.3. Comparació del sistema cromatogràfic i el sistema skin PAMPA amb el sistema biològic de la permeabilitat a través pell**

La capacitat del sistema cromatogràfic i el sistema skin PAMPA per a modelar el sistema biològic de la permeabilitat de la pell es compara calculant la distància  $d$  a través de l'equació 27 i representant els coeficients normalitzats dels diferents sistemes en un gràfic radial. La Taula 12 mostra un resum dels coeficients de l'equació de caracterització dels dos sistemes fisicoquímics i el sistema biològic així com els corresponents paràmetres estadístics. La Taula 13 presenta els coeficients normalitzats dels tres sistemes i la distància  $d$ .

A continuació també es mostra el gràfic radial que permet representar els diferents coeficients normalitzats de cada sistema:



**Figura 25.** Representació radial entre el sistema biològic de la permeabilitat amb pell i els sistemes físico-químics de cromatografia (Kinetex Evo C18) i skin PAMPA.

**Taula 12.** Resum dels coeficients i els paràmetres estadístics associats del sistema de permeabilitat de la pell i els dos sistemes físico-químics, tots ells caracteritzats a través del model de paràmetres de solvatació.

Sistema	Coeficients					Paràmetres estadístics				
	c	e	s	a	b	v	n	R <sup>2</sup>	SD	F
Permeabilitat de la pell (log K <sub>p</sub> )	-5.426	-0.106	-0.473	-0.473	-3.000	2.296	119	0.832	0.461	112
Kinetex Evo C18 (log k)	-0.386	0.103	-0.445	-0.495	-1.417	1.632	91	0.950	0.121	326
Skin PAMPA (log P <sub>e</sub> )	-4.397	0.352	-0.638	-0.889	-2.203	1.606	52	0.906	0.247	88

**Taula 13.** Coeficients normalitzats del sistema de permeabilitat de la pell i els dos sistemes físico-químics, i els valors per a la distància d.

Sistema	Coeficients normalitzats					
	e <sub>u</sub>	s <sub>u</sub>	a <sub>u</sub>	b <sub>u</sub>	v <sub>u</sub>	d
Permeabilitat de la pell (log K <sub>p</sub> )	-0.028	-0.123	-0.123	-0.782	0.598	0.000
Kinetex Evo C18 (log k)	0.045	-0.197	-0.219	-0.626	0.721	0.244
Skin PAMPA (log P <sub>e</sub> )	0.119	-0.216	-0.300	-0.745	0.543	0.257

Segons els valors del paràmetre  $d$  i la visualització del gràfic radial anterior, els dos sistemes fisicoquímics es troben propers entre si i propers al sistema biològic. Pel que fa a la magnitud en valor absolut dels coeficients es pot observar que els tres sistemes són processos de partició condicionats per la basicitat per pont d'hidrogen ( $b$ ) i el volum ( $v$ ). El descriptor  $B$  contribueix negativament i el descriptor  $V$  positivament. El procés de biopartició de la permeació de la pell es caracteritza, a diferència del sistema cromatogràfic i el sistema de permeabilitat de pell artificial, per tenir el coeficient  $e$  negatiu. El fet que aquest sigui negatiu significa que la refractivitat contribueix a disminuir el valor de  $\log K_p$ . En el cas de la retenció cromatogràfica tot i que el signe de  $e$  és positiu, el seu valor és molt poc significatiu el que indica que la fase aquosa (fase mòbil) en la que es troba dissolt el solut i la fase orgànica (fase estacionària C18 en aquest cas) presenten les mateixes diferències en quan a refractivitat molar en excés.

Per a quantificar millor la precisió de la capacitat de predicció, també es mostren els valors de les variàncies de correlació calculades ( $SD_{\text{corrcal}}^2$ ) i es comparen amb les variàncies experimentals ( $SD_{\text{correxp}}^2$ ). Les variàncies calculades s'obtenen a través de la metodologia de l'estudi de les variàncies (apartat 1.3.2.2.). Les variàncies experimentals resulten, en el cas del sistema cromatogràfic, de la correlació entre els valors  $\log K_p$  i  $\log k$  experimentals sense i amb la correcció de volum (Equació 45 i 46, respectivament) i en el cas del sistema skin PAMPA, de la correlació entre els valors  $\log K_p$  i  $\log P_e$  experimentals, sense i amb la correcció de volum (Equació 56 i 57, respectivament).

**Taula 14.** Variàncies predites i experimentals per a les correlacions sistema permeabilitat amb pell vs. sistema físico-químic sense aplicar la correcció de volum.

Sistema	Permeabilitat de la pell $SD_{\text{bio}}^2=0.213$			
	( $p_{\text{cal}} SD_{\text{crom}}^2$ )	$SD_d^2$	$SD_{\text{corrcal}}^2$	$SD_{\text{correxp}}^2$
Kinetex Evo C18 ( $\log k$ )	0.031	0.436	0.680	0.813
Skin PAMPA ( $\log P_e$ )	0.081	0.094	0.388	0.188

**Taula 15.** Variàncies predites i experimentals per a les correlacions sistema permeabilitat amb pell vs. sistema físico-químic amb la correcció de volum.

Sistema	Permeabilitat de la pell $SD_{\text{bio}}^2=0.213$			
	( $p_{\text{cal}} SD_{\text{crom}}^2$ )	$SD_{\text{d}}^2$	$SD_{\text{corrcal}}^2$	$SD_{\text{correxp}}^2$
Kinetex Evo C18 (log $k$ )	0.048	0.071	0.332	0.123
Skin PAMPA (log $P_e$ )	0.087	0.091	0.390	0.137

Sense la correcció de volum (Taula 14), la variància deguda a l'error intrínsec de les dades cromatogràfiques no és significant. La major contribució de variància prové de la diferència entre la permeabilitat de la pell i el sistema cromatogràfic ( $SD_{\text{d}}^2$ ). En el cas del skin PAMPA en canvi, tant l'error intrínsec del propi sistema com la variància provinent de la dissimilitud entre el sistema biològic i el sistema físico-químic no són gaire diferents, per tant, la major contribució de variància és deguda a l'error de les dades biològiques. En ambdós casos, les variàncies de correlació experimentals es troben en molt bona concordança amb les predites.

Després d'aplicar la correcció de volum (Taula 15), com era d'esperar s'observa una gran disminució del valor  $SD_{\text{d}}^2$  en la diferència entre el sistema permeació de la pell-cromatogràfic i conseqüentment de  $SD_{\text{corrcal}}^2$ . De fet la contribució  $SD_{\text{d}}^2$  de la Taula 15 és inferior a  $SD_{\text{bio}}^2$ , el que significa que les correlacions corregides pel volum es veuen afectades principalment per l'error dels valors log  $K_p$ . Les variàncies experimentals també es correlacionen força bé amb les predites i pel sistema cromatogràfic també s'obtenen valors de  $SD_{\text{correxp}}^2$  més baixos quan s'inclou el volum del solut com a descriptor addicional.

La semblança entre els valors predits i experimentals confirmen, com ja s'ha vist en estudis previs [112], que aquesta metodologia sistemàtica és molt útil per predir l'habilitat dels sistemes físico-químics per emular els processos de permeació de la pell. En el cas del sistema cromatogràfic, l'alt valor de la variància global de la Taula 14 (sense tenir en compte el volum del solut) també indica que la retenció cromatogràfica no abasteix els principals factors de l'absorció dèrmica. Per aquest motiu quan s'utilitza el volum del solut com a variable addicional millora significativament la correlació ja que el transport d'un compost a través de l'estrat corni està influenciat principalment per la lipofilicitat i el volum molecular del compost.

## 4.1.3.1. Similitud entre els sistemes de subrogació de la permeabilitat de la pell

A través del gràfic radial anterior (Figura 25) s'observa que els dos sistemes de subrogació de la permeabilitat de la pell es troben molt propers entre si. Per estudiar millor la similitud entre aquests sistemes físico-químics es calcula el paràmetre  $d$  i s'aplica la metodologia de l'estudi de les variàncies descrita a l'apartat 1.3.2.2.

**Taula 16.** Variàncies predites per a la correlació skin PAMPA-cromatografia (sense i amb correcció de volum) i valor per a la distància  $d$ .

Kinetex Evo C18	Skin PAMPA $SD^2=0.061$			
	$d$	( $p_{cal} SD_{crom}^2$ )	$SD_d^2$	$SD_{corrcal}^2$
Sense correcció de volum	0.242	0.014	0.262	0.338
Amb correcció de volum		0.034	0.004	0.099

Segons el paràmetre  $d$ , el sistema Kinetex Evo C18 és molt similar al sistema skin PAMPA ja que el seu valor és inferior a 0.25. No obstant, només el valor de  $d$  no és suficient per quantificar la precisió de la correlació. Els resultats de la Taula 16 mostren que la contribució de la variància deguda a l'error intrínsec de les dades cromatogràfiques és molt petita i l'error provinent del sistema skin PAMPA tampoc és significant. Sense tenir en compte la variable del volum, la major contribució de variància prové de la diferència entre la permeabilitat skin PAMPA i el sistema cromatogràfic ( $SD_a^2$ ). Amb la correcció de volum s'observa una gran disminució del valor  $SD_d^2$  i conseqüentment de  $SD_{corrcal}^2$ . De fet la contribució  $SD_d^2$  de la Taula 16 és inferior a  $SD_{skin PAMPA}^2$ , el que significa que les correlacions corregides pel volum es veuran afectades principalment per l'error dels valors  $\log P_e$ .

Aprofitant la similitud entre ambdós sistemes físico-químics, amb els 54 anàlits utilitzats per a la caracterització del sistema skin PAMPA s'estableix una correlació entre els valors experimentals de  $\log P_e$  i  $\log k$  i també una segona correlació entre aquests paràmetres juntament amb el volum de McGowan ( $V$ ). Les equacions de correlació obtingudes, respectivament, i els corresponents gràfics són les següents:

$$\log P_e = -4.972(\pm 0.078) + 0.9567(\pm 0.141)\log k$$

$$n = 53 \quad R^2 = 0.473 \quad SD = 0.567 \quad F = 46$$

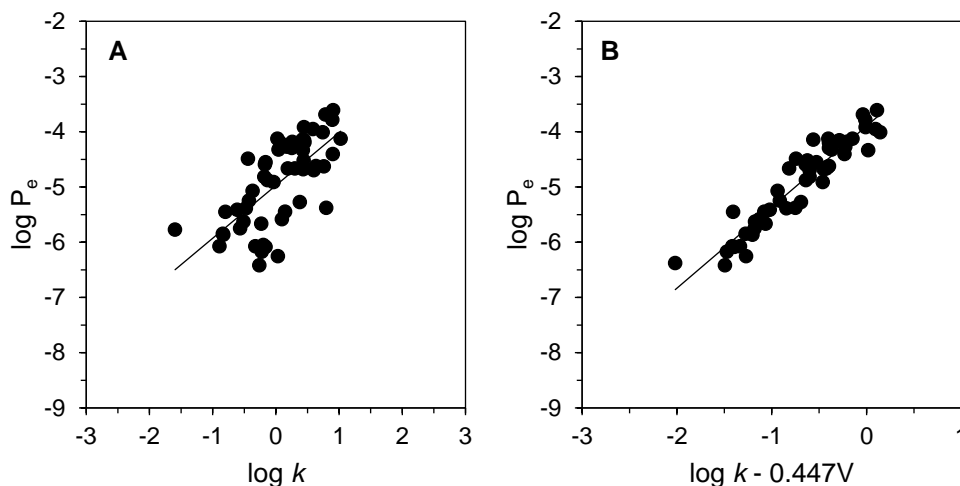
**(Equació 60)**



$$\log P_e = -3.897(\pm 0.083) + 1.468(\pm 0.079)\log k - 0.657(\pm 0.044)V$$

$$n = 52 \quad R^2 = 0.892 \quad SD = 0.262 \quad F = 203$$

(Equació 61)



**Figura 26.** Correlació entre els valors  $\log P_e$  de la membrana skin PAMPA i  $\log k$ .

**A:** Sense correcció de volum. **B:** Amb correcció de volum.

Com era d'esperar, els valors de SD i l'ajust de la correlació de la permeabilitat skin PAMPA en front de la retenció cromatogràfica milloren considerablement amb la correcció del volum molecular ( $V$ ). Per establir l'equació s'utilitza, per tant, l'equació de regressió 61 (amb la correcció de volum). De les 54 substàncies, només s'exclouen de la regressió el 5-fluorouracil i el fenobarbital, ja que els seus residus estàndard són superiors a 2.5 en valor absolut. L'equació 61 mostra molt bons paràmetres estadístics. Pel que fa als coeficients,  $\log k$  té la major contribució i és el doble del valor del coeficient  $V$  en valor absolut.  $\log k$  contribueix de manera positiva i el coeficient  $V$  implica una correcció negativa al valor  $\log P_e$ .

A diferència dels models establerts anteriorment, la correlació 61 no es validada ni internament ni externament. L'aplicabilitat d'aquest model no té gaire sentit pel fet que els dos sistemes són sistemes de subrogació. Malgrat això, l'equació 61 es farà servir en l'apartat 4.2.3.1. per predir valors de  $\log P_e$  com a simples aproximacions.

## **4.2. INFLUÈNCIA DE LA IONITZACIÓ EN LA PERMEABILITAT DE LA PELL HUMANA, LA RETENCIÓ CROMATOGRÀFICA I LA PERMEABILITAT SKIN PAMPA**

En l'apartat 4.1. s'han establert i validat dos models predictius de la permeació de la pell de soluts neutres i espècies neutres a partir de mesures físico-químiques amb molt bons resultats. Aquests paràmetres físico-químics són la retenció cromatogràfica d'una columna C18 convencional, corregida pel volum del solut, i la permeabilitat a través d'una membrana artificial de pell.

La majoria de models de predicció de la permeació de la pell ignoren completament la possibilitat d'ionització i els factors associats, com la dependència de la permeació amb el pH dels compostos ionitzables. Per poder ampliar els models anteriorment desenvolupats a espècies iòniques és rellevant, per tant, estudiar la influència de la ionització dels compostos àcid-base en les diferents propietats d'estudi: la permeabilitat de la pell humana, la retenció cromatogràfica i la permeabilitat skin PAMPA.

### **4.2.1. Permeabilitat de la pell humana**

#### **4.2.1.1. Influència del pH de la solució donadora**

En primer lloc, s'estudia la influència del pH de la solució donadora de les cel·les de Franz en la permeació de la pell de dos compostos àcids (ibuprofèn, amb un  $pK_a$  igual a 4.43, i warfarina, amb un  $pK_a$  de 5.01) i un compost bàsic procedent d'un dels programes d'investigació de descobriment de fàrmacs d'Esteve amb un  $pK_a$  de 7.89. Per raons de propietat no es pot revelar l'estructura d'aquest fàrmac, així doncs es nombrarà com a "compost bàsic".

Els coeficients de permeabilitat  $K_p$  es determinen a diferents valors de pH, entre 3.5 i 8, segons l'apartat 3.3. del capítol de materials i mètodes. El experiments no es realitzen per sota de pH 3 ni per sobre de pH 8 per tal de no danyar la integritat de la membrana. En el treball de Roy i Flynn [20], en canvi, per estudiar la permeació en funció del pH es van emprar solucions bàsiques superiors a pH 8. Els valors de  $K_p$  obtinguts es mostren a les Taules 17-19 juntament amb els paràmetres de flux i temps de latència (extrapolació de la part lineal del gràfic a l'eix x), els quals resulten de treballar sota condicions de dosi infinita.

Per confirmar que les condicions d'assaig són correctes s'utilitza el fentanil com a substància control. Aquest compost s'ha utilitzat durant anys com un potent analgèsic narcòtic, a més penetra la pell amb molta facilitat degut a la seva elevada lipofilicitat [4]. El valor de  $K_p$  obtingut a pH 7.4 és de  $3.02 \cdot 10^{-6}$  cm/s. Si aquest valor es contrasta amb el determinat per Roy i Flynn [20] al mateix valor de pH ( $3.53 \cdot 10^{-6}$  cm/s, veure Taula 1, pàgina 10) es pot deduir que els valors són molt semblants.

**Taula 17.** Paràmetres de l'assaig de permeació de l'ibuprofèn a diferents valors de pH amb els corresponents errors associats.

Ibuprofèn ( $pK_a = 4.43^*$ )				
pH	$K_p$ ( $\cdot 10^{-6}$ cm/s)	Flux ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ )	Temps de latència (h)	Concentració inicial solució donadora ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
3.50	6.89±0.80	0.78±0.09	1.30±0.29	31.50
3.90	6.76±1.40	0.93±0.19	1.44±0.33	38.30
4.50	5.93±0.64	0.88±0.09	-0.72±0.54	41.00
4.92	3.77±0.95	1.81±0.46	1.31±0.38	133.87
5.60	2.42±0.60	3.23±0.60	0.57±0.14	280.00
6.00	1.57±0.18	0.96±0.11	1.89±0.53	169.54
6.84	0.74±0.20	12.73±3.44	0.62±0.27	4784.82
7.40	0.08±0.03	1.22±0.39	1.68±0.42	4222.06

\*Annex 1

**Taula18.** Paràmetres de l'assaig de permeació de la warfarina a diferents valors de pH amb els corresponents errors associats.

Warfarina ( $pK_a = 5.01^*$ )				
pH	$K_p$ ( $\cdot 10^{-6}$ cm/s)	Flux ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Temps de latència (h)	Concentració inicial solució donadora ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
3.55	1.76±0.12	0.02±0.00	4.68±0.21	3.40
4.00	1.80±0.32	0.04±0.01	-1.01±1.35	6.19
4.40	1.47±0.17	0.03±0.00	4.68±0.12	6.20
4.90	1.03±0.28	0.03±0.01	4.83±0.19	7.60
5.50	0.91±0.36	0.10±0.04	-3.22±5.66	29.80
6.00	0.82±0.46	0.17±0.10	2.29±1.24	57.56
6.50	0.42±0.20	0.71±0.33	-0.55±0.02	463.56
7.27	0.03±0.01	0.08±0.02	6.43±0.07	697.00

\*Annex 1

**Taula 19.** Paràmetres de l'assaig de permeació del compost bàsic a diferents valors de pH amb els corresponents errors associats.

Compost bàsic ( $pK_a = 7.89^*$ )				
pH	$K_p$ ( $\cdot 10^{-6}$ cm/s)	Flux ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ )	Temps de latència (h)	Concentració inicial solució donadora ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
4.50	0.008 $\pm$ 0.002	0.87 $\pm$ 0.02	0.56 $\pm$ 2.15	30319.78
5.50	0.07 $\pm$ 0.002	6.75 $\pm$ 0.02	3.41 $\pm$ 0.66	26262.25
6.00	0.09 $\pm$ 0.01	5.88 $\pm$ 0.64	1.93 $\pm$ 0.89	19158.99
6.50	0.23 $\pm$ 0.003	15.48 $\pm$ 0.20	1.53 $\pm$ 1.23	18468.34
7.00	0.33 $\pm$ 0.07	20.86 $\pm$ 4.61	1.77 $\pm$ 0.98	17788.71
7.40	0.49 $\pm$ 0.08	21.94 $\pm$ 3.60	1.91 $\pm$ 0.36	12492.48
8.00	1.22 $\pm$ 0.38	19.18 $\pm$ 5.91	1.78 $\pm$ 1.03	4373.59

\*Valor determinat potenciomètricament amb un valorador T3 (Sirius Analytical Instruments Ltd., East Sussex, UK)

En el cas de l'ibuprofèn, els paràmetres de la taula anterior mostren la tendència següent: a mesura que augmenta el pH, el flux augmenta (excepte a pH 6 i 7.4) i el coeficient de permeabilitat disminueix. Això és conseqüència de la ionització del fàrmac ja que a mesura que augmenta el pH el grau d'ionització augmenta, la solubilitat en la solució donadora també augmenta i la difusió del fàrmac a través de l'epidermis és major. No obstant, la fracció total absorbida disminueix, per tant  $K_p$  disminueix. És possible que els valors de flux a pH 6 i 7.4 siguin més baixos de l'esperat degut a un problema de saturació de la solució donadora. Per a la warfarina, la tendència és la mateixa: a major pH, major solubilitat, major flux i menor  $K_p$ , excepte a pH 7.4, on el valor de flux és més petit de l'esperat possiblement a causa de problemes de saturació com en el cas de l'ibuprofèn. Pel que fa al temps de latència, en el cas dels àcids aquest paràmetre no mostra una clara tendència amb el pH. En alguns valors de pH els temps de latència són negatius degut a algun error experimental i en altres no són significativament diferents de zero (com per exemple en el cas de la warfarina a pH 4 i 5.5).

El compost bàsic mostra una tendència contrària als àcids: a mesura que disminueix el pH, augmenta la ionització, augmenta la solubilitat però el flux disminueix, i com era d'esperar també disminueix el coeficient de permeabilitat. Respecte al temps de latència, si no es contempla el valor a pH 4.5 ja que la desviació estàndard és molt gran (i per tant el valor es considera no significativament diferent de zero), es pot observar un comportament més o menys constant. Tot i això, el temps de latència

no sembla un paràmetre prou fiable ja que en general els errors associats a aquest paràmetre són força elevats.

Per una altra banda, Roy i Flynn [20] van investigar, en estudis previs, la influència del pH en la permeació de la pell de dos compostos bàsics d'interès farmacèutic, el fentanil i el sufentanil. Com s'ha mencionat a la part introductòria (Capítol 1, Apartat 1.1.3.2.), aquests autors van observar un augment exponencial dels coeficients de permeabilitat experimental a mesura que augmentava la fracció de l'espècie neutra, no obstant, a pH elevats els fluxos d'aquests fàrmacs es trobaven limitats per la seva solubilitat ja que els valors a partir de pH 9 es mostraven constants. Aquesta tendència és molt similar a l'observada pel compost bàsic.

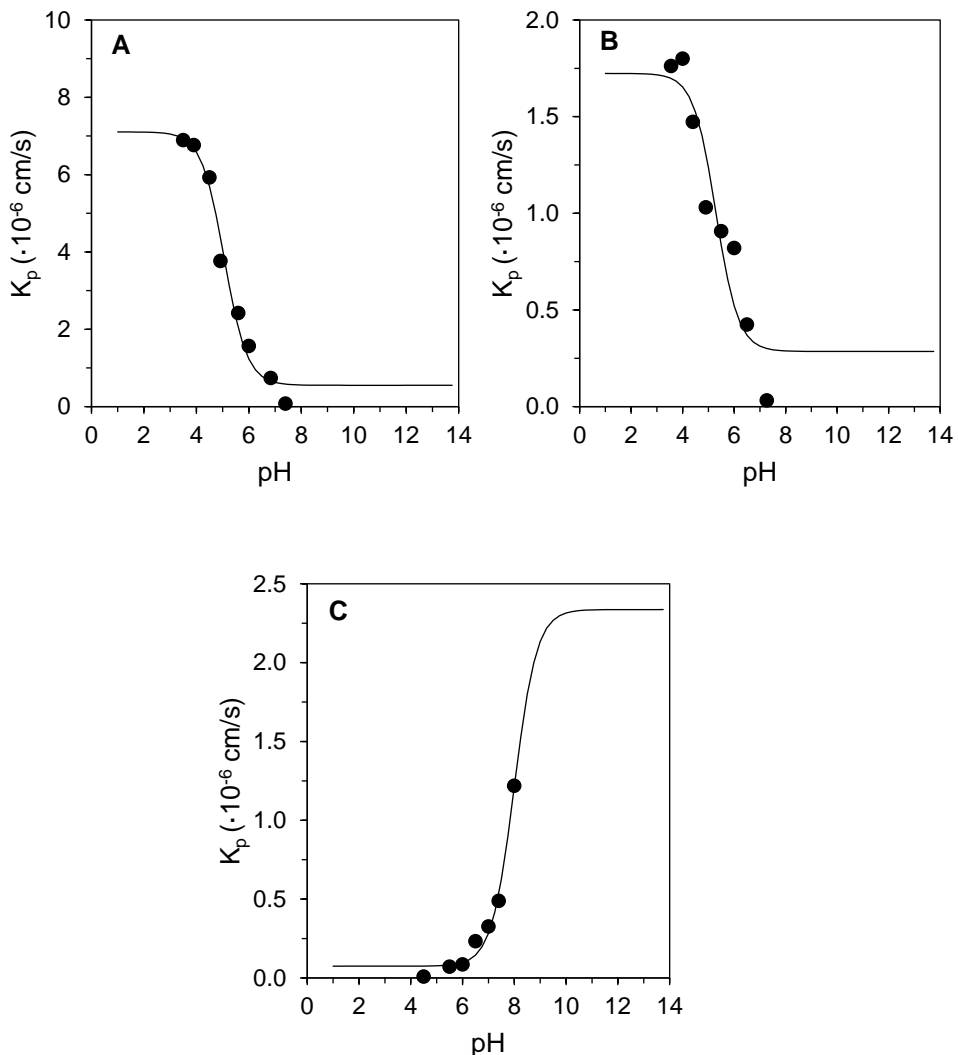
A continuació, els coeficients de permeabilitat dels 3 compostos d'estudi s'ajusten als valors de pH de la solució donadora a través de l'equació 9. Aquest ajust proporciona la permeabilitat de la forma neutra i la iònica i el valor de la constant de dissociació àcid-base del fàrmac en el medi de dissolució en particular i les condicions experimentals donades ( $pK'_a$ , constant de dissociació aparent). Els perfils de permeabilitat-pH de cada compost es mostren a la Figura 27. Els paràmetres d'ajust i les estadístiques es presenten a la taula següent:

**Taula 20.** Paràmetres ( $\pm$ SD) i estadístiques obtinguts de l'ajust de la permeació de la pell al pH de la solució donadora de l'ibuprofèn, la warfarina i el compost bàsic.

Solut	Paràmetres d'ajust			Estadístiques		
	$K_{p_{HA}}$ ( $\cdot 10^{-6}$ cm/s)	$K_{p_A}$ ( $\cdot 10^{-6}$ cm/s)	$pK'_a$	$R^2$	SD	F
Ibuprofèn	7.11 $\pm$ 0.35	0.55 $\pm$ 0.28	5.06 $\pm$ 0.13	0.982	4.34 $\cdot 10^{-7}$	136
Warfarina	1.72 $\pm$ 0.17	0.29 $\pm$ 0.18	5.29 $\pm$ 0.32	0.897	2.37 $\cdot 10^{-7}$	22
Compost bàsic	0.07 $\pm$ 0.03	2.34 $\pm$ 0.60	7.99 $\pm$ 0.21	0.984	6.43 $\cdot 10^{-8}$	125

En general s'observa que les estadístiques dels ajustos són suficientment bones, no obstant, els errors associats dels coeficients de les espècies ionitzades són una mica grans. En el cas de l'ibuprofèn, el valor de  $K_p$  de l'espècie neutra és aproximadament 13 cops més gran que el de l'espècie ionitzada, i per a la warfarina aproximadament 6 cops. La diferència entre la permeabilitat de la forma neutra i la forma ionitzada d'un compost es pot justificar per la seva lipofilitat, per tant, és d'esperar que aquesta relació sigui més gran en l'ibuprofèn ja que és més lipòfil que la warfarina.

En el cas del compost bàsic, la relació entre la forma neutra i la forma ionitzada és aproximadament de 30.

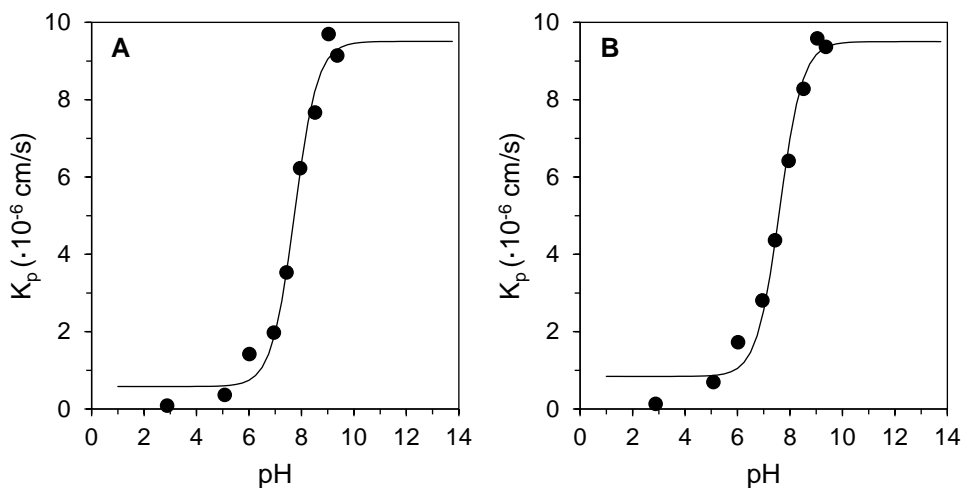


**Figura 27.** Perfils dels coeficients de permeabilitat en front del pH de la solució donadora. **A:** Ibuprofèn **B:** Warfarina **C:** Compost bàsic.

Les dades de permeabilitat del fentanil i el sufentanil analitzades experimentalment per Roy i Flynn [20], s'han aprofitat en aquest apartat per tal de ser ajustades en funció del pH a través de l'equació 9. Els resultats es mostren a continuació:

**Taula 21.** Paràmetres ( $\pm$ SD) i estadístiques obtinguts de l'ajust de la permeació de la pell al pH de la solució donadora del fentanil i sufentanil.

Solut	Paràmetres d'ajust			Estadístiques		
	$K_{p_{\text{PHA}}}$ ( $\cdot 10^{-6}$ cm/s)	$K_{p_{\text{A}}}$ ( $\cdot 10^{-6}$ cm/s)	$\text{p}K'_a$	$R^2$	SD	F
Fentanil	$0.58 \pm 0.28$	$9.51 \pm 0.37$	$7.73 \pm 0.10$	0.987	$5.01 \cdot 10^{-7}$	226
Sufentanil	$0.84 \pm 0.29$	$9.50 \pm 0.35$	$7.61 \pm 0.10$	0.986	$5.02 \cdot 10^{-7}$	217



**Figura 28.** Perfils del coeficient de permeabilitat en front del pH de la solució donadora. **A:** Fentanil **B:** Sufentanil.

Les estadístiques de la Taula 21 són força bones. Els errors associats als coeficients de permeabilitat de la forma ionitzada també són grans. Això es deu al fet que tant el fentanil com el sufentanil mostren a pH àcids valors de  $K_p$  experimentals per sota de l'ajust teòric. La relació entre la forma neutra i la forma ionitzada és aproximadament de 15 per ambdós compostos.

En tots els casos la permeabilitat dels anions i cations és molt més petita que la de les corresponents formes neutres, no obstant, no es pot establir una clara relació entre les formes neutres i les ionitzades al haver-hi tan pocs compostos.

El fet que els valors de la permeació de les espècies iòniques no siguin zero confirmen, com era d'esperar, que aquestes travessen la membrana de pell humana i ho fan principalment a través de les rutes polars de la pell (via transcel·lular) [20].

Els valors de  $pK'_a$  procedents dels ajusts són en general semblants al valors corresponents en aigua, no obstant, tampoc es pot establir una clara relació al disposar de pocs compostos.

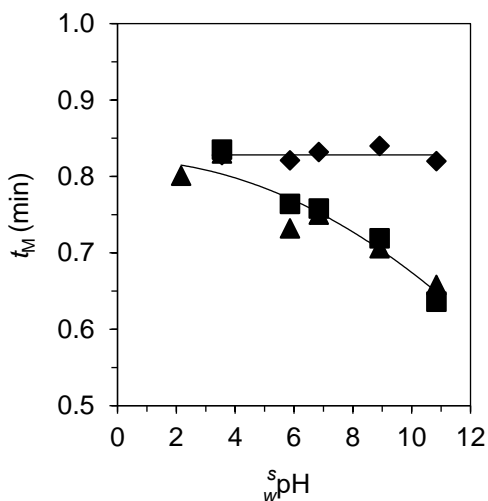
#### **4.2.2. Retenció cromatogràfica**

La retenció cromatogràfica es relaciona amb el pH de la fase mòbil ( ${}^s_w\text{pH}$ ) a través de l'equació 40. S'utilitza l'escala  ${}^s_w\text{pH}$  per obtenir el grau d'ionització exacte del solut en la fase mòbil. L'equació 40 es pot escriure en termes de factor de retenció, temps de retenció ajustat o temps de retenció [120]. Per poder calcular el factor de retenció (equació 38) és necessari conèixer el valor del temps mort, és a dir, el temps de retenció d'un component no retingut per la fase estacionària. Així doncs, abans d'investigar la variació de la retenció cromatogràfica amb el pH de la fase mòbil de diferents soluts àcid-base, és important estudiar el comportament del temps mort d'espècies neutres i espècies iòniques amb el pH. Com s'ha mencionat anteriorment, els temps mort es determina mitjançant diferents mètodes: la picnometria i els temps de retenció de marcadors no retinguts neutres (DMSO) i aniònics (KBr i KI). Els resultats per als diferents tampons estudiats es presenten a la Taula 22 i la Figura 29.

**Taula 22.** Valors de pH en aigua ( ${}^w_w\text{pH}$ ) i valors de pH en la fase mòbil 40% v/v ACN ( ${}^s_w\text{pH}$ ) dels diferents tampons utilitzats, així com els temps de retenció dels marcadors de temps mort iònics (KBr, KI) i neutre (DMSO).

Tampons estudiats	${}^w_w\text{pH}$	${}^s_w\text{pH}$	$t_M$ (KBr)	$t_M$ (KI)	$t_M$ (DMSO)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50mM	1.83	2.16	0.801	-	-
HCOOH 10mM	2.96	3.55	0.830	0.835	0.828
CH <sub>3</sub> COOH 10mM	5.09	5.86	0.732	0.764	0.821
H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> 10mM	6.98	6.84	0.750	0.758	0.832
NH <sub>3</sub> 10mM	9.05	8.91	0.706	0.719	0.840
H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> 10mM	11.03	10.84	0.658	0.636	0.820
Promig			0.746 ± 0.06	0.742 ± 0.07	0.828 ± 0.01





**Figura 29.** Variació del temps de retenció dels marcadors de temps mort neutre i iònics amb el pH de la fase mòbil. (◆) DMSO, (▲) KBr, (■) KI.

Els resultats mostren que el marcador neutre DMSO dona valors constants, independentment del tampó emprat, amb un valor promig de  $0.83 \pm 0.01$  min. Aquest valor és molt similar als obtinguts per la picnometria ( $0.84 \pm 0.01$  mL i  $0.86 \pm 0.01$  mL per als parells de solvents aigua/metanol i aigua/acetnitril, respectivament), per tant, com s'ha comentat a l'apartat 4.1.1.1., s'assumeix que es pot prendre com el temps mort de compostos neutres i espècies neutres.

Els marcadors iònics KBr i KI mostren un comportament molt similar en la variació del temps de retenció amb el pH del tampó. A valors de pH àcids ( $\text{pH}_w^s < 4$  o  $\text{pH}_w^w < 3$ ), el temps de retenció coincideix amb el que s'obté amb el DMSO, però més endavant disminueix amb el pH del tampó. Aquest comportament s'atribueix a la repulsió electrònica entre el marcador aniònic ( $\text{Br}^-$  o  $\text{I}^-$ ) i els silanols ionitzats de la columna. A pH àcid, els silanols es troben protonats, no hi ha repulsió de càrrega i el temps mort és el mateix que el del marcador neutre. No obstant això, quan el pH augmenta, la ionització dels silanols i la repulsió també augmenten i el temps mort disminueix [154].

El temps mort obtingut de la picnometria es troba en concordança amb l'obtingut a partir de la retenció del marcador neutre (0.85 i 0.83, respectivament), no obstant, el temps mort dels anions depèn del pH de la fase mòbil. Vist que no es pot determinar

amb exactitud el temps mort de les espècies iòniques, l'equació general que relaciona la retenció amb el pH (equació 40) s'expressarà en termes de temps de retenció. El temps mort dels cations no s'ha mesurat directament però les dades de retenció que es mostren a continuació podrien indicar el seu comportament.

#### 4.2.2.1 Variació de la retenció cromatogràfica amb el pH de la fase mòbil

Els temps de retenció de 66 compostos de naturalesa àcid-base s'ajusten als valors de pH mesurats en la fase mòbil ( $^s\text{pH}$ ) a través de les equacions particulars 41-42. Els ajusts dels perfils de la retenció en front del pH proporcionen els temps de retenció de la forma neutra i iònica i també el  $\text{p}K_a$  de la fase mòbil ( $^s\text{p}K_a$ , 40 % acetonitril).

La Taula 23 mostra els paràmetres d'ajust obtinguts per als àcids neutres monoprotics mitjançant l'aplicació de l'equació 41. S'obtenen molt bones estadístiques en la majoria dels casos. Els compostos s'han dividit en tres grups: fenols, àcids carboxílics i altres, els quals no tenen ni grup carboxílic ni grup fenòlic (dos àcids barbitúrics, 5-fluorouracil i warfarina). Les Figures 30 A-C presenten alguns perfils representatius dels àcids monoprotics.

Els resultats de la Taula 23 mostren que en tots els casos el temps de retenció de les formes anióniques és molt inferior al de les formes neutres, encara que hi ha algunes petites diferències segons el tipus de compost.

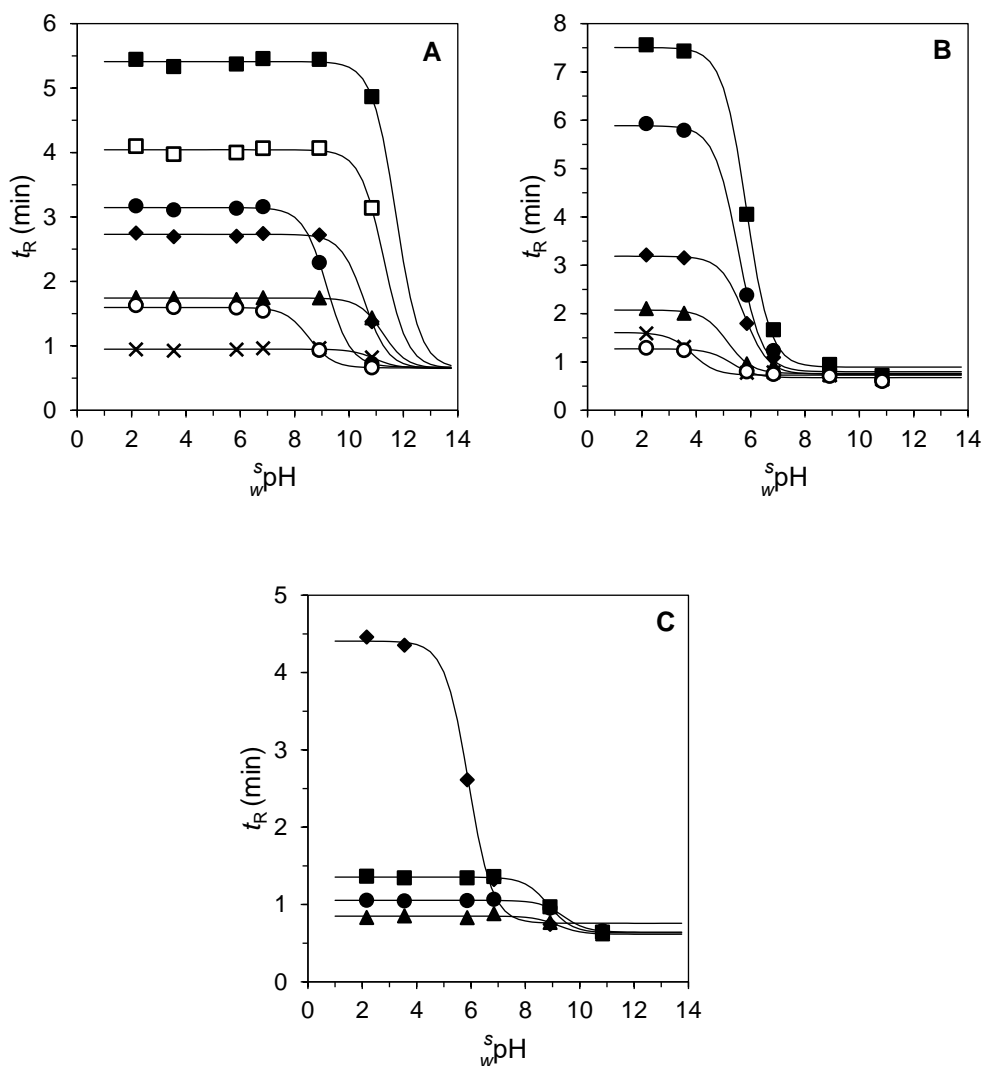
Els temps de retenció de les formes neutres dels fenols van d'1 min per als més polars ( $\log P_{o/w} < 1$ ) a més de 5 minuts per als menys polars (timol i capsàicina,  $\log P_{o/w} > 3$ ). Els temps de retenció de les formes iòniques (fenolats), en canvi, es corresponen en tots els casos amb al temps de retenció dels marcadors no retinguts aniónics a pH 11 (0.65 min, valor promig entre el KBr i el KI). El temps de retenció dels fenolats només s'ha pogut calcular per als fenols més àcids. En el cas dels fenols menys àcids ( $^w\text{p}K_a > 9$ ) no hi ha prou dades a pH bàsic per calcular la retenció adequadament, per tant, en aquests casos, el temps de retenció de l'anió s'ha fixat a 0.65 min i la resta de paràmetres s'han estimat mitjançant l'ajust de les dades de  $t_R$  en front de  $^s\text{pH}$ . Alguns perfils representatius es presenten en la Figura 30A.

**Taula 23.** Paràmetres ( $\pm$ SD) i estadístiques obtinguts de l'ajust del temps de retenció d'àcids monoprotics al pH de la fase mòbil.

Àcids monoprotics	Paràmetres d'ajust			Estadístiques		
	$t_{R_{HA}}$	$t_{R_{A^-}}$	$^s_w pK_a$	$R^2$	SD	F
<b>Fenols</b>						
2,4-Diclorofenol	3.15 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.03	9.19 $\pm$ 0.03	0.999	0.03	2593
2-Clorofenol	1.92 $\pm$ 0.01	0.63 $\pm$ 0.06	10.01 $\pm$ 0.13	0.999	0.02	1159
2-Isopropil-5-Metilfenol (Timol)	5.41 $\pm$ 0.02	0.65	11.73 $\pm$ 0.05	0.952	0.05	80
2-Naftol	2.49 $\pm$ 0.01	0.65	10.73 $\pm$ 0.03	0.996	0.03	1037
2-Nitrofenol	2.24 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.02	8.41 $\pm$ 0.04	0.999	0.02	3080
3-Metilfenol (m-Cresol)	1.74 $\pm$ 0.01	0.65	11.24 $\pm$ 0.03	0.992	0.01	478
3-Nitrofenol	1.70 $\pm$ 0.01	0.64 $\pm$ 0.02	9.57 $\pm$ 0.06	0.999	0.02	1327
4-Bromofenol	2.29 $\pm$ 0.01	0.65	10.33 $\pm$ 0.04	0.997	0.03	1559
4-Cloro-3-metilfenol	2.73 $\pm$ 0.01	0.65	10.57 $\pm$ 0.03	0.997	0.03	1484
4-Clorofenol	2.08 $\pm$ 0.01	0.65	10.38 $\pm$ 0.05	0.996	0.03	1088
4-Etilfenol	2.34 $\pm$ 0.01	0.65	11.27 $\pm$ 0.04	0.979	0.03	184
4-Hidroxifenilacetamida	0.94 $\pm$ 0.01	0.65	10.74 $\pm$ 0.12	0.932	0.02	55
4-Metilfenol (p-Cresol)	1.73 $\pm$ 0.01	0.65	11.34 $\pm$ 0.03	0.989	0.01	357
4-Nitrofenol	1.60 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.03	8.52 $\pm$ 0.08	0.997	0.03	562
Alcohol 4-hidroxibenzílic	0.95 $\pm$ 0.01	0.65	10.95 $\pm$ 0.11	0.916	0.02	43
Capsaïcina	5.61 $\pm$ 0.03	0.65	10.93 $\pm$ 0.02	0.997	0.06	1145
Catecol	1.11 $\pm$ 0.01	0.65	10.51 $\pm$ 0.09	0.982	0.02	214
Estradiol	3.02 $\pm$ 0.02	0.65	11.37 $\pm$ 0.04	0.976	0.04	161
Estriol	1.22 $\pm$ 0.01	0.65	11.49 $\pm$ 0.08	0.921	0.01	47
Estrona	4.04 $\pm$ 0.02	0.65	11.28 $\pm$ 0.04	0.983	0.05	228

(Continuació Taula 23)

Àcids monopròtics	Paràmetres d'ajust			Estadístiques		
	$t_{R_{HA}}$	$t_{R_{A^-}}$	${}^s_w pK_a$	$R^2$	SD	F
<b>Fenols</b>						
Fenol	1.41±0.01	0.65	11.09±0.04	0.989	0.01	320
Resorcinol	1.02±0.01	0.65	10.67±0.05	0.990	0.01	410
<b>Àcids carboxílics</b>						
Àcid 2-hidroxibenzoic (Àcid salicílic)	1.61±0.07	0.73±0.03	3.85±0.20	0.981	0.07	79
Àcid acetilsalicílic (Aspirina)	1.27±0.04	0.68±0.04	5.31±0.29	0.976	0.06	62
Àcid benzoic	1.38±0.05	0.69±0.04	5.40±0.24	0.979	0.06	69
Diclofenac	7.36±0.09	0.98±0.07	5.34±0.05	0.999	0.12	1700
Flurbiprofèn	5.89±0.11	0.80±0.09	5.53±0.07	0.998	0.15	645
Ibuprofèn	7.51±0.11	0.89±0.10	5.84±0.05	0.999	0.15	1034
Indometacina	7.45±0.09	0.99±0.08	5.46±0.04	0.999	0.13	1507
Ketoprofèn	3.08±0.08	0.77±0.07	5.57±0.11	0.994	0.11	244
Ketorolac	2.07±0.07	0.76±0.06	5.15±0.28	0.986	0.1	108
Naproxèn	3.19±0.08	0.75±0.07	5.77±0.10	0.994	0.12	242
<b>Altres</b>						
5-Fluorouracil	0.85±0.01	0.62±0.03	9.18±0.23	0.959	0.02	35
Àcid 5,5-dietilbarbitúric (Barbital)	1.05±0.01	0.64±0.01	9.40±0.06	0.998	0.01	728
Àcid 5-etil-5-fenilbarbitúric (Fenobarbital)	1.35±0.01	0.63±0.01	8.85±0.04	0.999	0.01	1454
Warfarina	4.40±0.10	0.76±0.09	5.91±0.07	0.996	0.14	402



**Figura 30.** Perfils del temps de retenció vs. pH de la fase mòbil d'alguns àcid monopròtics representatius. **A (fenols):** (■) Timol, (●) 2,4-Diclorofenol, (▲) 3-Metilfenol, (◆) 4-Cloro-3-metilfenol, (□) Estrona, (○) 4-Nitrofenol, (×) Alcohol 4-hidroxibenzílic. **B (àcids carboxílics):** (■) Ibuprofèn, (●) Flurbiprofèn, (▲) Ketorolac, (◆) Naproxèn, (○) Aspirina, (×) Àcid salicílic. **C (altres àcids):** (■) Fenobarbital, (●) Barbital, (▲) 5-Fluorouracil, (◆) Warfarina.

Com a compostos representatius dels àcids carboxílics, s'han estudiat tres derivats de l'àcid benzoic i alguns antiinflamatoris no esteroides. Aquests es troben més retinguts que els fenols, amb temps de retenció de les formes neutres que van de

1.3 min per als més polars (aspirina i àcid benzoic,  $\log P_{o/w} < 2$ ) fins a més de 7 minuts per als més hidrofòbics (diclofenac, indometacina i ibuprofèn,  $\log P_{o/w} \geq 3.5$ ). El temps de retenció de les formes aniòniques és també més alt que el dels fenolats i, per tant, superior al temps de mort dels anions (0.65 min), encara que els compostos més polars com l'aspirina i l'àcid benzoic presenten un temps de retenció només lleugerament superior (0.68 min). Aquestes dades mostren que la retenció dels anions està clarament relacionada amb la retenció de les formes neutres ja que com s'ha comentat l'aspirina i l'àcid benzoic mostren les retencions mínimes (0.68 min) i el diclofenac, l'indometacina i l'ibuprofèn, les més grans (aproximadament 0.9-1.0 min). Aquestes dades suggereixen que els anions del diclofenac, indometacina i ibuprofèn es retenen significativament a la columna, probablement com a parells iònics. La Figura 30B presenta els perfils de diversos àcids carboxílics representatius.

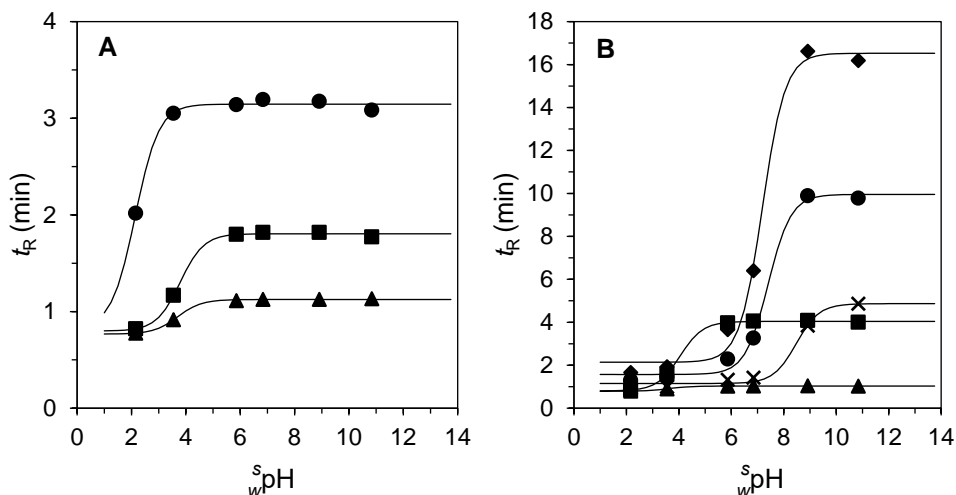
L'últim grup d'àcids neutres estudiats (etiquetats com altres a la Taula 23) està format per compostos molt polars (barbital, fenobarbital i 5-fluorouracil) i la warfarina, que és menys polar. La retenció dels tres compostos més polars és molt baixa per a les dues formes, la forma neutra ( $t_R$  proper a 1 min) i la forma aniònica (no gaire diferent al temps mort dels anions). La retenció de la warfarina és més gran tant per a la forma neutra com per a la forma aniònica, tal com s'esperava segons l'elevat valor de  $\log P_{o/w}$ . Els perfils dels quatre compostos es presenten a la Figura 30C.

Pel que fa a la constant de dissociació dels àcids neutres, els valors de  $pK_a$  obtinguts en la fase mòbil ( ${}^s pK_a$ ) són més alts (unitats de  $pK_a$  de 0.8 a 1.5) que els valors de  $pK_a$  en aigua pura ( ${}^w pK_a$ ) obtinguts de la literatura (Annex 1).

El paràmetres d'ajust obtinguts per a les bases neutres monopròtiques mitjançant l'aplicació de l'equació 41 es donen a la Taula 24 per a piridines i amines, i es presenten diversos perfils representatius a la Figura 31A i 31B, respectivament. S'obtenen molt bones estadístiques en tots els casos.

**Taula 24.** Paràmetres ( $\pm$ SD) i estadístiques obtinguts de l'ajust del temps de retenció de bases monopròtiques al pH de la fase mòbil.

Bases monopròtiques	Paràmetres d'ajust			Estadístiques		
	$t_{R_{HA^+}}$	$t_{R_A}$	${}^s_w pK_a$	R <sup>2</sup>	SD	F
<b>Piridines</b>						
Benzil nicotinat	0.83	3.15 $\pm$ 0.02	2.14 $\pm$ 0.03	0.993	0.04	588
Isoquinolina	0.80 $\pm$ 0.02	1.80 $\pm$ 0.01	3.79 $\pm$ 0.05	0.998	0.02	922
Piridina	0.77 $\pm$ 0.01	1.12 $\pm$ 0.003	3.70 $\pm$ 0.04	0.999	0.01	1190
<b>Amines</b>						
2-Nitro-p-fenilendiamina	0.80 $\pm$ 0.01	1.14 $\pm$ 0.01	3.42 $\pm$ 0.08	0.995	0.01	302
2-Toluïdina	0.80 $\pm$ 0.03	1.71 $\pm$ 0.01	3.43 $\pm$ 0.05	0.998	0.02	678
Aminopirina	0.81 $\pm$ 0.01	1.32 $\pm$ 0.01	4.10 $\pm$ 0.08	0.998	0.01	910
Anilina	0.79 $\pm$ 0.02	1.40 $\pm$ 0.01	3.54 $\pm$ 0.05	0.998	0.02	636
Atropina	1.00 $\pm$ 0.05	2.98 $\pm$ 0.09	8.24 $\pm$ 0.17	0.994	0.09	267
Codeïna	0.93 $\pm$ 0.07	1.54 $\pm$ 0.08	7.19 $\pm$ 0.43	0.918	0.11	17
Dietilcarbamazina	0.89 $\pm$ 0.05	1.27 $\pm$ 0.06	6.93 $\pm$ 0.4	0.902	0.08	14
Efedrina	0.88 $\pm$ 0.03	2.05 $\pm$ 0.04	7.68 $\pm$ 0.21	0.994	0.05	268
Escopolamina	0.91 $\pm$ 0.05	1.29 $\pm$ 0.05	6.92 $\pm$ 0.40	0.904	0.08	14
Fentanil	1.57 $\pm$ 0.22	9.95 $\pm$ 0.27	7.40 $\pm$ 0.13	0.995	0.36	312
Lidocaïna	1.04 $\pm$ 0.07	4.53 $\pm$ 0.08	7.15 $\pm$ 0.07	0.998	0.11	616
N,N-Dimetilanilina	0.81 $\pm$ 0.04	4.04 $\pm$ 0.02	4.04 $\pm$ 0.04	0.999	0.04	3895
o-Fenilendiamina	0.79 $\pm$ 0.01	1.03 $\pm$ 0.003	3.59 $\pm$ 0.06	0.997	0.01	589
Oxicodona	0.91 $\pm$ 0.05	2.51 $\pm$ 0.07	7.56 $\pm$ 0.20	0.992	0.09	198
Propranolol	1.27 $\pm$ 0.13	5.55 $\pm$ 0.17	7.58 $\pm$ 0.19	0.994	0.22	230
Sufentanil	2.15 $\pm$ 0.41	16.52 $\pm$ 0.48	7.19 $\pm$ 0.11	0.995	0.66	273
Tramadol	1.15 $\pm$ 0.10	4.87 $\pm$ 0.20	8.48 $\pm$ 0.15	0.991	0.2	173



**Figura 31.** Perfils del temps de retenció vs. pH de la fase mòbil d'algunes bases monoprotiques representatives. **A (piridines):** (■) Isoquinolina, (●) Benzil nicotinat, (▲) Piridina. **B (amines):** (■) N,N-Dimetilanilina, (●) Fentanil, (▲) o-Fenilendiamina, (◆) Sufentanil, (×) Tramadol.

L'interval de polaritat estudiat va des de 0.15 per a la o-fenilendiamina, que mostra una retenció molt baixa, a 3.95 per al sufentanil amb la major retenció (16.52 min per a la forma neutra). Els temps de retenció dels cations són clarament més grans que el temps de retenció dels anions (0.65 min). El temps de retenció del benzil nicotinat protonat, el compost menys bàsic, no s'ha pogut determinar amb precisió a causa de la manca de dades de retenció als valors de  $^s\text{pH}$  inferiors als valors de  $^s\text{p}K_a$ . Per ajustar aquestes dades, el temps de retenció de la forma catiónica s'ha fixat a 0.83 min (temps de retenció del marcador neutre no retingut), com a valor de consens, a causa de l'alta variabilitat dels temps de retenció mostrada pels cations.

Al contrari que els àcids, els valors de  $\text{p}K_a$  de l'ajust de les bases en la fase mòbil ( $^s\text{p}K_a$ ) són inferiors als valors de  $\text{p}K_a$  en aigua ( $^w\text{p}K_a$ ).

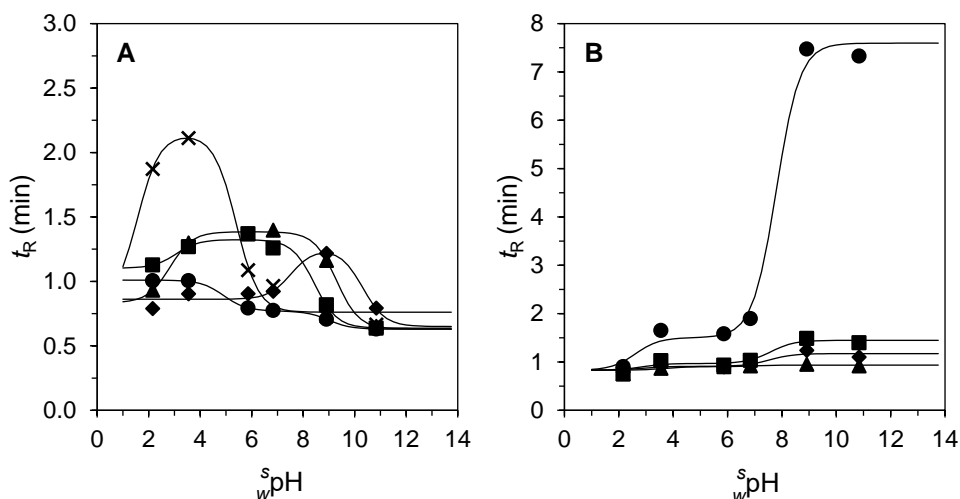
També s'han obtingut els paràmetres d'ajust de diversos soluts dipròtics a través de l'aplicació de l'equació 42 i els resultats es presenten a la Taula 25 i la Figura 32. Els compostos estudiats inclouen un àcid neutre dipròtic amb un grup carboxílic i un grup fenòlic (àcid 4-hidroxifenilacètic), quatre amfòlits amb un grup amino o piridino i un grup fenòlic, i quatre bases neutres dipròtiques.



**Taula 25.** Paràmetres ( $\pm$ SD) i estadístiques obtinguts de l'ajust del temps de retenció dels soluts dipròtics al pH de la fase mòbil. Z és la càrrega de les forma més dissociada del compost.

Solut dipròtic	z	Paràmetres d'ajust					Estadístiques		
		$t_{R_{H_2A^{z+2}}}$	$t_{R_{HA^{z+1}}}$	$t_{R_{A^z}}$	$^s pK_{a1}$	$^s pK_{a2}$	R <sup>2</sup>	SD	F
Àcid 4-hidroxifenilacètic	-2	<b>1.01±0.01</b>	0.77±0.01	0.63±0.01	4.91±0.21	8.99±0.12	0.999	0.01	540
2-Amino-4-nitrofenol	-1	1.10±0.10	<b>1.32±0.05</b>	0.64±0.07	3.07±0.99	8.44±0.30	0.989	0.07	22
4-Amino-2-nitrofenol	-1	0.83±0.05	<b>1.39±0.02</b>	0.63±0.02	2.82±0.20	9.29±0.07	0.999	0.02	223
Morfina	-1	0.86±0.04	<b>1.26±0.08</b>	0.65	7.53±0.61	10.30±0.30	0.933	0.06	9
Piroxicam	-1	0.83	<b>2.14±0.15</b>	0.76±0.08	1.57±0.37	5.40±0.26	0.981	0.13	34
Clorfeniramina	0	0.83	1.50±0.31	<b>7.60±0.31</b>	2.61±1.25	7.79±0.33	0.994	0.37	114
Nicotina	0	0.83	0.97±0.12	<b>1.45±0.08</b>	2.87±2.15	7.58±1.05	0.938	0.11	10
p-Fenilendiamina	0	0.83	0.90±0.08	<b>0.93±0.04</b>	3.69±1.60	6.91±4.66	0.731	0.06	2
Ranitidina	0	0.83	0.91±0.09	<b>1.17±0.07</b>	2.90±2.98	7.52±1.43	0.879	0.09	5

El temps de retenció de la forma neutra està ressaltat amb negreta



**Figura 32.** Perfils del temps de retenció vs. pH de la fase mòbil dels soluts dipròtics. **A (àcids dipròtics i amfòlits):** (■) 2-Amino-4-nitrofenol, (●) Àcid 4-hidroxifenilacètic, (▲) 4-Amino-2-nitrofenol, (◆) Morfina, (×) Piroxicam. **B (bases dipròtiques):** (■) Nicotina, (●) Clorfeniramina, (▲) p-Fenilendiamina, (◆) Ranitidina.

Tots els compostos de la Taula 25 són molt o bastant hidròfils ( $\log P_{o/w} < 2$ ) i les formes neutres es troben molt poc retingudes (uns 2 min o menys), amb l'excepció de la clorfeniramina. La retenció de les formes iòniques és encara més baixa. La retenció dels anions monocarregats es troba en l'interval de 0.63-0.77 min, és a dir, proper al temps mort dels anions (0.65 min). La retenció de l'aní dicarregat de l'àcid 4-hidroxifenilacètic es troba en el mateix interval (0.63 min) i lleugerament inferior al de l'aní monocarregat del mateix àcid (0.77 min). Aquest fet suggereix que l'exclusió dels anions dicarregats per part de la fase estacionària és lleugerament més gran que la dels anions monocarregats. La retenció dels cations monoprotonats es troba en l'interval de 0.83-1.10 min per als amfòlits i 0.90-1.50 min per a les bases dipròtiques. La retenció de les bases neutres dipròtiques totalment protonades (dicarregades) no es pot estimar bé a causa de la manca de dades a valors de pH molt baixos, però els perfils de retenció s'ajusten bé amb un valor de retenció proper al temps mort de compostos neutres, 0.83 min (Figura 32B). Els perfils mostren clarament que la retenció dels cations dicarregats és lleugerament inferior a la dels cations monocarregats. Els valors de  $s_pK_a$  dels ajusts són consistents amb els resultats dels àcids i les bases monopròtiques: els valors de l'ajust de  $s_pK_a$  són,

en general, més alts per als grups àcids i més baixos per als grups bàsics que els  ${}^w_pK_a$ . Les excepcions numèriques són els valors del primer  $pK_a$  del 2-amino-4-nitrofenol i la ranitidina i els dos valors de  $pK_a$  de la p-fenilendiamina, els quals mostren grans incerteses. A més, el valor del segon  ${}^s_pK_a$  de l'àcid 4-hidroxifenilacètic és inferior al valor corresponent en aigua, però aquest és un valor estimat, no experimental.

#### 4.2.2.2. Anàlisi conjunta dels resultats

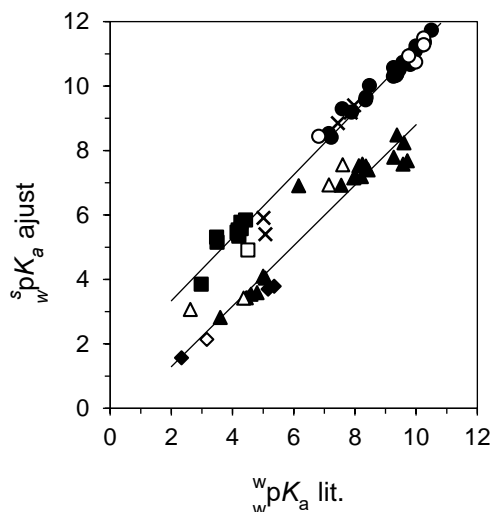
A partir dels resultats esmentats anteriorment, es poden observar algunes tendències comunes per als diferents tipus de compostos estudiats. Per una banda, és evident que el  $pK_a$  en la fase mòbil ( ${}^s_pK_a$ ) està relacionat amb el  $pK_a$  en aigua ( ${}^w_pK_a$ ): augmenta per als grups àcids i disminueix per als grups bàsics. A la Figura 33 es representen els valors  ${}^s_pK_a$ , obtinguts dels ajusts de les equacions 41 - 42, en front dels valors de  ${}^w_pK_a$  de la literatura. Es poden observar dues rectes, una per a àcids i una altra per a bases. Les correlacions obtingudes es presenten en l'equació 62 per a àcids neutres i 63 per a bases neutres:

$${}^s_pK_a = 0.978(\pm 0.019){}^w_pK_a + 1.382(\pm 0.145)$$

$$n = 35 \quad R^2 = 0.988 \quad SD = 0.272 \quad F = 2702 \quad \text{(Equació 62)}$$

$${}^s_pK_a = 0.938(\pm 0.053){}^w_pK_a - 0.583(\pm 0.383)$$

$$n = 23 \quad R^2 = 0.937 \quad SD = 0.547 \quad F = 314 \quad \text{(Equació 63)}$$



**Figura 33.** Valors de  $pK_a$  en la fase mòbil ( $^s pK_a$ ) vs. valors de  $pK_a$  en aigua ( $^w pK_a$ ) obtinguts de la literatura. Àcids: (●) fenols, (■) àcids carboxílics, (×) altres àcids, (○) fenols amb valors  $^w pK_a$  estimats, (□) àcids carboxílics amb valors  $^w pK_a$  estimats.

Bases: (◆) piridines, (▲) amines, (◇) piridines amb valors  $^w pK_a$  estimats, (△) piridines amb valors  $^w pK_a$  estimats.

El valor del pendent de la correlació mesura la "resolució de la força àcida" dels compostos en el solvent de la fase mòbil en relació amb l'aigua pura (pendent igual a la unitat), és a dir, la capacitat del solvent per a diferenciar les acidesses dels diferents compostos [155]. L'ordenada a l'origen de la correlació està relacionada amb les diferències de basicitat, les constants dielèctriques i les interaccions específiques de solvatació del solut (per exemple un enllaç d'hidrogen) entre la fase mòbil i l'aigua pura [142]. Els valors de les dues pendents són propers a 1, el que significa que les interaccions específiques de solvatació dels compostos amb la fase mòbil estudiada (40 % acetonitril) són similars a les interaccions amb aigua [142]. Pel que fa a l'ordenada a l'origen, com era d'esperar, és positiva per als àcids neutres i negativa per als àcids catiónics (bases neutres protonades). Les interaccions de les constants dielèctriques només són significatives per a la dissociació dels àcids neutres a causa del canvi de les càrregues en el procés de dissociació: un àcid neutre no està carregat, però l'anió dissociat més el catió hidrogen solvatat tenen una càrrega negativa i una positiva, respectivament. En canvi, la constant dielèctrica

del solvent pràcticament no afecta a la dissociació de l'àcid catiònic monocarregat (una càrrega positiva) que dona lloc a una base neutra més el catió hidrogen solvatat (també una càrrega positiva). Atès que les interaccions específiques de solvatació són similars en un 40 % d'acetonitril i en aigua pura (valors del pendent proper a la unitat), el valor negatiu de l'ordenada a l'origen de les bases s'hauria d'atribuir a una basicitat superior del 40 % d'acetonitril en comparació a l'aigua pura. La constant dielèctrica del 40 % d'acetonitril és molt inferior a la de l'aigua i les interaccions electrostàtiques desfavoreixen la solvatació dels ions i augmenten el  $pK_a$  dels àcids neutres. Aquest efecte supera l'efecte del canvi de basicitat negatiu, per tant, els àcids neutres són més dèbils en un 40 % d'acetonitril i el gràfic presenta una ordenada a l'origen positiva.

Per una altra banda, s'espera que la retenció de les formes iòniques estigui relacionada amb la retenció de les corresponents formes neutres i per a provar aquest supòsit simplement es representen els temps de retenció dels ions monocarregats en front dels temps de retenció de les corresponents formes neutres (Figura 34). Es poden veure clarament dues línies rectes, una per a anions a partir d'àcids neutres i una altra per a cations a partir de bases neutres. Les equacions de correlació són les següents:

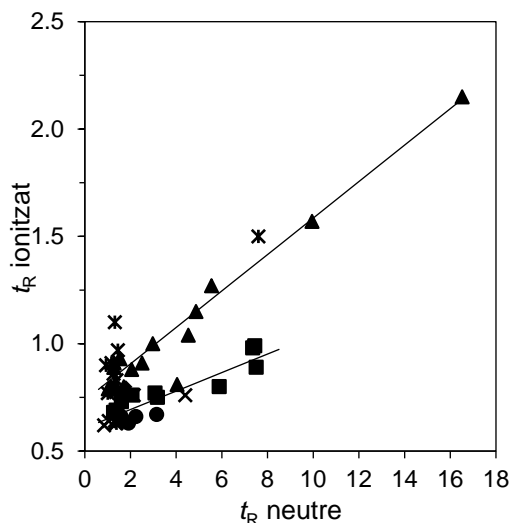
$$t_{R_{A^-}} = 0.043(\pm 0.004)t_{R_{HA}} + 0.607(\pm 0.017)$$

$$n = 24 \quad R^2 = 0.775 \quad SD = 0.051 \quad F = 76 \quad \textbf{(Equació 64)}$$

$$t_{R_{HA^+}} = 0.085(\pm 0.006)t_{R_A} + 0.740(\pm 0.026)$$

$$n = 26 \quad R^2 = 0.908 \quad SD = 0.097 \quad F = 237 \quad \textbf{(Equació 65)}$$

Els valors del pendent i l'ordenada a l'origen de la correlació de les bases són més alts que els dels àcids, a més la retenció dels cations és més gran que la retenció dels anions. Aquest fet també es pot veure directament a partir de les retencions dels amfòlits a la Taula 25.



**Figure 34.** Retenció dels ions monocarregats vs. els temps de retenció de les corresponents formes neutres. Símbols com la Figura 33. (\*) Soluts dipròtics.

Les correlacions 64 i 65 proporcionen una altra evidència del diferent comportament del temps mort dels anions, cations i formes neutres. Inicialment, s'utilitza com a temps mort 0.65, 0.83 i 0.83 min per a les tres formes, respectivament. A continuació, reemplaçant en les dues equacions el temps de retenció de la formes neutres pel temps mort de les formes neutres (0.83 min), s'obtenen temps de retenció de 0.63 min per a anions i 0.77 min per a cations. El temps mort calculat dels anions està en molt bona concordança amb el que es pren inicialment, en canvi el temps calculat per als cations és lleugerament inferior. Aquest últim punt suggereix que el temps mort dels cations pot ser lleugerament inferior al temps mort dels compostos neutres (0.83 min), però clarament superior al dels anions (0.65 min). De fet, les bases més polars mostren temps de retenció dels seus cations en un interval de 0.77-0.83 min (Taula 25).

Les dues correlacions anteriors també proporcionen una eina útil per calcular el temps de retenció de les formes iòniques dels compostos lleugerament bàsics ( ${}^w pK_a < 4$ ) o lleugerament àcids ( ${}^w pK_a > 8$ ) que no s'han pogut estimar directament a partir de l'ajust de les equacions (41) o (42), i per els quals s'ha assumit inicialment 0.65 min per anions i 0.83 min per a cations. Per tant, es recalculen els ajusts de les Eqs. (41) o (42) utilitzant aquestes noves estimacions i els resultats es presenten a la Taula 26.

**Taula 26.** Paràmetres ( $\pm$ SD) i estadístiques obtinguts de l'ajust del temps de retenció al pH de la fase mòbil d'àcids i bases amb valors de  $pK_a$  massa baixos i massa alts per estimar la retenció de la forma iònica a partir de l'ajust. La retenció es va estimar a partir de les correlacions 64 i 65. Z és la càrrega de les forma més dissociada del compost.

	Paràmetres d'ajust					Estadístiques			
	Z	$t_{R_{H_2A^{z+2}}}$	$t_{R_{HA^{z+1}}}$	$t_{R_{A^z}}$	$^s pK_{a1}$	$^s pK_{a2}$	R <sup>2</sup>	SD	F
Morfina	-1	0.86±0.04	1.26±0.08	0.66	7.53±0.61	10.29±0.30	0.933	0.06	9
Piroxicam	-1	0.92	2.14±0.15	0.76±0.08	1.61±0.38	5.40±0.26	0.981	0.13	34
2-Isopropil-5-metilfenol (Timol)	-1	-	5.41±0.02	0.84	11.71±0.05	-	0.952	0.06	80
2-Naftol	-1	-	2.49±0.01	0.71	10.70±0.03	-	0.996	0.03	1016
3-Metilfenol (m-Cresol)	-1	-	1.74±0.01	0.68	11.23±0.03	-	0.992	0.01	478
4-Bromofenol	-1	-	2.29±0.01	0.71	10.27±0.05	-	0.997	0.03	1357
4-Cloro-3-metilfenol	-1	-	2.73±0.01	0.72	10.52±0.03	-	0.997	0.03	1413
4-Clorofenol	-1	-	2.08±0.01	0.70	10.34±0.05	-	0.996	0.03	995
4-Etilfenol	-1	-	2.34±0.01	0.71	11.25±0.04	-	0.979	0.03	184
4-Hidroxifenilacetamida	-1	-	0.94±0.01	0.65	10.77±0.12	-	0.933	0.02	55
4-Metilfenol (p-Cresol)	-1	-	1.73±0.01	0.68	11.33±0.03	-	0.989	0.01	357
Alcohol 4-hidroxibenzílic	-1	-	0.95±0.01	0.65	10.98±0.11	-	0.916	0.02	43
Capsaïcina	-1	-	5.61±0.03	0.85	10.90±0.02	-	0.996	0.06	1132
Catecol	-1	-	1.11±0.01	0.65	10.52±0.08	-	0.982	0.02	216
Estradiol	-1	-	3.02±0.02	0.74	11.35±0.04	-	0.976	0.04	161
Estriol	-1	-	1.22±0.01	0.66	11.49±0.08	-	0.921	0.01	47
Estrona	-1	-	4.04±0.02	0.78	11.26±0.04	-	0.983	0.05	228
Fenol	-1	-	1.41±0.01	0.67	11.09±0.04	-	0.988	0.01	320
Resorcinol	-1	-	1.02±0.01	0.65	10.69±0.05	-	0.990	0.01	413
Benzil nicotinat	0	-	1.01	3.15±0.02	2.21±0.04	-	0.993	0.04	595

L'efecte de la correcció en l'ajust és molt petit. Les correccions més grans són per al timol i la capsaïcina per als quals la retenció de l'anió es mou des de 0.65 fins a 0.84-0.85 min. Tots els altres paràmetres d'ajust segueixen sent molt similars als de les Taules 23-25 dins de l'error estàndard de l'ajust.

### **4.2.3. Permeabilitat skin PAMPA**

La permeabilitat skin PAMPA mesurada (permeabilitat efectiva) es pot expressar, negligint l'efecte de la capa aquosa, com a funció del pH del compartiment donador a través d'una equació similar a l'equació 9:

$$P_e = \frac{P_{e_{HA}} + P_{e_A} \cdot 10^{(pH - pK'_a)}}{1 + 10^{(pH - pK'_a)}} \quad \text{(Equació 66)}$$

On  $P_e$  és la permeabilitat efectiva,  $P_{e_{HA}}$  i  $P_{e_A}$  són la permeabilitat de la forma protonada i no protonada del solut monoprotic, respectivament (les càrregues s'ometen per simplicitat), i  $pK'_a$  és la constant de dissociació àcid-base aparent, és a dir, la constant de dissociació del solut en el medi de dissolució en particular i en les condicions experimentals donades. L'equació 66 és suficient per tots els casos estudiats en aquest apartat. En forma logarítmica s'obté la forma següent:

$$\log P_e = \log \left( \frac{10^{\log P_{e_{HA}}} + 10^{\log P_{e_A}} \cdot 10^{(pH - pK'_a)}}{1 + 10^{(pH - pK'_a)}} \right) \quad \text{(Equació 67)}$$

Els perfils de la permeabilitat skin PAMPA en front del pH de compostos ionitzables s'ajusten a l'equació 67 i aquest ajust proporciona la permeabilitat de la forma neutra i la iònica i el valor de  $pK'_a$  del fàrmac en la solució donadora.

#### **4.2.3.1. Variació de la permeabilitat skin PAMPA amb el pH de la solució donadora**

Les dades de permeabilitat efectiva skin PAMPA de 30 compostos de naturalesa àcid-base s'ajusten a diferents valors de pH (entre 3 i 10) mitjançant l'aplicació de l'equació 67.

Primer de tot, es presenten a través de la Taula 27 i la Figura 35, els resultats obtinguts per als àcids monoprotics. Aquesta taula mostra els paràmetres d'ajust obtinguts mitjançant l'aplicació de l'equació 67 i els paràmetres estadístics associats.



**Taula 27.** Paràmetres ( $\pm$ SD) i estadístiques obtinguts de l'ajust de la permeabilitat skin PAMPA efectiva al pH de la solució donadora d'àcid monoprotètics.

Àcids monoprotètics	Paràmetres d'ajust			Estadístiques		
	$\log P_{e_{HA}}$	$\log P_{e_{A^-}}$	$pK'_a$	$R^2$	SD	F
Àcid 2-hidroxibenzoic (àcid salicílic)	-4.42 $\pm$ 0.11	-6.09 $\pm$ 0.02	2.85 $\pm$ 0.15	0.998	0.03	657
Àcid benzoic	-4.81 $\pm$ 0.04	-5.87 $\pm$ 0.03	4.13 $\pm$ 0.11	0.996	0.04	253
Diclofenac	-3.76 $\pm$ 0.02	-5.90 $\pm$ 0.03	4.42 $\pm$ 0.03	1.000	0.02	2866
Flurbiprofèn	-3.65 $\pm$ 0.02	-6.04 $\pm$ 0.04	4.25 $\pm$ 0.04	1.000	0.03	2660
Ibuprofèn	-3.59 $\pm$ 0.06	-5.45 $\pm$ 0.08	4.38 $\pm$ 0.12	0.996	0.07	253
Indometacina	-4.35 $\pm$ 0.05	-5.86 $\pm$ 0.04	3.98 $\pm$ 0.10	0.997	0.05	351
Ketorolac	-5.05 $\pm$ 0.04	-6.20 $\pm$ 0.01	3.05 $\pm$ 0.07	0.999	0.01	1650
Naproxèn	-4.18 $\pm$ 0.01	-5.99 $\pm$ 0.02	4.29 $\pm$ 0.02	1.000	0.01	6087
Warfarina	-4.63 $\pm$ 0.02	-5.80 $\pm$ 0.02	4.54 $\pm$ 0.06	0.999	0.03	778

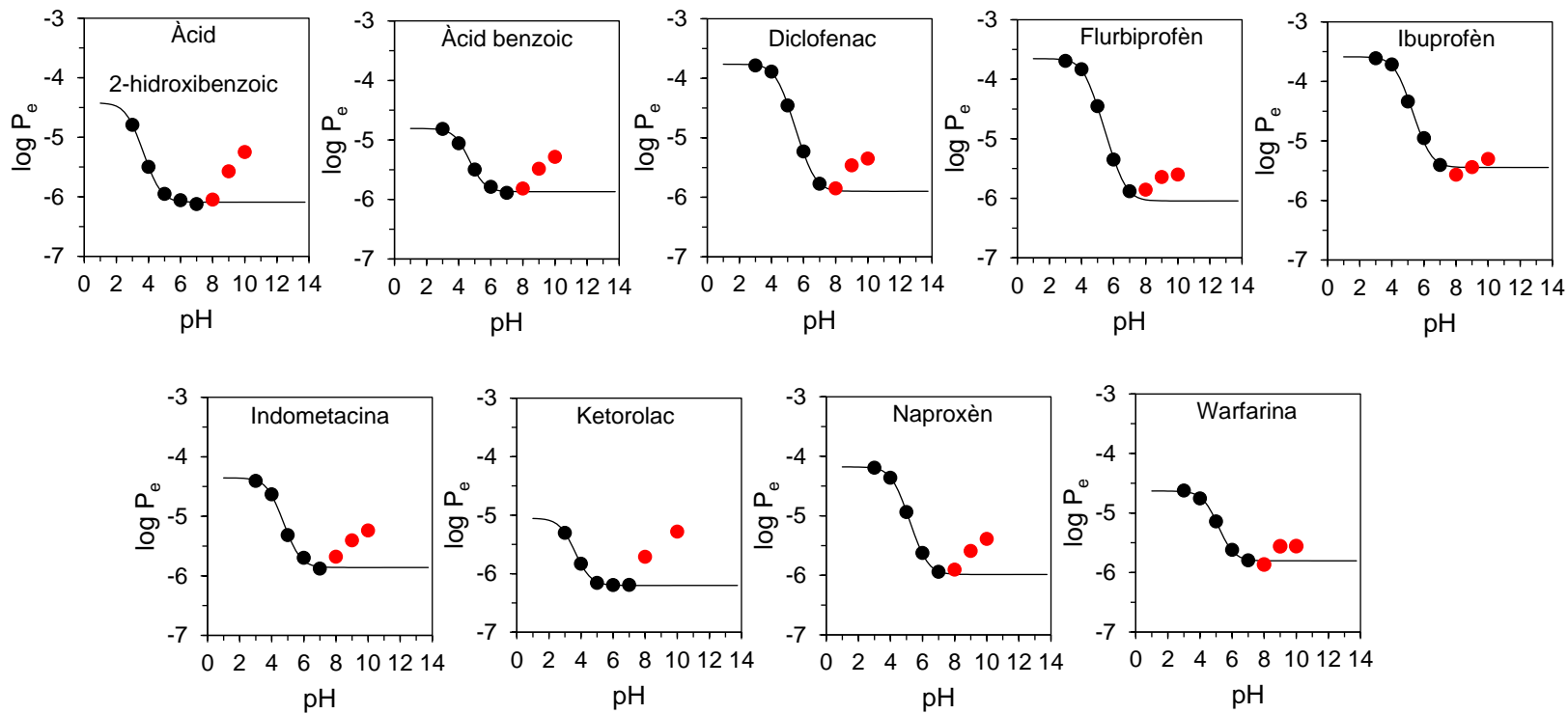


Figura 35. Perfils del logaritme de la permeabilitat skin PAMPA efectiva vs. pH de la solució donadora d'àcids monopròtics.

En els gràfics anteriors es pot observar que els punts a pH 9 i 10, i en alguns casos pH 8, mostren valors anòmals. Això és degut possiblement a un problema de la integritat de la membrana artificial a valors de pH bàsics. Per a l'ajust de les dades de permeabilitat efectiva dels àcids monopròtics en front del pH no s'han tingut en compte els valors a pH 8, 9 i 10. Sense aquests punts igualment hi ha suficients dades per realitzar els ajustos, no obstant, els punts s'han representat igualment en color vermell.

La Taula 27 mostra molt bones estadístiques en tots els casos. Els valors del logaritme de permeabilitat de les formes neutres van de -3.6 fins a -5. Per les formes iòniques els valors oscil·len entre -5.5 i -6.2. Es pot veure que la relació de la permeabilitat entre la forma neutra i la ionitzada és més petita quan més polar és el compost (àcid benzoic i ketorolac,  $\log P_{o/w} < 2$ ) i més gran quan més hidrofòbic (àcid 2-hidroxibenzoic, diclofenac, flurbiprofèn, ibuprofèn, indometacina, naproxèn i warfarina,  $\log P_{o/w} > 2$ ).

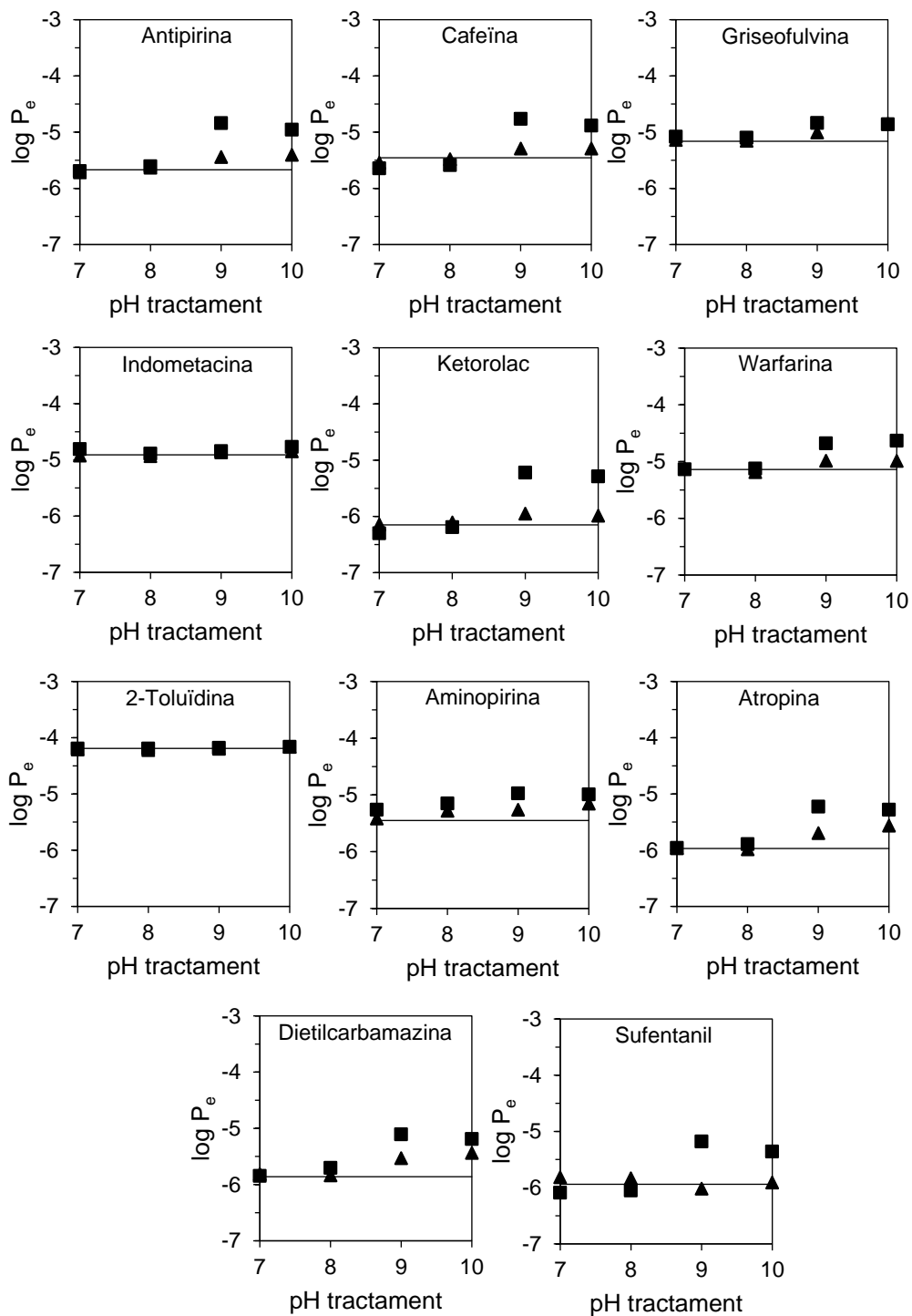
Pel que fa a les constants de dissociació àcid-base dels àcids monopròtics obtingudes a partir de l'ajust són en general bastant semblants als valors de  $pK_a$  amb aigua.

La integritat de la membrana skin PAMPA a pH bàsic s'estudia a través de les mesures de permeabilitat d'11 compostos (3 compostos neutres, 3 àcids i 5 bases). La membrana skin PAMPA s'hidrata amb la solució diluïda de PRISMA HT™ a pH 7, 8, 9 i 10 durant 30 min i 4 h. A continuació, es du a terme un assaig de permeació estàndard amb un temps d'incubació de 4 hores i amb agitació, i a pH 5 en el compartiment donador (valor de pH aproximadament al de superfície de la pell) i pH 7.4 en el compartiment acceptor. Simultàniament es realitzen assajos de permeació a pH 5 sense tractament previ de la membrana a pH bàsic.

Els resultats obtinguts es presenten en la Taula 28 que mostra els valors en forma logarítmica de la permeabilitat efectiva skin PAMPA amb i sense tractament previ de la membrana a pH bàsic. Es realitza una representació gràfica d'aquests valors en funció del pH de tractament (Figura 36). Cada subfigura correspon a un compost i la línia recta dins de la figura és el valor del  $\log P_e$  amb la membrana no tractada.

**Taula 28.** Permeabilitat efectiva de diferents compostos àcid-base sense i amb tractament previ de la membrana a pH 7, 8, 9 i 10.

Soluts	Temps de tractament	log P <sub>e</sub>				
		Sense tractar	Tractament a pH 7	Tractament a pH 8	Tractament a pH 9	Tractament a pH 10
Antipirina	30 min		-5.71	-5.63	-5.44	-5.40
	4 h	-5.67	-5.69	-5.61	-4.84	-4.96
Cafeïna	30 min		-5.54	-5.48	-5.29	-5.29
	4 h	-5.46	-5.64	-5.59	-4.76	-4.88
Griseofulvina	30 min		-5.14	-5.15	-5.01	-4.85
	4 h	-5.16	-5.08	-5.10	-4.84	-4.86
Indometacina	30 min		-4.92	-4.93	-4.86	-4.85
	4 h	-4.91	-4.81	-4.89	-4.84	-4.77
Ketorolac	30 min		-6.14	-6.11	-5.95	-5.99
	4 h	-6.15	-6.30	-6.19	-5.22	-5.29
Warfarina	30 min		-5.12	-5.19	-4.99	-4.99
	4 h	-5.14	-5.14	-5.12	-4.68	-4.63
2-Toluïdina	30 min		-4.21	-4.22	-4.20	-4.16
	4 h	-4.19	-4.19	-4.19	-4.18	-4.16
Aminopirina	30 min		-5.42	-5.28	-5.26	-5.15
	4 h	-5.45	-5.26	-5.15	-4.97	-4.99
Atropina	30 min		-5.96	-5.98	-5.69	-5.56
	4 h	-5.97	-5.96	-5.89	-5.23	-5.28
Dietilcarbamazina	30 min		-5.82	-5.84	-5.53	-5.44
	4 h	-5.86	-5.85	-5.70	-5.11	-5.19
Sufentanil	30 min		-5.82	-5.84	-6.02	-5.91
	4 h	-5.94	-6.09	-6.05	-5.18	-5.36



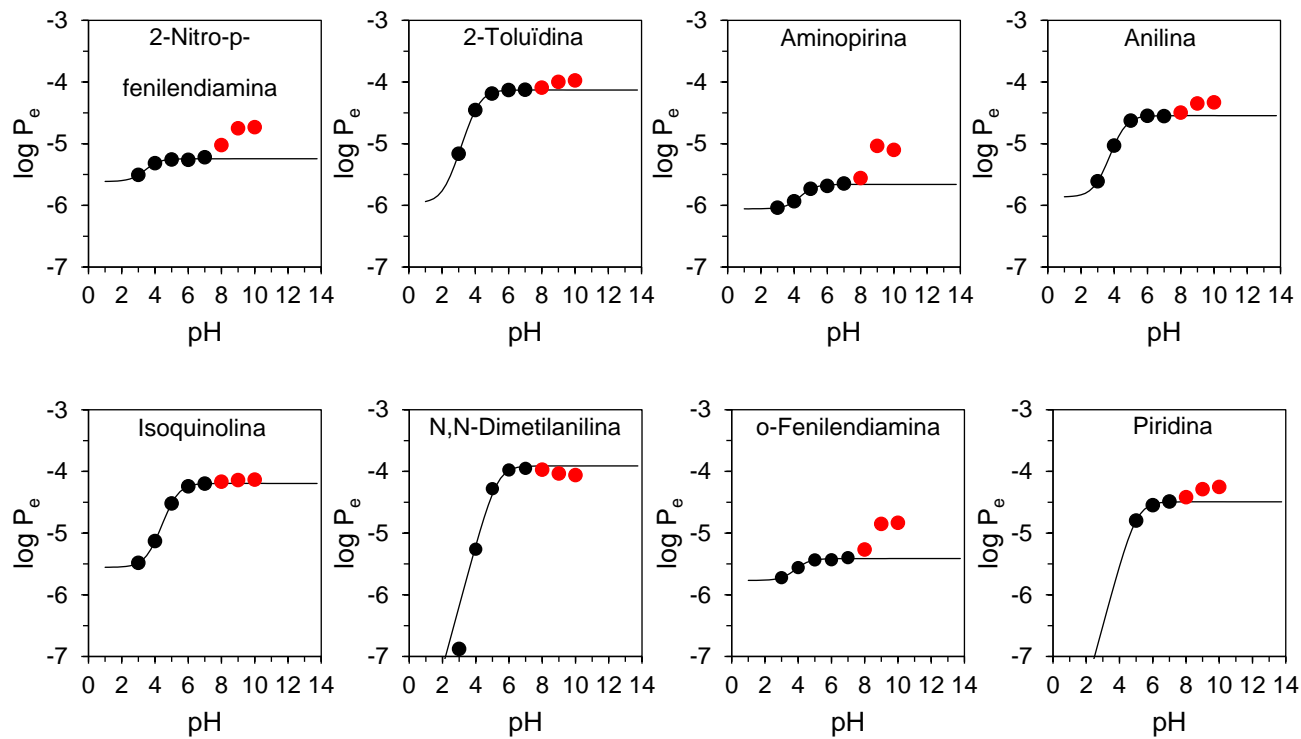
**Figura 36.** Permeabilitat efectiva en funció del pH de tractament de la membrana.

Temps de tractament: (▲) 30 minuts (■) 4 hores.

En general, l'augment dels valors de permeabilitat a pH 9 i 10 assenyalen la falta d'integritat de la membrana en aquest interval de pH i en alguns casos, com l'aminopirina, ja comença a notar-se a pH 8. Com que la composició de la membrana skin PAMPA és similar a la del estrat corni de la pell humana, és possible que l'explicació d'aquest comportament sigui a causa d'una limitació en la funció de barrera. Els àcids grassos que es troben a les bicapes lipídiques de la membrana de la pell humana existeixen en forma neutra o iònica, depenent del pH. El pH 5 de la superfície de l'estrat corni provoca una mínima repulsió entre els grups de cap de les bicapes i això promou una estructura de bicapa. Un augment del pH, en canvi, pot augmentar la repulsió entre els grups de cap, pertorbant la bicapa lipídica i per tant, perjudicar la funció de barrera [156].

En la Figura 36 es pot observar que, en la majoria dels casos, els valors de  $\log P_e$  a pH 9 i 10 tenen un augment tant a 30 minuts com a 4 hores de tractament, tot i que a 4 hores hi ha un augment més pronunciat. Això vol dir que als 30 minuts d'incubació la integritat de la membrana ja es veu afectada pel pH bàsic. La griseofulvina i la warfarina tenen un lleuger augment a pH 9 i 10. Els valors de la indometacina, la 2-Toluïdina i el sufentanil, en canvi, es mantenen constants. Com a tendència general, sembla que aquest problema és més important quan menys permeable és el compost ( $\log P_e$  per sota de -5) independentment de la naturalesa i la ionització del solut. En conclusió, tot i que la solució de tampó universal PRISMA HT™ permeti treballar en l'interval de pH entre 3 i 10, és aconsellable no sobrepassar de pH 8 per tal de no danyar la membrana skin PAMPA.

Respecte a la variació de la permeabilitat amb el pH de les bases monoprotòniques, primer es presenten els perfils d'aquelles amb valors de  $pK_a$  en aigua inferiors a 7 (Figura 37). Els paràmetres d'ajust obtinguts per a aquestes bases, entre elles amines i piridines, mitjançant l'aplicació de l'equació 67 es donen a la Taula 29.



**Figura 37** Perfils del logaritme de la permeabilitat skin PAMPA efectiva vs. pH de la solució donadora de bases monopròtiques amb valors de  $pK_a$  amb aigua inferiors a 7.

**Taula 29.** Paràmetres ( $\pm$ SD) i estadístiques obtinguts de l'ajust de la permeabilitat skin PAMPA efectiva al pH de la solució donadora de bases monoprotòniques amb valors de  $pK_a$  en aigua inferior a 7.

Bases monoprotòniques	Paràmetres d'ajust			Estadístiques		
	$\log P_{eA}$	$\log P_{e_{HA^+}}$	$pK'_a$	$R^2$	SD	F
2-Nitro-p-fenilendiamina	-5.24 $\pm$ 0.01	-5.61 $\pm$ 0.08	3.59 $\pm$ 0.25	0.983	0.02	60
2-Toluidina	-4.13 $\pm$ 0.01	-5.96 $\pm$ 0.14	4.07 $\pm$ 0.03	1.000	0.01	4477
Aminopirina	-5.66 $\pm$ 0.01	-6.06 $\pm$ 0.02	4.56 $\pm$ 0.10	0.995	0.02	218
Anilina	-4.55 $\pm$ 0.01	-5.86 $\pm$ 0.02	4.38 $\pm$ 0.02	1.000	0.01	4831
Isoquinolina	-4.19 $\pm$ 0.001	-5.55 $\pm$ 0.001	5.09 $\pm$ 0.002	1.000	0.001	871115
N,N-dimetilanilina	-3.91 $\pm$ 0.06	-	5.27 $\pm$ 0.10	0.989	0.08	185
o-Fenilendiamina	-5.41 $\pm$ 0.01	-5.77 $\pm$ 0.03	4.02 $\pm$ 0.12	0.993	0.02	138
Piridina	-4.49 $\pm$ 0.01	-	5.01 $\pm$ 0.04	0.996	0.01	271

En aquest cas, també es pot observar un augment de la permeabilitat efectiva a pH 8 i sobretot a pH 9 i 10. Aquests valors tampoc s'han utilitzat per ajustar les dades en front del pH, no obstant això, també s'han representat en els gràfics com a punts de color vermell.

La Taula 29 mostra molt bones estadístiques per a la majoria dels casos. Els valors de permeabilitat de les formes neutres van de -3.9 fins a -5.7. Per a les formes iòniques els valors oscil·len entre -5.5 i -6. La forma de les corbes té un comportament similar a la dels àcids monoprotònics, quan més polar és el compost menys diferència hi ha entre la permeabilitat de la forma neutra i la ionitzada (2-nitro-p-fenilendiamina, aminopirina, anilina i o-fenilendiamina,  $\log P_{o/w} < 1$ ). A pH baixos, la piridina i la N,N-dimetilanilina tenen permeabilitats moltes baixes, és a dir, pràcticament valors de zero, per tant els gràfics s'ajusten a valors de  $P_{e_{HA^+}} = 0$ . En aquests perfils només es poden determinar els valors de permeabilitat de la forma neutra.

Els valors de  $pK'_a$  de l'ajust per a aquest tipus de bases monoprotòniques també són bastant semblants als valors de  $pK_a$  amb aigua.

Amb relació a les bases monoprotòniques amb valors de  $pK_a$  en aigua superiors a 7, la corresponent permeabilitat a pH 8, 9 i 10 es pot trobar afectada per la falta d'integritat de la membrana a aquests valors de pH, per tant, no es poden considerar valors

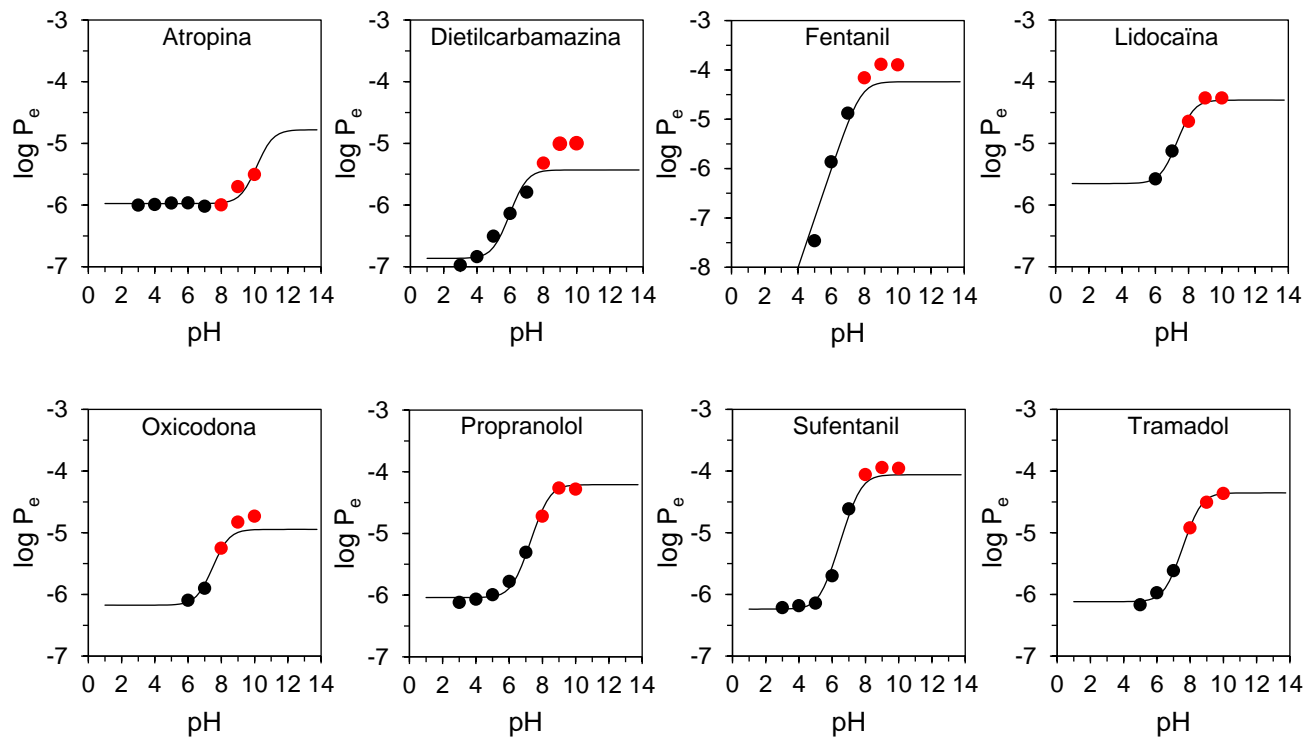


fiables. Si no es tenen en compte els punts experimentals a pH 8, 9 i 10, la majoria de perfils no tenen suficients punts per ser ajustats a l'equació 67 i, per tant, no es poden obtenir les permeabilitats de les formes neutres. Tanmateix, els valors de les formes neutres es poden estimar a partir de l'equació 61, establerta en l'apartat 4.1.3.1., la qual relaciona els valors de permeabilitat skin PAMPA amb la retenció cromatogràfica i el volum de McGowan per a soluts neutres i espècies neutres. Per tant, en aquest cas l'ajust de les dades de permeabilitat efectiva al pH de la solució donadora mitjançant l'aplicació de l'equació 67 s'ha realitzat utilitzant aquestes estimacions (valors a la Taula 30). Els valors a pH 8, 9 i 10 es representen com a punts de color vermell. Els resultats es mostren a la Taula 30 i les Figures 38.

**Taula 30.** Paràmetres ( $\pm$ SD) i estadístiques obtinguts de l'ajust de la permeabilitat skin PAMPA efectiva al pH de la solució donadora de bases monoprotòniques amb  $pK_a$  superior a 7. La permeabilitat de la forma neutra s'ha estimat a partir de l'equació 61.

Bases monoprotòniques	Paràmetres d'ajust			Estadístiques		
	$\log P_{eA}^*$	$\log P_{e_{HA}^+}$	$pK_a'$	$R^2$	SD	F
Atropina	-4.78	-5.98 $\pm$ 0.03	10.71 $\pm$ 0.12	0.858	0.08	36
Dietilcarbamazina	-5.43	-6.86 $\pm$ 0.19	6.69 $\pm$ 0.36	0.894	0.28	51
Fentanil	-4.24	-	7.77 $\pm$ 0.21	0.939	0.35	77
Lidocaïna	-4.30	-5.65 $\pm$ 0.09	7.98 $\pm$ 0.10	0.989	0.07	281
Oxicodona	-4.95	-6.17 $\pm$ 0.19	8.09 $\pm$ 0.27	0.946	0.17	52
Propranolol	-4.21	-6.03 $\pm$ 0.04	8.20 $\pm$ 0.08	0.991	0.08	698
Sufentanil	-4.06	-6.24 $\pm$ 0.08	7.57 $\pm$ 0.11	0.989	0.12	530
Tramadol	-4.35	-6.12 $\pm$ 0.04	8.44 $\pm$ 0.06	0.996	0.05	1038

\*Permeabilitat de la forma neutra calculada a partir de l'equació 61



**Figura 38.** Perfils del logaritme de la permeabilitat skin PAMPA efectiva vs. pH de la solució donadora de bases monoprotòniques amb valors de  $pK_a$  amb aigua superiors a 7.

Els gràfics anteriors mostren que la dietilcarbamazina presenta valors experimentals a pH 9 i 10 per sobre del valor estimat de  $\log P_e$  per a la forma neutra, possiblement per la falta d'integritat de la membrana a pH bàsics. El fentanil i l'oxicodona també presenten valors una mica per sobre. El perfil del fentanil s'ha ajustat a  $P_{e_{HA^+}} = 0$ , ja que el valor de la permeabilitat a pH àcid és pràcticament zero. Per a la resta de compostos, els perfils s'ajusten força bé als punts experimentals.

Per últim, s'obtenen els paràmetres d'ajust de diversos soluts dipròtics i els resultats es presenten a la Taula 31 i la Figura 39. Els compostos estudiats inclouen dos amfòlits i tres bases dipròtiques.

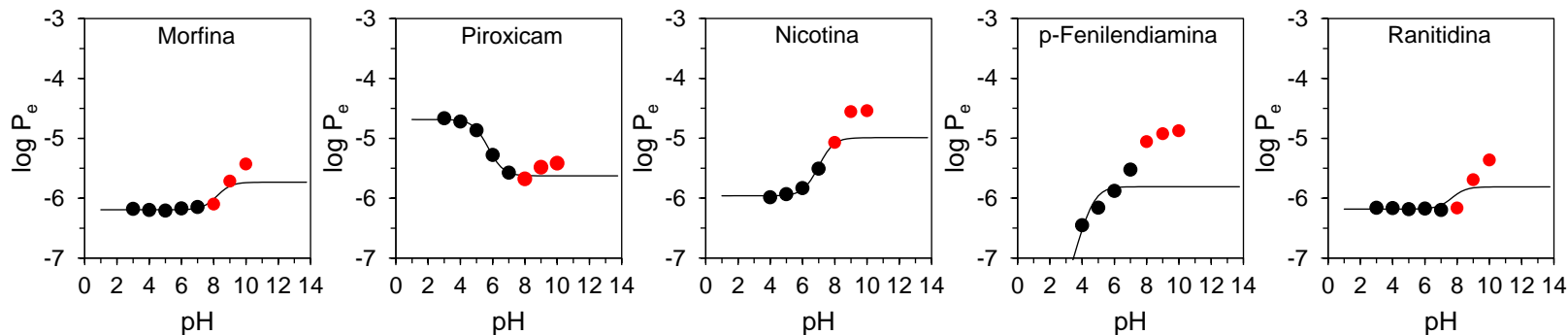
Els perfils obtinguts mostren que tots els soluts dipròtics estudiats es comporten com a monopròtics ja que només s'observa un salt de  $pK_a$ . Els valors de la permeabilitat de les formes neutres de la morfina, la nicotina, la p-fenilendiamina i la ranitidina també s'estimen a partir de l'equació 61. A pH àcids la p-fenilendiamina té permeabilitats molts baixes, és a dir, pràcticament valors de zero, per tant el gràfic s'ajusta a valors de  $P_{e_{HA^{z+1}}} = 0$  i només es pot determinar el valor de permeabilitat de la forma neutra. El perfil de la ranitidina no es pot definir bé ja que el valor estimat de la permeabilitat de l'espècie neutra és semblant a la de l'espècie iònica. Això significa que és molt poc permeable. En el cas del piroxicam no s'estimen els valors de  $\log P_{e_{HA^{z+1}}}$  ja que es comporta com un àcid monopròtic. Com la resta d'àcids analitzats, el piroxicam mostra un augment de la permeabilitat efectiva a pH 9 i 10. La morfina, la nicotina, la p-fenilendiamina i la ranitidina presenten valors experimentals a pH 9 i 10 per sobre dels valors estimats de la forma neutra. Aquests valors queden justificats per l'efecte de la degradació de la membrana a pH bàsics.

Pel que fa a les bases monopròtiques amb valors de  $pK_a$  amb aigua superiors a 7 i els soluts dipròtics, en alguns casos els valors estimats de  $\log P_e$  s'ajusten bé a les dades experimentals, no obstant són simples aproximacions. A més l'efecte de la degradació de la membrana es troba sempre present a pH bàsics.

**Taula 31.** Paràmetres ( $\pm$ SD) i estadístiques obtinguts de l'ajust de la permeabilitat skin PAMPA efectiva al pH de la solució donadora de soluts dipròtics. Z és la càrrega de les forma més dissociada del compost.

Soluts dipròtics	z	Paràmetres d'ajust					Estadístiques		
		$\log P_{e_{H_2A^{z+2}}}$	$\log P_{e_{HA^{z+1}}}$	$\log P_{e_{A^z}}$	$pK'_{a_1}$	$pK'_{a_2}$	$R^2$	SD	F
Morfina	-1	-6.19 $\pm$ 0.07	<b>-5.75</b>		8.43 $\pm$ 0.55		0.786	0.14	22
Piroxicam	-1		<b>-4.69<math>\pm</math>0.02</b>	-5.63 $\pm$ 0.03		5.25 $\pm$ 0.06	0.998	0.02	639
Nicotina	0		-5.96 $\pm$ 0.19	<b>-4.99</b>		7.47 $\pm$ 0.52	0.829	0.28	24
p-Fenilendiamina	0		-	<b>-5.81</b>		4.63 $\pm$ 0.44	0.575	0.58	9
Ranitidina	0		-6.18 $\pm$ 0.15	<b>-6.03</b>		7.85 $\pm$ 3.50	0.159		

La permeabilitat de la forma neutra està ressaltada amb negreta



**Figura 39.** Perfils del logaritme de la permeabilitat skin PAMPA efectiva vs. pH de la solució donadora de soluts dipròtics.

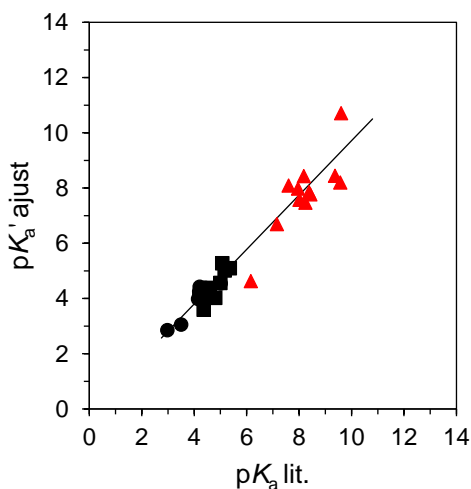
## 4.2.3.2. Anàlisi conjunta dels resultats

A partir dels resultats esmentats en l'apartat 4.2.3.1., en primer lloc es correlacionen els valors de  $pK'_a$  obtinguts dels ajusts de l'equació 67 en front dels valors de la literatura per als àcids monopròtics i les bases monopròtiques amb  $pK_a$  inferior a 7, ja que es consideren els resultats més fiables. Les bases amb  $pK_a$  superior a 7 es representen com a triangles de color vermell però no es tenen en compte per a la correlació. Al contrari que en la retenció cromatografia, on es pot observar una recta per a àcids i l'altra per a bases degut a les diferents interaccions amb la fase mòbil, les constants de dissociació àcid-base determinades en els perfils skin PAMPA-pH mostren una única tendència. La correlació obtinguda es presenta en l'equació 68 i la Figura 40:

$$pK'_a \text{ ajust} = -0.140(\pm 0.560) + 0.985(\pm 0.123)pK_a \text{ lit.}$$

$$n = 18 \quad R^2 = 0.799 \quad SD = 0.308 \quad F = 63$$

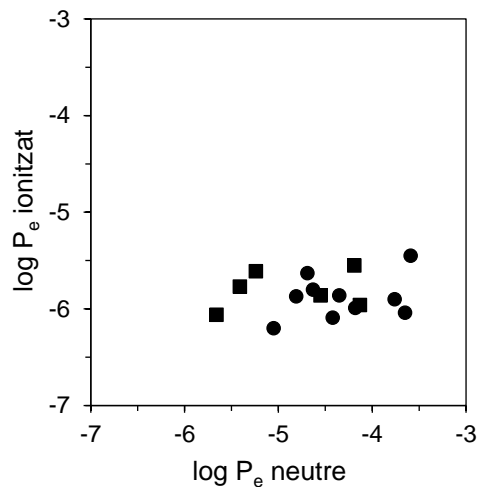
(Equació 68)



**Figura 40.** Valors de  $pK'_a$  dels ajusts dels àcids monopròtics i bases monopròtiques amb  $pK_a$  inferior a 7 vs. valors de  $pK_a$  en aigua obtinguts de la literatura. (●) Àcids (■) Bases (▲) Bases i soluts dipròtics amb  $pK_a$  en aigua superior a 7.

El comportament tant per a àcids com per a bases és el mateix. Els  $pK'_a$  obtinguts de l'ajust tenen una bona correlació amb els  $pK_a$  en aigua ja que els valors del pendent i de l'ordenada a l'origen de la correlació no són significativament diferents de la unitat i zero, respectivament. Els valors de  $pK'_a$  procedents dels ajusts de les bases i soluts dipròtics amb  $pK_a$  en aigua superior a 7 mostren dispersió al voltant de la recta de correlació.

A continuació, es comprova la relació entre la permeabilitat de les formes iòniques i les corresponents formes neutres. En el cas de la retenció cromatogràfica s'han observat clarament dues línies rectes, una per a anions a partir d'àcids neutres i l'altra per a cations a partir de bases neutres. Per tant, es representen les permeabilitats en forma logarítmica de les formes ionitzades en front de les corresponents formes neutres a la Figura 41.



**Figura 41.** Permeabilitat de les formes ionitzades vs. la permeabilitat de les corresponents formes neutres. Símbols com la Figura 40.

La permeabilitat dels anions i cations és més petita que la de les corresponents formes neutres, no obstant, no es veu una relació clara entre les formes neutres i les ionitzades ni en els àcids ni en les bases.

El fet que en la majoria dels casos els valors de permeabilitat de les espècies iòniques no siguin zero, confirmen que aquestes travessen la membrana de pell artificial i ho fan per mitjà dels canals aquosos de paramembrana que es troben a les

membranes skin PAMPA [50]. A més, si es compara l'equació 66 amb l'equació 21, negligint l'efecte de la capa aquosa i traient les inverses, es pot deduir que la permeabilitat de paramembrana ( $P_{para}$ ) correspon la permeabilitat de les espècies iòniques.

D'aquests resultats es pot concloure que els canals aquosos de paramembrana que es troben a les membranes skin PAMPA podrien equivaldre a les vies transcel·lulars (rutes polars) de la pell humana.

### **4.3. ESTABLIMENT DE MODELS D'ESTIMACIÓ DE LA PERMEABILITAT A TRAVÉS DE LA PELL PER ESPÈCIES IÒNIQUES**

Després d'analitzar la influència de la ionització en la propietat biològica de la permeabilitat de la pell i les propietats físico-químiques de la retenció cromatogràfica i la permeabilitat skin PAMPA, els resultats procedents dels ajusts dels perfils propietat-pH s'apliquen en aquest apartat per estendre els models predictius de la permeació de la pell, prèviament establerts i validats per a soluts i espècies neutres, a espècies totalment i parcialment ionitzades.

#### **4.3.1. Model cromatogràfic**

##### **4.3.1.1. Caracterització del sistema Kinetex Evo C18 per a soluts neutres, espècies neutres i espècies iòniques**

La caracterització de la columna Kinetex Evo C18 ha sigut establerta prèviament en l'apartat 4.1.1.1. a través del model de paràmetres de solvatació d'Abraham per a soluts i espècies neutres (equació 22). Com s'ha mencionat a la part introductòria, el model de paràmetres de solvatació d'Abraham es pot ampliar a espècies iòniques mitjançant la incorporació d'uns nous descriptors,  $J^+$  i  $J^-$ , els quals són específics dels cations i anions, respectivament (Equació 23). Per a la nova caracterització del sistema cromatogràfic Kinetex Evo C18, els coeficients ( $c$ ,  $e$ ,  $s$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $v$ ,  $j^+$  i  $j^-$ ) s'obtenen a través d'una regressió lineal múltiple entre els valors  $\log k$  d'espècies neutres i espècies iòniques, i els descriptors moleculars d'Abraham de cada solut (Annex 1).

Els factors de retenció de les espècies iòniques es determinen a partir dels resultats obtinguts en l'apartat 4.2.2.: els temps de retenció de les formes aniòniques i catióniques pures s'aconsegueixen amb l'ajust de les dades dels perfils  $t_{R-w}^{\$pH}$  mitjançant l'aplicació de les equacions 41-42 (resultats a les Taules 23-25), i els temps morts dels anions i cations es calculen a partir de les equacions assolides de les correlacions entre els temps de retenció dels ions monocarregats i els temps de retenció de les corresponents formes neutres (equacions 64 i 65), obtenint temps morts de 0.63 per a anions i 0.77 per a cations. Els temps de retenció de les formes iòniques dels compostos lleugerament bàsics ( $pK_a < 4$ ) o lleugerament àcids ( $pK_a >$



8) també es calculen a partir de les equacions de correlació 64-65 (resultats a la Taula 26).

Els factors de retenció de les espècies iòniques es calculen a través de l'equació 38. Substituint el temps mort pel valor del temps mort dels anions i cations, s'obtenen les expressions següents:

$$k_{\text{anió}} = \frac{t_{R\text{anió}} - t_{M\text{anió}}}{t_{M\text{neutre}}} = \frac{t_{R\text{anió}} - 0.63}{0.83} \quad \text{(Equació 69)}$$

$$k_{\text{catió}} = \frac{t_{R\text{catió}} - t_{M\text{catió}}}{t_{M\text{neutre}}} = \frac{t_{R\text{catió}} - 0.77}{0.83} \quad \text{(Equació 70)}$$

Els factors de retenció en forma logarítmica,  $\log k$ , de 133 soluts i espècies es mostren a la taula següent:

**Taula 32.** Recull de valors de  $\log k$  calculats. En el cas dels soluts i espècies neutres, els factors de retenció es calculen a partir dels temps de retenció experimentals al pH o l'interval de pH on el solut es troba en forma neutra, i en el cas de les espècies anióniques i catióniques, a partir dels resultats de les Taules 23-25. Els valors dels temps de retenció mesurats als diferents valors de pH de la fase mòbil es troben a l'Annex 4.

Soluts	$\log k$
2,4-Diclorofenol	0.446 ± 0.005
2,4-Diclorofenol, anió	-1.316
2-Amino-4-nitrofenol	-0.232 ± 0.070
2-Clorofenol	0.119 ± 0.008
2-Feniletanol	-0.155 ± 0.008
2-Isopropil-5-Metilfenol (timol)	0.743 ± 0.005
2-Isopropil-5-Metilfenol (timol), anió	-0.596
2-Naftol	0.302 ± 0.006
2-Naftol, anió	-1.015
2-Nitrofenol	0.232 ± 0.007
2-Nitrofenol, anió	-1.441
2-Nitro-p-fenilendiamina	-0.426 ± 0.017
2-Toluídina	0.025 ± 0.011
3-Metilfenol (m-cresol)	0.042 ± 0.006
3-Nitrofenol	0.021 ± 0.009
3-Nitrofenol, anió	-1.918
3-Xilè	0.967 ± 0.005
4-Amino-2-nitrofenol	-0.174 ± 0.016
4-Bromofenol	0.242 ± 0.006
4-Bromofenol, anió	-1.015

(Continuació Taula 32)

<b>Soluts</b>	<b>log k</b>
4-Cloro-3-metilfenol (4-cloro-cresol)	0.359 ± 0.006
4-Clorofenol	0.177 ± 0.007
4-Clorofenol, anió	-1.073
4-Etilfenol	0.261 ± 0.008
4-Etilfenol, anió	-1.015
4-Hidroxifenilacetamida	-0.891 ± 0.082
4-Hidroxi-metilfenilacetat	-0.368 ± 0.009
4-Metilfenol (p-cresol)	0.039 ± 0.006
4-Metilfenol (p-cresol), anió	-1.219
4-Nitrofenol	-0.036 ± 0.021
4-Nitrofenol, anió	-1.441
5-Fluorouracil	-1.595 ± 0.691
8-Metoxipsoralè	0.253 ± 0.008
Àcid 2-hidroxibenzoic (àcid salicílic)	-0.035 ± 0.001
Àcid 2-hidroxibenzoic (àcid salicílic), anió	-0.918
Àcid 4-hidroxifenilacètic	-0.670 ± 0.001
Àcid 5,5-dietilbarbitúric (barbital)	-0.564 ± 0.017
Àcid 5-etil-5-fenilbarbitúric (fenobarbital)	-0.198 ± 0.009
Àcid benzoic	-0.183 ± 0.014
Àcid benzoic, anió	-1.140
Alcohol 4-hidroxibenzílic	-0.839 ± 0.062
Alcohol benzílic	-0.290 ± 0.008
Aminopirina	-0.230 ± 0.009
Anilina	-0.163 ± 0.012
Anilina, catió	-1.617
Antipirina	-0.511 ± 0.058
Aspirina (àcid acetilsalicílic)	-0.278 ± 0.034
Aspirina (àcid acetilsalicílic), anió	-1.219
Atrazina	0.302 ± 0.011
Atropina	0.418 ± 0.004
Atropina, catió	-0.556
Benzaldehid	0.087 ± 0.006
Benzè	0.473 ± 0.005
Benzil nicotinat	0.447 ± 0.009
Cafeïna	-0.798 ± 0.062
Capsaïcina	0.761 ± 0.005
Catecol	-0.472 ± 0.024
Clorfeniramina	0.900 ± 0.007
Clorfeniramina, catió	-0.055
Codeïna	-0.065 ± 0.063
Codeïna, catió	-0.714
Cortexolona	0.147 ± 0.010
Corticosterona	0.097 ± 0.011
Cortisona	-0.162 ± 0.013
Cumè	1.171 ± 0.006
Dexametasona	0.034 ± 0.028
Diclofenac	0.894 ± 0.008
Diclofenac, anió	-0.374
Dietilcarbamazina	-0.274 ± 0.069
Digitoxina	0.530 ± 0.011

(Continuació Taula 32)

<b>Soluts</b>	<b>log k</b>
Efedrina	0.158 ± 0.002
Efedrina, catió	-0.877
Escopolamina	-0.257 ± 0.041
Escopolamina, catió	-0.772
Estradiol	0.422 ± 0.007
Estriol	-0.325 ± 0.016
Estrona	0.589 ± 0.007
Etilbenzè	0.960 ± 0.005
Famotidina	-0.821 ± 0.021
Fenol	-0.152 ± 0.010
Fenol, anió	-1.316
Fentanil	1.037 ± 0.004
Fentanil, catió	-0.015
Fluocinonida	0.797 ± 0.008
Flurbiprofèn	0.784 ± 0.008
Flurbiprofèn, anió	-0.688
Griseofulvina	0.379 ± 0.011
Hidrocortisona	-0.222 ± 0.015
Hidroquinona	-0.830 ± 0.072
Hidroxiprogesterona	0.600 ± 0.008
Ibuprofèn	0.906 ± 0.006
Ibuprofèn, anió	-0.503
Indometacina	0.900 ± 0.009
Indometacina, anió	-0.362
Isoquinolina	0.071 ± 0.010
Ketoprofèn	0.434 ± 0.011
Ketoprofèn, anió	-0.772
Ketorolac	0.171 ± 0.023
Ketorolac, anió	-0.804
Lidocaïna	0.647 ± 0.004
Lidocaïna, catió	-0.487
Metil 4-hidroxibenzoat	-0.133 ± 0.008
Metil fenil èter (anisole)	0.427 ± 0.003
Morfina	-0.327 ± 0.004
Morfina, catió	-0.964
N,N-Dimetilanilina	0.587 ± 0.007
N,N-Dimetilanilina, catió	-1.316
Naproxèn	0.454 ± 0.008
Naproxèn, anió	-0.839
Nicotina	-0.132 ± 0.045
Nicotina, catió	-0.617
o-Fenilendiamina	-0.611 ± 0.014
Oxicodona	0.298 ± 0.013
p-Fenilendiamina	-0.891 ± 0.096
Piridina	-0.441 ± 0.006
Piroxicam	0.191 ± 0.002
Piroxicam, anió	-0.804
Prednisolona	-0.261 ± 0.017
Pregnenolona	1.037 ± 0.005
Progesterona	1.026 ± 0.008

(Continuació Taula 32)

Soluts	log <i>k</i>
Propranolol	0.748 ± 0.001
Propranolol, catió	-0.219
Ranitidina	-0.384 ± 0.124
Ranitidina, catió	-0.772
Resorcinol	-0.640 ± 0.023
Sufentanil	1.274 ± 0.009
Sufentanil, catió	0.222
Testosterona	0.441 ± 0.009
Toluè	0.718 ± 0.005
Tramadol	0.688 ± 0.002
Tramadol, catió	-0.338
Warfarina	0.636 ± 0.009
Warfarina, anió	-0.804

A partir de la regressió lineal múltiple entre log *k* i els 7 descriptors moleculars d'Abraham de cada solut, l'equació del model de paràmetres de solvatació per soluts neutres, espècies neutres i iòniques (equació 23) es converteix en:

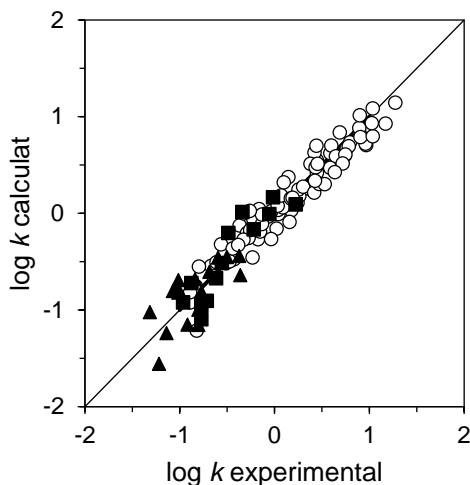
$$\log k = -0.479(\pm 0.047) + 0.135(\pm 0.054)E - 0.400(\pm 0.033)S - 0.429(\pm 0.045)A - 1.260(\pm 0.053)B + 1.514(\pm 0.052)V - 0.241(\pm 0.046)J^+ + 1.181(\pm 0.071)J^-$$

$$n = 123 \quad R^2 = 0.931 \quad SD = 0.166 \quad F = 220 \quad \textbf{(Equació 71)}$$

Dels 133 soluts i espècies s'exclouen de la regressió el 2,4-diclorofenol (anió), 3-nitrofenol (anió), anilina (catió), N,N-dimetilanilina (catió), 2-nitrofenol (anió), 4-nitrofenol (anió), oxicodona, 5-fluorouracil, warfarina (anió) i 4-metilfenol (anió) ja que els seus residus estàndard són superiors a 2.5 en valor absolut (*outliers*). Aquesta equació mostra coeficients molts similars a l'equació prèvia derivada dels valors de log *k* per soluts i espècies neutres (Equació 44). Per contra, els paràmetres estadístics de l'equació 71 no són tan bons com els de l'equació 44 ( $R^2=0.950$  i  $SD=0.121$ ). S'ha de tenir en compte que les dades de retenció de les espècies iòniques poden tenir, en general, un error superior a les dades de les espècies neutres.

La magnitud en valor absolut del coeficient  $j^-$  mostra que la interacció dels anions juga un paper important en la retenció cromatogràfica, tot i així, la retenció de les espècies iòniques també està influenciada per tots els altres termes.

A continuació, per als soluts i espècies implicats en la caracterització, sense tenir en compte els *outliers*, es calculen valors de  $\log k$  a través de l'equació 71 i utilitzant els descriptors d'Abraham que es detallen en l'Annex 1. Els valors  $\log k$  calculats es representen en front dels valors experimentals (Taula 32):



**Figura 42.** Correlació entre  $\log k$  calculats a partir de l'equació 71 i  $\log k$  experimentals. (○) Soluts neutres i espècies neutres, (▲) Anions, (■) Cations.

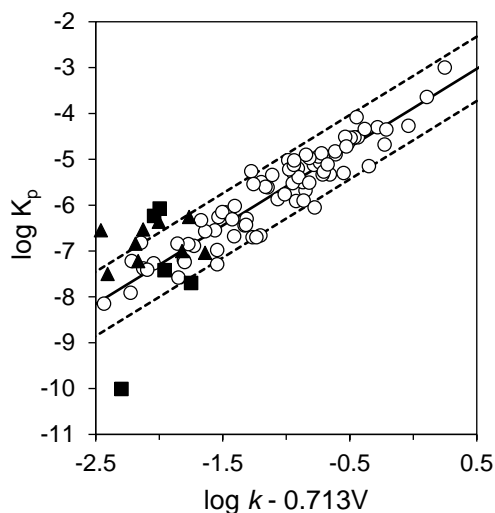
La línia sòlida representa la línia teòrica de pendient igual a la unitat i ordenada a l'origen igual a zero. El gràfic indica clarament l'exactitud del model ja que tots els punts es distribueixen al voltant de la línia teòrica i amb una dispersió semblant, el que significa que les espècies iòniques no aporten cap error sistemàtic.

#### 4.3.1.2. Estimació de la permeació de la pell de substàncies parcialment i totalment ionitzables a partir de mesures cromatogràfiques

Els compostos seleccionats per realitzar aquest estudi són principalment substàncies ionitzables que es troben en la base de dades de Zhang et al. [94]. Aquesta base de dades conté valors dels coeficients de permeabilitat, com a  $\log K_p$ , d'espècies neutres ( $\alpha = 0$ ) i totalment ionitzades ( $\alpha = 1$ ). Els valors de  $K_p$  de les diferents espècies de l'ibuprofèn, la warfarina, el fentanil i el sufentanil s'han pres dels resultats procedents dels perfils de  $K_p$ -pH els qual es troben ben definits a l'apartat 4.2.1.1.

En primer lloc, dels 133 soluts i espècies utilitzats per a la caracterització de la columna Kinetex Evo C18, se n'han seleccionat 95. Els valors de  $\log K_p$  de les formes

neutres i totalment ionitzades d'aquest conjunt de soluts es representen en front dels corresponents  $\log k$  i el volum de McGowan de cada solut (Figura 43). Es fa servir com a coeficient del volum el que s'ha determinat a partir de la correlació global dels soluts i espècies neutres ( $\log k - 0.713V$ ). La diferència entre el valor del descriptor  $V$  de les espècies neutres i les espècies iòniques és molt petita, concretament  $-0.0215$  per als anions i  $+0.0215$  per als cations (corresponent a la pèrdua i el guany de l'àtom d'hidrogen, respectivament) [88]. Per aquest motiu, es pren com a valor de  $V$  el corresponent al dels soluts neutres o espècies neutres.



**Figura 43.** Relació entre la permeabilitat de la pell i la retenció cromatogràfica, corregida pel volum del solut, de soluts i espècies neutres (○), anions (▲) i cations (■). La corba de correlació dels soluts i espècies neutres es mostra com a (—), així com l'interval per al 95 % del nivell de confiança ( $\pm 2SD_{\text{correxp}}$ )

Dintre de la mateixa figura es representa la línia que correspon a la correlació dels soluts neutres i que s'ha establert en l'apartat 4.1.1.2.1. (Equació 46). Les dos línies extra corresponen a  $\pm 2SD$  de la corba (95 % interval de confiança). Com es pot veure, tant les espècies neutres com les iòniques entren dintre de l'interval de confiança de la corba, excepte la warfarina i la codeïna que es consideren *outliers*.

En segon lloc, s'estudia la influència del grau d'ionització en l'estimació de  $\log K_p$  i per aquest propòsit valors de  $\log K_p$  d'espècies parcialment ionitzades d'un conjunt de 14 soluts es representen en front dels corresponents  $\log k$ .

Els factors de retenció de les diferents espècies de cada solut es determinen a partir dels temps de retenció experimentals dels perfils  $t_{R-w}^s$  pH i utilitzant com a temps mort de cada espècie un temps ponderat entre el temps mort de les espècies neutres (0.83 minuts) i el de les espècies iòniques (0.63 i 0.77 min per a anions i cations, respectivament), és a dir:

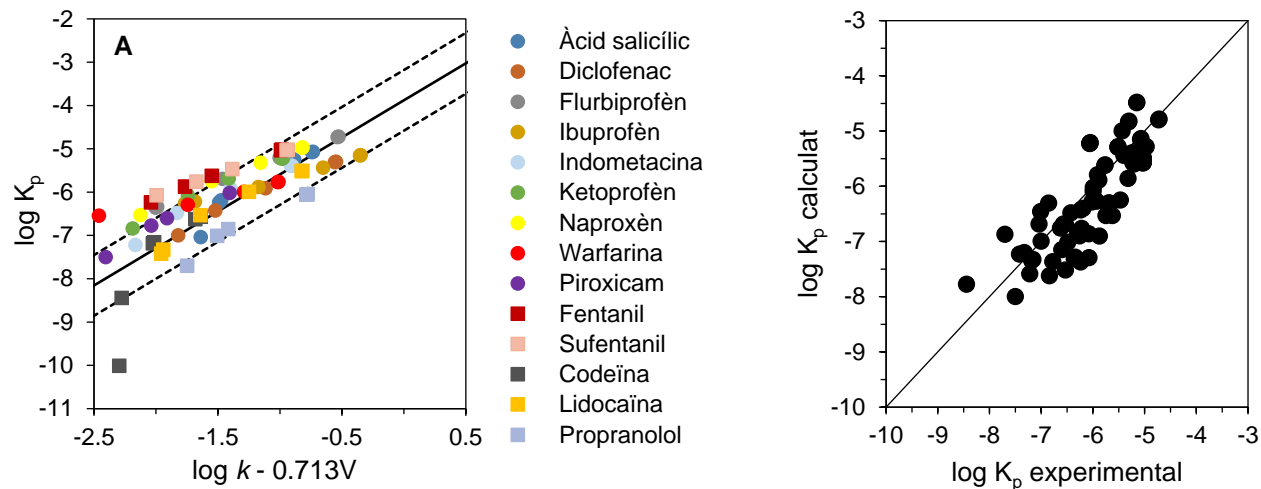
$$t_M = t_{M(\text{neutre})}(1-\alpha) + t_{M(\text{ió})}\alpha \quad \text{(Equació 72)}$$

Els graus d'ionització corresponents a les diferents espècies de cada solut es calculen aplicant l'equació 7 (àcids) o l'equació 8 (bases) i a partir dels valors de pH en la fase mòbil ( ${}^s_w$ pH) i el  $pK_a$  del solut en la fase mòbil ( ${}^s_w$ pK<sub>a</sub>), paràmetre obtingut dels ajusts dels perfils  $t_{R-w}^s$  pH en l'apartat 4.2.2.

Els valors de log K<sub>p</sub> corresponents a cada grau d'ionització es calculen aplicant l'eq. 5, en el cas dels àcids, i l'eq. 6, en el cas de les bases. Aquests valors es representen gràficament en front dels corresponents log *k* i el volum de McGowan (Figura 44A). Per una altra banda, aquests mateixos valors de log K<sub>p</sub> es representen en front dels valors log K<sub>p</sub> calculats a partir de l'equació 46 (Figura 44B). La concordança entre els valors log K<sub>p</sub> calculats i experimentals es mostra a la Figura 44B i a través de la següent equació de correlació:

$$\log K_p \text{ calculat} = -0.618(\pm 0.455) + 0.928(\pm 0.075)\log K_p \text{ experimental}$$

$$n = 73 \quad R^2 = 0.682 \quad SD = 0.512 \quad F = 153 \quad \text{(Equació 73)}$$



**Figura 44. A:** Relació entre la permeabilitat de la pell i la retenció cromatogràfica, corregida pel volum del solut, d'espècies parcialment ionitzades. També es representen les espècies neutres ( $\alpha = 0$ ) i les totalment ionitzades ( $\alpha = 1$ ). Els símbols dels cercles (●) corresponen a àcids i els quadrats (■) a bases. La corba de correlació dels soluts i espècies neutres es mostra com a (—), així com l'interval per al 95 % del nivell de confiança ( $\pm 2SD_{\text{correxp}}$ ). **B:** Correlació entre log  $K_p$  calculats a partir de l'equació 46 i log  $K_p$  experimentals d'espècies parcialment ionitzades.



La Figura 44A mostra que pràcticament tot el conjunt de dades de  $\log K_p - (\log k - 0.713V)$  entra dintre de l'interval de confiança de la corba, inclús les que corresponen a les espècies altament o completament ionitzades, excepte l'espècie totalment ionitzada de la warfarina i la codeïna (*outliers*). El fet que les dades es trobin dintre de l'interval de confiança significa que la dispersió observada es deguda principalment a l'error de les dades biològiques i no al fet que les espècies estiguin parcialment o totalment ionitzades.

Pel que fa a la concordança entre els valors  $\log K_p$  calculats i experimentals, la Figura 44B mostra que tots els punts es distribueixen per igual al voltant de la línia teòrica de pendent igual a 1 i ordenada a l'origen igual zero i amb una dispersió semblant. A més el valor del paràmetre del pendent de la correlació és proper a 1.

Amb tots aquests resultats es pot suggerir que l'equació 46 és una bona aproximació per a l'estimació dels coeficients de la permeabilitat de la pell tant d'espècies neutres com d'espècies parcialment i totalment ionitzades través de mesures cromatogràfiques.

### **4.3.2. Model skin PAMPA**

#### **4.3.2.1. Caracterització del sistema skin PAMPA per soluts neutres, espècies neutres i espècies iòniques**

La caracterització del sistema skin PAMPA a través del model de paràmetres de solvatació d'Abraham per a soluts i espècies neutres també s'ha establert prèviament a l'apartat 4.1.2.2. Per tal d'ampliar la caracterització d'aquest sistema a substàncies ionitzables, s'inclouen en la regressió els descriptors d'Abraham de cada espècie i els valors de permeabilitat skin PAMPA de les formes iòniques el quals provenen dels resultats de l'apartat 4.2.3.1.: les permeabilitats de la formes aniòniques i catiòniques pures s'obtenen a través de l'ajust de les dades del perfil  $\log P_e$ -pH amb l'aplicació de l'equació 67 (resultats a les Taules 27, 29 i 31). Els valors logarítmics de la permeabilitat skin PAMPA de 75 soluts i espècies es mostren a continuació:

**Taula 33.** Recull de valors de  $\log P_e$ . En el cas de soluts i espècies neutres,  $\log P_e$  es mesura al pH o l'interval de pH on el solut es troba en forma neutra (Annex 5), i en el cas de les espècies anióniques i catióniques, a partir dels resultats obtinguts en l'apartat 4.2.3.1. (Taulas 27, 29 i 31).

<b>Soluts</b>	<b><math>\log P_e</math></b>
2,4-Diclorofenol	-3.92 ± 0.00
2-Isopropil-5-Metilfenol (timol)	-4.01 ± 0.00
2-Nitro-p-fenilendiamina	-5.25 ± 0.02
2-Toluïdina	-4.13 ± 0.00
3-Metilfenol (m-cresol)	-4.33 ± 0.01
4-Amino-2-nitrofenol	-4.59 ± 0.02
4-Clorofenol	-4.27 ± 0.02
4-Etilfenol	-4.19 ± 0.02
4-Hidroxifenilacetamida	-6.07 ± 0.08
4-Hidroximetilfenilacetat	-5.07 ± 0.09
4-Nitrofenol	-4.91 ± 0.02
5-Fluorouracil	-5.77 ± 0.02
8-Metoxipsoralè	-4.30 ± 0.03
Àcid 2-hidroxibenzoic (àcid salicílic)	-4.42 ± 0.11
Àcid 2-hidroxibenzoic (àcid salicílic), anió	-6.09 ± 0.02
Àcid 5,5-dietilbarbitúric (barbital)	-5.75 ± 0.05
Àcid 5-etil-5-fenilbarbitúric (fenobarbital)	-6.05 ± 0.01
Àcid benzoic	-4.82 ± 0.07
Àcid benzoic, anió	-5.87 ± 0.03
Alcohol 4-hidroxibenzílic	-5.85 ± 0.01
Aminopirina	-5.67 ± 0.03
Anilina	-4.55 ± 0.00
Anilina, catió	-5.86 ± 0.02
Antipirina	-5.63 ± 0.04
Atrazina	-4.67 ± 0.01
Atropina, catió	-5.98 ± 0.03
Benzil nicotinat	-4.16 ± 0.02
Cafeïna	-5.45 ± 0.02
Capsaïcina	-4.63 ± 0.07
Catecol	-5.39 ± 0.00
Cortexolona	-5.45 ± 0.03
Corticosterona	-5.59 ± 0.01
Cortisona	-6.09 ± 0.02
Dexametasona	-6.25 ± 0.03
Diclofenac	-3.79 ± 0.02
Diclofenac, anió	-5.90 ± 0.03
Digitoxina	-6.38 ± 0.15
Estradiol	-4.15 ± 0.07
Estriol	-6.07 ± 0.09
Fluocinonida	-5.38 ± 0.06
Flurbiprofèn	-3.69 ± 0.01
Flurbiprofèn, anió	-6.04 ± 0.04
Griseofulvina	-5.28 ± 0.06
Hidrocortisona	-6.17 ± 0.05

(Continuació Taula 33)

Soluts	log P <sub>e</sub>
Hidroquinona	-5.87 ± 0.06
Hidroxiprogesterona	-4.70 ± 0.05
Ibuprofèn	-3.61 ± 0.06
Ibuprofèn, anió	-5.45 ± 0.08
Indometacina	-4.40 ± 0.04
Indometacina, anió	-5.86 ± 0.04
Isoquinolina	-4.20 ± 0.01
Ketoprofèn	-4.68 ± 0.03
Ketorolac	-5.05 ± 0.04
Ketorolac, anió	-6.20 ± 0.01
Lidocaïna, catió	-5.65 ± 0.09
Metil 4-hidroxibenzoat	-4.88 ± 0.04
Metil fenil èter	-4.34 ± 0.04
Morfina, catió	-6.19 ± 0.07
N,N-Dimetilanilina	-3.95 ± 0.02
Naproxèn	-4.19 ± 0.04
Naproxèn, anió	-5.99 ± 0.02
Nicotina, catió	-5.96 ± 0.19
o-Fenilendiamina	-5.42 ± 0.02
Piridina	-4.49 ± 0.01
Piroxicam	-4.67 ± 0.05
Piroxicam, anió	-5.63 ± 0.03
Prednisolona	-6.42 ± 0.02
Progesterona	-4.13 ± 0.02
Propranolol, catió	-6.03 ± 0.04
Ranitidina, catió	-6.18 ± 0.15
Sufentanil, catió	-6.24 ± 0.08
Testosterona	-4.52 ± 0.03
Tramadol, catió	-6.12 ± 0.04
Warfarina	-4.62 ± 0.11
Warfarina, anió	-5.80 ± 0.02

A partir de la regressió lineal múltiple entre log P<sub>e</sub> i els 7 descriptors moleculars d'Abraham de cada solut, l'equació 23 es converteix en:

$$\log P_e (\text{skin PAMPA}) = -4.451(\pm 0.118) + 0.383(\pm 0.128)E - 0.561(\pm 0.075)S - 0.904(\pm 0.098)A - 2.179(\pm 0.146)B + 1.514(\pm 0.121)V - 0.377(\pm 0.111)J^+ + 2.136(\pm 0.164)J^-$$

$$n=72 \quad R^2 = 0.883 \quad SD = 0.292 \quad F = 69$$

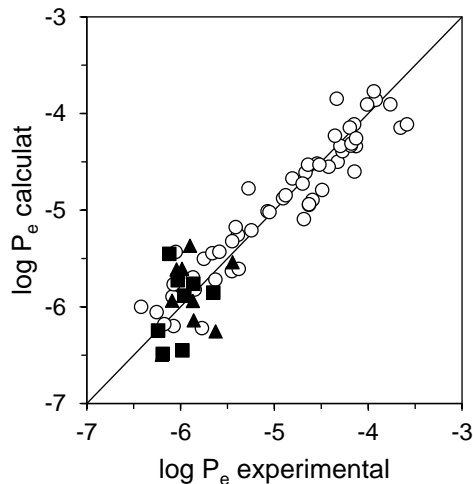
**(Equació 74)**

De les 75 espècies s'exclouen de la regressió la digitoxina, la ranitidina (catió) i la warfarina (anió) ja que els seus residus estàndard són superiors a 2.5 en valor absolut (*outliers*). En aquest cas, l'equació 74 també presenta coeficients molts semblants a l'equació establerta prèviament a partir dels valors de log P<sub>e</sub> per a soluts

i espècies neutres (Equació 55). Els paràmetres estadístics corresponents a l'equació 55 ( $R^2=0.906$  i  $SD=0.247$ ) són una mica més bons que els de l'equació 74, tot i així, s'ha de tenir en compte que les dades de permeabilitat de les espècies iòniques poden presentar, en general, un error superior a les dades de les espècies neutres.

La magnitud en valor absolut del coeficient  $j^-$  també mostra que la interacció dels anions juga un paper important en la permeabilitat skin PAMPA, no obstant, la permeabilitat de les espècies iòniques també està influenciada per tots els altres termes.

A continuació, per als soluts i espècies implicats en l'equació de caracterització, sense tenir en compte els *outliers*, es calculen valors de  $\log P_e$  a través de l'equació 74 i utilitzant els descriptors d'Abraham que es detallen en l'Annex 1. Els valors  $\log P_e$  calculats es representen en front dels valors experimentals (Taula 33):



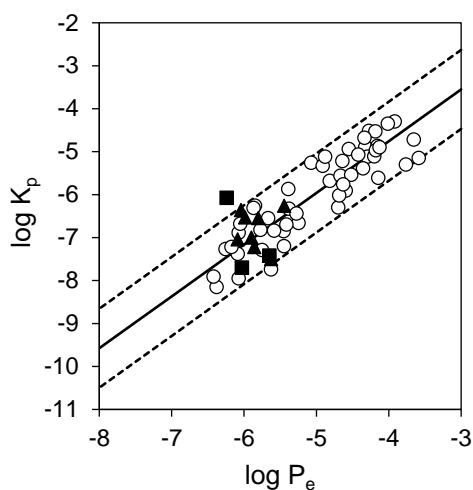
**Figura 45.** Correlació entre  $\log P_e$  calculats a partir de l'equació 74 i  $\log P_e$  experimentals. ( $\circ$ ) Soluts neutres i espècies neutres, ( $\blacktriangle$ ) Anions, ( $\blacksquare$ ) Cations.

Aquest gràfic indica que els punts de les espècies aniòniques i catiòniques es poden ajustar a la tendència dels soluts neutres i les espècies neutres.

#### 4.3.2.2. Estimació de la permeació de la pell de substàncies parcialment i totalment ionitzables a partir de mesures de permeabilitat skin PAMPA

Per a la realització d'aquest estudi es du a terme un procediment similar al mencionat en l'apartat 4.3.1.2.

En primer lloc, dels 75 soluts i espècies utilitzats per a la caracterització del sistema skin PAMPA, se n'han seleccionat 62. Els valors de  $\log K_p$  de les formes neutres i totalment ionitzades d'aquest conjunt de soluts es representen en front dels corresponents  $\log P_e$ :



**Figura 46.** Relació entre la permeabilitat de la pell i la permeabilitat skin PAMPA de soluts i espècies neutres ( $\circ$ ), anions ( $\blacktriangle$ ) i cations ( $\blacksquare$ ). La corba de correlació dels soluts i espècies neutres es mostra com a (—), així com l'interval per al 95 % del nivell de confiança ( $\pm 2SD_{\text{correxp}}$ )

El gràfic anterior mostra també una línia sòlida que pertany a la correlació només de les espècies neutres (equació 56), així com, l'interval per al 95 % del nivell de confiança ( $\pm 2SD$ ). S'observa clarament que tant les espècies neutres com les totalment ionitzades es troben dintre de l'interval de confiança de la corba.

En segon lloc, per a un conjunt de 8 soluts es calculen els graus d'ionització (Equació 7 o 8) que corresponen a les dades experimentals dels perfils  $\log P_e$ -pH i consecutivament es calculen els valors de  $\log K_p$  corresponents a aquests graus d'ionització (Equació 5 o 6). Per a cadascun d'aquests, els valors de  $\log K_p$  es

representen gràficament en front de  $\log P_e$  (Figura 47A). Els mateixos valors de  $\log K_p$  també es representen en front dels valors  $\log K_p$  calculats a partir de l'equació 56 (Figura 47B). L'equació de correlació es mostra a continuació:

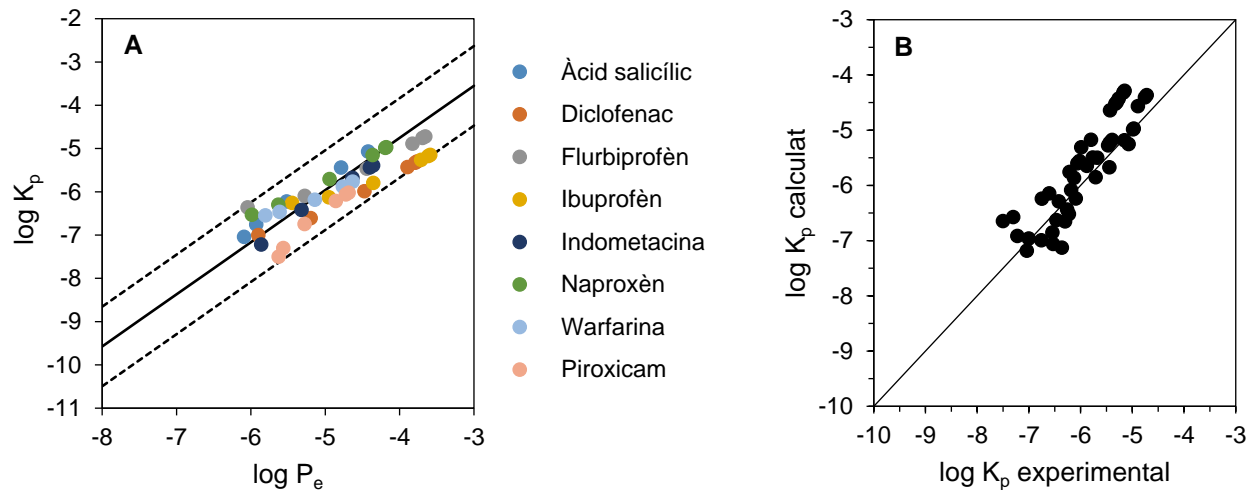
$$\log K_p \text{ calculat} = 0.786(\pm 0.511) + 1.097(\pm 0.086)\log K_p \text{ experimental}$$

$$n = 45 \quad R^2 = 0.792 \quad SD = 0.412 \quad F = 164 \quad \textbf{(Equació 75)}$$

En la Figura 47A es pot observar que tot conjunt de dades es troba dintre de l'interval de confiança de la corba. Això significa que la dispersió observada es deguda principalment a l'error de les dades biològiques i no al fet que les espècies estiguin parcialment o totalment ionitzades.

La Figura 47B també mostra que tots els punts es distribueixen al voltant de la línia teòrica de pendent igual a 1 i ordenada a l'origen igual zero amb una dispersió semblant i a més, el pendent de la correlació no és significativament diferent de la unitat.

Així doncs l'estimació dels coeficients de permeabilitat de la pell tant per a espècies neutres com parcialment i totalment ionitzades també es pot dur a terme a través de mesures de permeabilitat de la pell artificial i amb l'ús de l'equació 56.



**Figura 47. A:** Relació entre la permeabilitat de la pell i la permeabilitat skin PAMPA d'espècies parcialment ionitzades. També es representen les espècies neutres ( $\alpha = 0$ ) i les totalment ionitzades ( $\alpha = 1$ ). Els símbols dels cercles (●) corresponen a àcids. La corba de correlació dels soluts i espècies neutres es mostra com a (—), així com l'interval per al 95 % del nivell de confiança ( $\pm 2SD_{\text{corr exp}}$ ).

**B:** Correlació entre  $\log K_p$  calculats a partir de l'equació 56 i  $\log K_p$  experimentals d'espècies parcialment ionitzades.

### **4.3.3. Comparació entre sistemes físico-químics i el sistema de la permeabilitat de la pell**

En l'apartat 4.1.3. s'ha comparat la similitud entre diferents sistemes físico-químics i el sistema biològic de la permeabilitat a través de la pell, tots ells caracteritzats a través del model de paràmetres de solvatació per soluts i espècies neutres. Per a mesurar la similitud, s'ha utilitzat el paràmetre de la distància  $d$ , que considera els 5 coeficients del sistema com a components d'un vector en un espai de 5 dimensions [102].

Per a comparar els sistemes caracteritzats a través del model de paràmetres de solvatació per a espècies neutres i espècies iòniques s'han de tenir en compte els dos descriptors addicionals,  $J^+$  i  $J^-$ . Per tant, la distància  $d$ , en aquest cas, ha de considerar els 7 coeficients com a components d'un vector en un espai de 7 dimensions. L'expressió de la longitud del vector (equació 26) i conseqüentment el paràmetre  $d$  (equació 27), es converteixen en:

$$l = \sqrt{e^2 + s^2 + a^2 + b^2 + v^2 + j^{+2} + j^{-2}} \quad \text{(Equació 76)}$$

$$d = \sqrt{(e_{ui}-e_{uj})^2 + (s_{ui}-s_{uj})^2 + (a_{ui}-a_{uj})^2 + (b_{ui}-b_{uj})^2 + (v_{ui}-v_{uj})^2 + (j_{ui}^+ - j_{uj}^+)^2 + (j_{ui}^- - j_{uj}^-)^2} \quad \text{(Equació 77)}$$

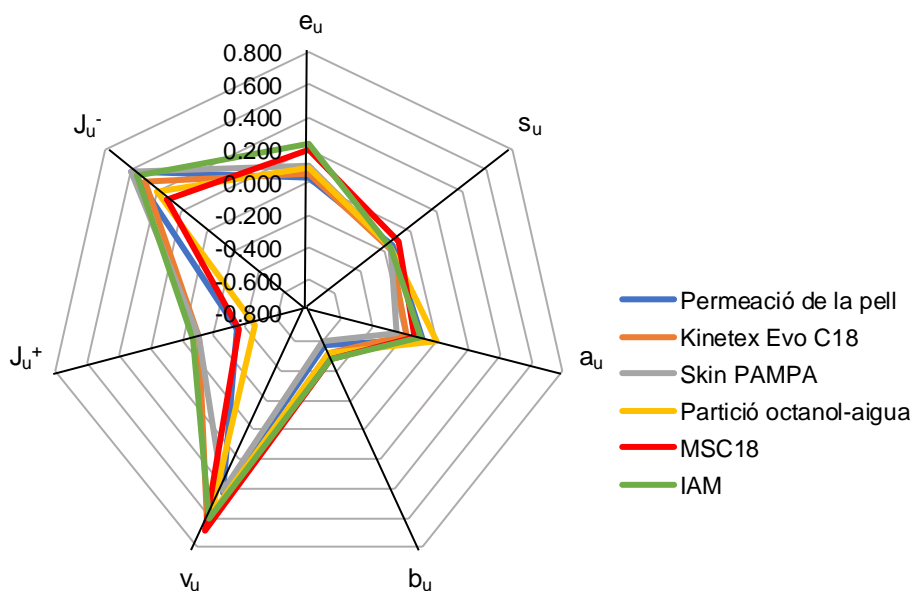
A continuació, la Taula 34 presenta els coeficients normalitzats dels 3 sistemes d'estudi (permeabilitat de la pell, HPLC columna Kinetex Evo C18 i skin PAMPA), juntament amb el sistema de distribució octanol-aigua i altres sistemes d'HPLC (columna MSC18 i IAM), tots ells caracteritzats prèviament pel model de paràmetres de solvatació per a espècies iòniques [88] (Equació 23). També es mostra la distància  $d$  calculada.



**Taula 34.** Coeficients normalitzats i valors de la distància  $d$  entre el sistema de permeabilitat en pell i diferents sistemes físico-químics caracteritzats pel model de paràmetres de solvatació d'Abraham per a espècies iòniques.

Sistema	Coeficients normalitzats							$d$
	$e_u$	$s_u$	$a_u$	$b_u$	$v_u$	$j_u^+$	$j_u^-$	
Permeabilitat de la pell ( $\log K_p$ )	0.032	-0.143	-0.080	-0.573	0.424	-0.351	0.584	0.000
Kinetex Evo C18 ( $\log k$ )	0.056	-0.168	-0.180	-0.528	0.634	-0.101	0.495	0.357
Skin PAMPA ( $\log P_e$ )	0.106	-0.155	-0.251	-0.604	0.419	-0.104	0.592	0.311
Distribució octanol-aigua ( $\log D_{o/w}$ )	0.085	-0.159	0.005	-0.523	0.577	-0.457	0.390	0.291
MSC18 ( $\log k$ )	0.196	-0.094	-0.141	-0.486	0.683	-0.357	0.320	0.421
IAM ( $\log k$ )	0.239	-0.152	-0.094	-0.487	0.610	-0.066	0.545	0.409

Les distàncies es poden representar de manera simple i visual mitjançant el gràfic radial. Aquest tipus de gràfic consta de tants vèrtexs com dimensions es representen, en aquest cas els 7 coeficients normalitzats. El gràfic que representa els coeficients normalitzats de cada sistema es mostra a continuació:



**Figura 48.** Representació radial del sistema de permeabilitat en pell i diferents sistemes físico-químics

Si es comparen els sistemes físico-químics entre ells es pot veure que el sistema Kinetex Evo C18 i skin PAMPA es troben propers entre si. El valor del coeficient  $j^+$

d'aquests sistemes i el sistema IAM no és tan significatiu com en el sistema biològic ni en el sistema de distribució octanol-aigua i MSC18. Això indica que hi ha un comportament diferent entre anions i cations en funció del sistema on té lloc la partició.

Amb la visualització del gràfic radial es pot deduir que cap dels sistemes físico-químics es troba proper al sistema biològic, a més el valor de les distàncies calculades a través de l'equació 77 és, en tots els casos, superior a 0.25. Malgrat això, el valor llindar del paràmetre  $d$  hauria de ser superior ja que per al càlcul d'aquest paràmetre s'han de considerar 7 coeficients i no 5 com en la majoria dels casos. Els sistemes físico-químics més propers al sistema biològic, independentment si la distància  $d$  és superior a 0.25, són el sistema de distribució octanol-aigua, el sistema skin PAMPA i el sistema Kinetex Evo C18. La similitud del sistema cromatogràfic i el sistema skin PAMPA amb el sistema biològic de la pell ja es veu de manera clara amb les correlacions prèviament establertes (Figura 43-44 i 46-47).



## **4.4. APLICACIÓ DELS MODELS PREDICTIUS A LA INDÚSTRIA FARMACÈUTICA**

Les àrees terapèutiques de l'empresa Esteve Pharmaceuticals S.A. se centren principalment en les malalties del sistema nerviós central: patologies neurològiques (epilèpsia i Alzheimer), patologies psiquiàtriques (depressió) i l'àrea del dolor (crònic i agut). La principal via d'administració dels fàrmacs desenvolupats en aquestes àrees prioritàries és la via oral, no obstant, en l'àrea del dolor també és particularment interessant estudiar altres vies d'administració com la via transdèrmica.

Els mètodes de predicció de la permeabilitat a través de la pell anteriorment establerts i validats per a substàncies neutres i també parcialment i totalment ionitzades, i el mètode *in vitro* de referència mitjançant cel·les de difusió de Franz s'apliquen, en aquest apartat, per a la determinació dels coeficients de permeabilitat de diferents fàrmacs ionitzables al pH de la pell, dins de les línies d'investigació d'Esteve Pharmaceuticals centrades en el camp del tractament del dolor.

### **4.4.1. Predicció de valors de la permeabilitat de la pell per a una sèrie de fàrmacs enfocats al tractament del dolor**

En primer lloc, se seleccionen 12 compostos dels diversos programes d'investigació, els quals es classifiquen segons la diana d'acció farmacològica (lloc de l'organisme on el fàrmac exerceix la seva acció). Per raons de propietat no es poden revelar les estructures d'aquests fàrmacs, així doncs, es nombren com a Compost 1, Compost 2, Compost 3, etc. A la taula 35 es mostren els valors de  $pK_a$  i  $\log P_{o/w}$  com a paràmetres físico-químics dels 12 compostos i també el programa d'investigació al que correspon cada compost, tots ells dedicats al dolor. Els paràmetres físico-químics procedeixen majoritàriament del programa ACDLabs [143] (valors calculats).

**Taula 35.** Valors de  $pK_a$ ,  $\log P_{o/w}$  i els diferents programes d'investigació dels fàrmacs estudiats.

Compost	Programa d'investigació	$pK_{a_1}$	$pK_{a_2}$	$pK_{a_3}$	$pK_{a_4}$	$\log P_{o/w}$
1	1	5.24* (B)				1.09
2	2	6.40 (B)				3.58
3	3	6.60 (B)	10.20 (B)			2.11
4	3	6.50 (B)	9.40 (B)			4.18
5	4	7.89* (B)				3.72
6	3	5.20 (B)	9.80 (B)			2.70
7	3	4.00 (B)	9.30 (B)			3.17
8	3	8.20 (B)	8.30 (B)	10.00 (A)	10.20 (B)	3.40
9	3	4.84* (B)	9.81* (B)			3.94
10	3	2.00 (B)	9.90 (B)			1.55
11	3	7.70 (B)	9.10 (B)	9.60 (B)	10.10 (B)	4.30
12	5	2.60 (B)	10.00 (B)			3.10

\*Valor determinat potenciomètricament amb un valorador T3 (Sirius Analytical Instruments Ltd., East Sussex, UK)

Àcid, (A); Base, (B)

#### 4.4.1.1. Predicció a través del model skin PAMPA

El 12 fàrmacs a dalt mencionats s'analitzen, en primer lloc, mitjançant l'assaig skin PAMPA i emprant la metodologia general que s'ha establert prèviament (Apartat 4.1.2.1.): temps d'incubació de 4 hores i assaig amb agitació tant al compartiment donador com a l'acceptor. L'experiment es realitza a pH 5.5 i 7.4 (pH equivalent a la superfície de la pell i la sang, respectivament). Per tant, es duen a terme dos assajos, un amb gradient de pH per treballar sota condicions *sink* (pH 5.5<sub>donador</sub>-pH 7.4<sub>acceptor</sub>), i un altre amb iso-pH (pH 7.4<sub>donador</sub>-pH 7.4<sub>acceptor</sub>). Com a protocol general, la concentració de les solucions de referència sol ser de 50  $\mu$ M, no obstant, en aquest assaig s'empen concentracions de 10  $\mu$ M (1 % v/v DMSO). Aquesta disminució queda justificada per la baixa solubilitat d'alguns dels compostos de les diferents línies d'investigació, i per aquest motiu, la tècnica de detecció per a la quantificació de les concentracions d'acceptor, donador i referència és UHPLC-MS. Per a calcular els valors de la permeabilitat efectiva s'utilitza l'equació 14.

Un cop obtinguts els valors de les permeabilitats efectives dels diferents fàrmacs, a partir de l'equació 56 es calculen els coeficients de permeabilitat de la pell a cada

valor de pH, suposant que els valors de  $pK_a$  dels fàrmacs en el medi de dissolució són equivalents als corresponents en aigua.

**Taula 36.** Valors  $\log P_e$  a pH 5.5 i 7.4 i els corresponents valors  $\log K_p$  calculats a través de l'equació 56.

Fàrmac	$w_w$ pH	$\log P_e$	$\log K_p$ calculat (Equació 56)
1	5.5	-5.16	-6.11
	7.4	-4.99	-5.91
2	5.5	-	-
	7.4	-7.19	-8.45
3	5.5	-	-
	7.4	-	-
4	5.5	-	-
	7.4	-	-
5	5.5	-7.09	-8.34
	7.4	-4.96	-5.88
6	5.5	-	-
	7.4	-	-
7	5.5	-	-
	7.4	-	-
8	5.5	-	-
	7.4	-	-
9	5.5	-	-
	7.4	-	-
10	5.5	-6.97	-8.20
	7.4	-6.93	-8.15
11	5.5	-	-
	7.4	-	-
12	5.5	-7.18	-8.44
	7.4	-7.15	-8.41

Dels 12 compostos analitzats, 7 no mostren cap signe de permeabilitat a través de la membrana en cap dels dos valors de pH, és a dir, el valor de  $P_e$  és zero i conseqüentment no es pot expressar el valor numèric del logaritme. Com s'ha comentat a la introducció, per poder caracteritzar la permeabilitat i classificar els API's adequadament, Pion va proposar una classificació:  $\log P_e < -6$  poc permeable,  $\log P_e$  entre -5 i -6, permeabilitat intermèdia i  $\log P_e \geq -5$  altament permeable [72]. Aquest criteri es va establir per a unes condicions d'assaig de 4 hores d'incubació i

sense agitació, malgrat això, per a experiments amb temps d'incubació de 4 hores i amb agitació s'ha proposat la mateixa classificació ja que, com s'ha comentat a l'apartat 4.1.2.1, a aquest temps d'incubació el resultat amb i sense agitació són molt semblants. Així doncs, en base a la classificació proposada per Pion, el compost 2 presenta poca permeabilitat a pH 7.4 i els compostos 10 i 12 també mostren poca permeabilitat als dos valors de pH. Per contra, els compostos 1 i 5 tenen una alta permeabilitat skin PAMPA (els seus valors de  $\log P_e$  a pH 7.4 són superiors a -5; -4.99 i -4.96, respectivament). Aquests dos fàrmacs són potencials candidats per via oral per al tractament del dolor, per tant, també és interessant proposar-los com a possibles candidats per administrar-los a través de pegats transdèrmics donada la seva alta permeabilitat skin PAMPA.

A partir dels resultats esmentats anteriorment, se seleccionen aleshores els compostos 1 i 5 per a ser analitzats a través del mètode *in vitro* de referència de les cel·les de difusió de Franz i el mètode cromatogràfic. Per tal de contrastar els resultats, també es tria un compost amb baixa permeabilitat skin PAMPA com per exemple el compost 2.

#### 4.4.1.2. Predicció a través del model cromatogràfic

Per a la predicció de valors de  $\log K_p$  de substàncies ionitzables a través de mesures cromatogràfiques és rellevant determinar el grau d'ionització exacte del solut en la fase mòbil ja que el  $pK_a$  del solut en la fase mòbil no es correspon amb l'aquós. Com s'ha discutit en l'apartat 4.2.2.2. aquests valors augmenten respecte als valors en aigua en el cas dels àcids i disminueixen en el cas de les bases. Per poder calcular el grau d'ionització d'un solut en la fase mòbil és necessari mesurar el pH en la fase mòbil i conseqüentment determinar el  $pK_a$  en la fase mòbil.

Els temps de retenció dels compostos 1, 2 i 5 es mesuren en un interval de pH, entre 2 i 11, de la mateixa manera que la descrita en l'apartat 3.4.2 del capítol 3 (Materials i mètodes). La taula següent mostra els temps de retenció als diferents valors de  $^s_pH_w$  per a cada compost:

**Taula 37.** Valors de pH en la fase mòbil 40 % v/v ACN ( $^s\text{pH}$ ) dels diferents tampons utilitzats, així com els temps de retenció dels fàrmacs d'estudi.

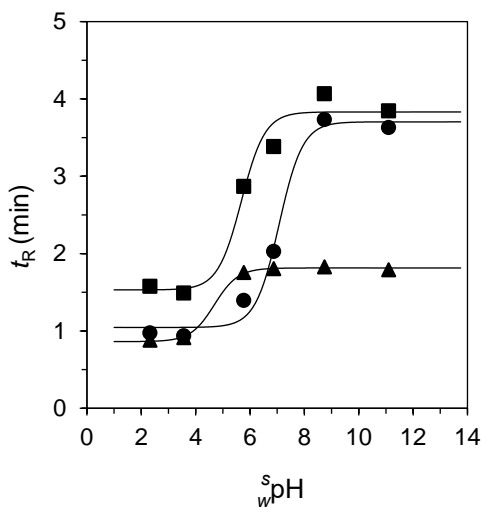
Tampons estudiats	Compost 1 Compost 2 Compost 5			
	$^s\text{pH}$	$t_R$ (min)		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50mM	2.32	0.879	1.576	0.973
HCOOH 10mM	3.56	0.913	1.489	0.936
CH <sub>3</sub> COOH 10mM	5.77	1.755	2.867	1.394
H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> 10mM	6.87	1.806	3.383	2.027
NH <sub>3</sub> 10mM	8.74	1.827	4.067	3.732
H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> 10mM	11.1	1.792	3.845	3.630

Donat que els compostos 1, 2 i 5 es comporten com a bases monoprotòniques, els temps de retenció s'ajusten als valors de pH mesurats en la fase mòbil ( $^s\text{pH}$ ) a través de l'equació 41. L'ajust dels perfils proporciona els temps de retenció de la forma neutra i iònica i també el  $\text{p}K_a$  de la fase mòbil ( $^s\text{p}K_a$ , 40 % acetonitril). La taula següent mostra els paràmetres d'ajust obtinguts i els perfils dels 3 fàrmacs es presenten a la Figura 49.

**Taula 38.** Paràmetres ( $\pm\text{SD}$ ) i estadístiques obtinguts de l'ajust del temps de retenció dels 3 fàrmacs d'estudi al pH de la fase mòbil.

Fàrmacs	Paràmetres d'ajust			Estadístiques		
	$t_{R_{\text{HA}^+}}$	$t_{R_A}$	$^s\text{p}K_a$	$R^2$	SD	F
Compost 1	0.86 $\pm$ 0.02	1.81 $\pm$ 0.01	4.69 $\pm$ 0.13	0.999	0.02	1306
Compost 2	1.53 $\pm$ 0.17	3.83 $\pm$ 0.14	5.68 $\pm$ 0.20	0.974	0.23	56
Compost 5	1.05 $\pm$ 0.10	3.70 $\pm$ 0.12	7.07 $\pm$ 0.13	0.990	0.17	149





**Figura 49.** Perfils del temps de retenció vs. pH de la fase mòbil de les 3 bases monoprotiques. (▲) Compost 1, (■) Compost 2, (●) Compost 5

En tots els casos s'obtenen molt bones estadístiques. Un cop determinats els valors  $\text{p}K_a$ , per poder aplicar l'equació 46 i predir així els valors de  $\log K_p$  a  $\text{pH}_w^s$  5.5 i 7.4, primer es calculen per a cada compost els graus d'ionització corresponents a aquests valors de pH (Equació 8) i després per a aquests graus d'ionització es calculen els corresponents factors de retenció aplicant la metodologia següent:

Els factors de retenció de les espècies parcialment ionitzades a pH 5.5 i 7.4 es determinen a partir dels temps de retenció ponderats (Equació 41) entre els temps de retenció de les formes neutres i les formes iòniques, obtinguts dels ajusts dels perfils  $t_R - \text{pH}_w^s$  (Taula 38), i utilitzant com a temps mort de cada espècie també un temps ponderat (Equació 72)

Per a l'aplicació de l'equació 46, a part del paràmetre del factor de retenció, també és necessari determinar el volum del solut de McGowan. Aquest es calcula fàcilment utilitzant l'algoritme d'Abraham i McGowan a partir de la fórmula molecular i el nombre d'enllaços [113]. La taula següent presenta els logaritmes del factor de retenció calculats per a cada grau d'ionització corresponent a pH 5.5 i 7.4, el volum de McGowan calculat, i, a partir d'aquests dos paràmetres, els valors de  $\log K_p$  calculats a través de l'equació 46.

**Taula 39.** Valors del grau d'ionització de cada fàrmac a pH 5.5. i 7.4, valors de log  $k$  corresponents i valors log  $K_p$  calculats a través de l'equació 46.

Fàrmac	$w_w$ pH	$\alpha$	log $k$	V	log $K_p$ calculat (Equació 46)
Compost 1	5.5	0.35	-0.093	2.3800	-6.94
	7.4	0.01	0.071	2.3800	-6.66
Compost 2	5.5	0.89	0.085	2.4525	-6.73
	7.4	0.09	0.528	2.4525	-5.97
Compost 5	5.5	1.00	-0.463	2.6403	-7.89
	7.4	0.76	0.041	2.6403	-7.03

#### 4.4.1.3. Determinació de coeficients de permeabilitat mitjançant cel·les de difusió de Franz i comparació amb els models de predicció

Els estudis de permeació de la pell amb cel·les de difusió de Franz es realitzen tal i com s'ha explicat a l'apartat 3.3 del capítol de Materials i Mètodes. Tots 3 compostos s'analitzen a pH 5.5 i 7.4. La Taula 40 presenta els diferents paràmetres obtinguts de l'assaig de permeació als diferents valors de pH (coeficient de permeabilitat, flux i temps de latència).

**Taula 40.** Paràmetres de l'assaig de permeació dels 3 fàrmacs d'estudi a pH 5.5. i 7.4 amb els corresponents errors associats.

Compost	pH	$K_p$ ( $\cdot 10^{-6}$ cm/s)	Flux ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ )	Temps de latència (h)	Concentració inicial solució donadora ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1	5.5	0.84±0.18	0.25±0.06	2.71±1.57	82.43
	7.4	1.22±0.47	0.24±0.09	2.97±1.13	55.75
2	5.5	0.08±0.02	0.70±0.13	3.78±0.71	2398.19
	7.4	1.35±0.03	0.60±0.01	0.98±0.42	123.31
5	5.5	0.07±0.002	6.75±0.02	3.41±0.66	26262.25
	7.4	0.49±0.08	21.94±3.60	1.91±0.36	12492.48

Com era d'esperar, els resultats de la taula 40 indiquen que els valors de  $K_p$  a pH 7.4 són superiors a pH 5.5, en tots els casos, degut a la ionització. El flux, en canvi, es manté constant en els fàrmacs 1 i 2. Pel que fa al temps de latència, en els fàrmacs 2 i 5 es veu una disminució del valor a pH 7.4. En el fàrmac 5 això es pot justificar per l'augment del flux a aquest pH. El temps de latència està relacionat amb el temps que tarda el fàrmac en saturar l'epidermis, per tant, a mesura que augmenta el flux el temps de latència disminueix.

Un cop obtinguts els coeficients de permeabilitat de la pell, aquests es comparen a través de la taula 41 amb els predits mitjançant el model skin PAMPA (Taula 36) i el model cromatogràfic (Taula 39)

**Taula 41.** Comparació entre els valors  $\log K_p$  experimentals i els calculats pel mètode skin PAMPA i el mètode cromatogràfic dels 3 fàrmacs d'estudi.

Compost	pH	log $K_p$ experimental	log $K_p$ calculat	
			Model skin PAMPA (Equació 56)	Model cromatogràfic (Equació 46)
1	5.5	-6.07	-6.11	-6.94
	7.4	-5.91	-5.91	-6.66
2	5.5	-7.09	-	-6.73
	7.4	-5.87	-8.45	-5.97
5	5.5	-7.15	-8.34	-7.89
	7.4	-6.31	-5.88	-7.03

Es pot observar que els valors experimentals i els proposats pel mètode cromatogràfic són força semblants (al voltant d'un 1 – 15 % de diferència). Els valors predits pel mètode skin PAMPA també són bastant aproximats als experimentals a excepció d'algun valor que discrepa més (compost 2). La similitud que s'observa entre els valors experimentals i els resultats del mètode cromatogràfic i el mètode skin PAMPA suggereix que els dos models són igual d'adequats per a la predicció dels coeficients de permeabilitat a través de la pell humana.

#### **4.4.2. Correlació cel·les de difusió de Franz-mesures *in vivo***

En aquest apartat s'avalua el comportament dels fàrmacs 1 i 5 com a possibles candidats per a ser administrats a través de pegats transdèrmics per al tractament del dolor. Per aquest propòsit, és necessari determinar, en primer lloc, l'àrea de pell que hauria d'abastar el pegat transdèrmic per a un flux determinat. Com s'ha mencionat a la introducció, el flux d'estat estacionari obtingut dels experiments *in vitro* amb cel·les de Franz es pot relacionar amb els paràmetres *in vivo* del nivell sanguini terapèutic ( $C_{ss}$ ) i el *clearance* sistèmic ( $Cl_s$ ) a través de l'equació 10. Com els fàrmacs 1 i 5 són candidats per via oral, el paràmetres *in vivo* mencionats ja són coneguts. Així doncs, amb els valors de flux assolits a l'apartat 4.4.1.3. i els valors del nivell sanguini terapèutic ( $C_{ss}$ ) i el *clearance* sistèmic ( $Cl_s$ ) es pot calcular l'àrea de pegat transdèrmic necessària per a cada compost. Tots aquests valors es

mostren a la Taula 42. També s'inclouen en aquesta taula els valors del fentanil com a compost de referència. Aquest agent analgèsic i anestèsic ha sigut administrat a través de pegats transdèrmics durant anys, ja que l'administració per via oral experimenta metabolisme de primer pas, és a dir, el pas a través del fetge implica una primera metabolització del fàrmac, disminuint la biodisponibilitat del mateix.

**Taula 42.** Valors de flux (J), nivell sanguini terapèutic ( $C_{ss}$ ), clearance sistèmic ( $Cl_s$ ) i àrea dels possible pegat transdèrmic per als dos fàrmacs candidats i el fentanil a pH 5.5 i 7.4.

Compost	pH	Flux ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ )	Nivell sanguini terapèutic ( $C_{ss}$ , ng/mL)	Clearance sistèmic ( $Cl_s$ , L/h)	Àrea ( $\text{cm}^2$ )
1	5.5	0.25	14240	35	1993600
	7.4	0.24			2076667
5	5.5	6.75	50.7	55	413
	7.4	21.94			127
Fentanil	7.4	4.44	2	50	22

En el cas del compost 1, les àrees obtingudes són excessivament grans. Aquest compost no es pot proposar com a candidat per via cutània ja que ni amb el desenvolupament d'una formulació es podria reduir suficientment l'àrea necessària de pegat transdèrmic. L'àrea necessària per al desenvolupament d'un pegat transdèrmic de compost 5 com a principi actiu és de l'ordre de l'àrea del fentanil. Aquestes àrees són elevades però es poden reduir de manera raonable amb el desenvolupament d'una formulació. Aquest desenvolupament de formulació implica l'ús de promotors que promoguin l'absorció com per exemple l'etanol o el propilenglicol.



## **5. CONCLUSIONS**



A partir dels resultats obtinguts en la present tesi, es poden extreure les següents conclusions:

**Amb relació a l'establiment de models d'estimació de la permeabilitat a través de la pell per a soluts neutres i espècies neutres:**

**a. Model cromatogràfic**

- El coeficient de la permeabilitat de la pell es correlaciona amb el factor de retenció cromatogràfic i el volum del solut de McGowan. El factor de retenció és el paràmetre que més aporta al càlcul de la permeabilitat a través de la pell, essent el valor de  $K_p$  més gran com més gran és la retenció. Per contra, la correcció del volum de McGowan disminueix el valor de la permeabilitat.
- La validació del model comporta una bona robustesa i una bona capacitat predictiva. La capacitat de predicció també es prova comparant els resultats amb altres models de predicció (Abraham i Patel). Els resultats del model cromatogràfic són similars (tant en precisió com en exactitud) als obtinguts a través del model d'Abraham. Els coeficients de permeabilitat obtinguts a través del model de Patel, en canvi, semblen ser lleugerament inferiors.

**b. Model skin-PAMPA**

- Les condicions d'assaig òptimes per als estudis de permeabilitat skin PAMPA en solució consisteixen en emprar un temps d'incubació de 4 hores, que és l'adequat per determinar el major nombre de compostos, i amb l'ús de l'agitació en les plaques que ajuda a disminuir el gruix de la capa aquosa. Pel que fa a la retenció de membrana, aquest paràmetre és en general baix (0-0.3), tret d'alguns compostos, com la progesterona, els valors dels quals (0.5-0.8) es poden atribuir a interaccions específiques amb la membrana. També s'ha vist que la retenció en membrana depèn del temps d'incubació. Per contra, no hi ha una relació clara entre els valors de la retenció en membrana i la lipofilitat dels compostos.
- Els coeficients del model de solvatació obtinguts en la caracterització del sistema skin PAMPA indiquen que com més gran sigui la basicitat per pont d'hidrogen, l'acidesa per pont d'hidrogen i la dipolaritat/polaritzabilitat del solut, més afavorida estarà la seva transferència cap al compartiment donador (fase aquosa). En canvi, com més gran és el volum molar i la refractivitat molar en excés mes afavorida la seva transferència cap a la membrana de pell artificial (fase orgànica).



- La validació estadística del model skin PAMPA comporta una bona robustesa i una bona capacitat predictiva. La capacitat de predicció també es comprova comparant els resultats amb els calculats a través del model cromatogràfic i altres models de predicció (Abraham i Patel). Els resultats del model skin PAMPA són similars (tant en precisió com en exactitud) als obtinguts a través del model cromatogràfic i el model d'Abraham.

### **Amb relació a l'estudi de l'efecte de la ionització en l'estimació de l'absorció cutània**

- Els ajusts dels coeficients de permeabilitat ( $K_p$ ) de les cel·les de difusió de Franz i de les permeabilitats efectives skin PAMPA ( $\log P_e$ ) al pH de la solució donadora proporcionen la permeabilitat de la forma neutra i la iònica, així com el valor de  $pK_a$  del fàrmac en la solució aquosa. En tots els casos la permeabilitat dels cations i anions és molt més petita que la de les corresponents formes neutres però en cap cas es pot mostrar una relació clara entre les formes neutres i les ionitzades. El fet que els valors de la permeació de les espècies iòniques no siguin zero confirmen que aquestes travessen la membrana de pell humana i ho fan principalment a través de les rutes polars de la pell (via transcel·lular). En el cas de les membranes skin PAMPA ho fan a través dels canals aquosos de paramembrana. Els valors de  $pK_a$  procedents dels ajusts són en general semblants als corresponents en aigua.
- La retenció dels compostos ionitzables depèn del grau d'ionització que alhora depèn del pH de la fase mòbil i del valor de  $pK_a$  del compost en la fase mòbil. Si el pH de les solucions tampó es mesura en la fase mòbil, l'ajust dels temps de retenció al pH de la fase mòbil proporciona el  $pK_a$  del compost en la fase mòbil. Aquests valors de  $pK_a$  són superiors als valors de  $pK_a$  en aigua per a àcids i lleugerament inferiors per a bases. En ambdós casos, els valors de  $pK_a$  en la fase mòbil es poden relacionar linealment amb els valors de  $pK_a$  en aigua, encara que amb certa dispersió dels punts a causa de la diferència en les interaccions específiques dels compostos amb els dos solvents (aigua i fase mòbil). Els temps de retenció de les formes iòniques es poden relacionar directament amb els temps de retenció de les formes neutres segons dues correlacions lineals diferents, una per a anions a partir d'àcids neutres i una altra per a cations a partir de bases neutres. Els resultats i les correlacions indiquen que els cations

es troben més retinguts que els anions i tots dos molt menys retinguts que les formes neutres. La mesura del temps mort mitjançant diferents mètodes (picnometria, i marcadors no retinguts iònics i neutres) mostra que el temps de retenció dels anions a pH àcid és lleugerament inferior al dels compostos neutres (aproximadament 0.83 min en aquest sistema) i disminueix amb el pH de la fase mòbil (des d'aproximadament 0.80 min a pH 2 fins a 0.65 min a pH 11). Els resultats procedents de les correlacions entre els temps de retenció dels ions i les formes neutres confirmen els baixos valors del temps mort dels anions a pH bàsic (0.63 min) i proposen un temps mort per als cations de 0.77 min.

- L'estudi de la influència de la ionització mostra que la integritat de la membrana skin PAMPA es veu clarament afectada pel pH de les solucions bàsiques. Així doncs es recomana realitzar els experiments en un interval de pH d'entre 3 i per sota de 8 per tal de no danyar-la.
- La relació entre la permeabilitat de la pell i la retenció cromatogràfica, corregida pel volum del solut, d'espècies parcialment ionitzades mostra que tot el conjunt de dades experimentals es troba dintre de l'interval de confiança de la corba que s'ha obtingut de la correlació dels soluts neutres i espècies neutres (Equació 46). Aquest fet indica que la dispersió de les dades ve donada principalment per les dades biològiques i no per la ionització dels compostos. La correlació entre  $\log K_p$  calculats a partir de l'equació 46 i  $\log K_p$  experimentals de les espècies parcialment ionitzades mostra un pendent proper a la unitat. Aquests resultats suggereixen que el model cromatogràfic es capaç d'emular coeficients de la permeabilitat de la pell de substància parcialment i totalment ionitzades.
- La relació entre la permeabilitat de la pell i la permeabilitat efectiva skin PAMPA d'espècies parcialment ionitzades també mostra que tot el conjunt de dades experimentals es troba dintre de l'interval de confiança de la corba que s'ha obtingut de la correlació dels soluts neutres i espècies neutres (Equació 56). La correlació entre  $\log K_p$  calculats a partir de l'equació 56 i  $\log K_p$  experimentals de les espècies parcialment ionitzades també mostra un pendent proper a la unitat. El model skin PAMPA, per tant, pot estimar coeficients de la permeabilitat de la pell de substàncies parcialment i totalment ionitzades.
- En la caracterització dels sistemes cromatogràfic i skin PAMPA a través del model de paràmetres de solvatació per espècies iòniques, el coeficient del terme aniónic indica que la interacció dels anions juga un paper important en les

dues propietats, no obstant, també es troben influenciades per tots els altres termes.

- La comparació dels coeficients del model de solvatació amb l'addició dels descriptors iònics així com les correlacions establertes per a espècies parcialment ionitzades indiquen que el sistema cromatogràfic i skin PAMPA es troben propers entre si i propers al sistema biològic, no obstant, la interacció catiònica en el sistema biològic és diferent a la dels sistemes cromatogràfic i skin PAMPA.

#### **Amb relació a l'aplicació dels models predictius a la indústria farmacèutica**

- Els valors predits de  $\log K_p$  a partir del model cromatogràfic i el model skin-PAMPA per a 3 fàrmacs d'interès en el tractament del dolor (Compost 1, 2 i 5), són força coherents amb els obtinguts experimentalment mitjançant les cel·les de difusió de Franz. Això suggereix que els dos models són igual d'adequats per a la predicció dels coeficients de permeabilitat. No obstant, el principal avantatge del model cromatogràfic es que es pot determinar  $K_p$  a través de simples i econòmiques mesures cromatogràfiques. Per contra, no permet realitzar mesures a partir de formulacions semisòlides ni determinar paràmetres *in vitro* com el flux, cosa que el model skin PAMPA si ho permet.
- Els valors de flux obtinguts a partir dels experiments de difusió en cel·les de Franz, així com els valors del nivell sanguini terapèutic i el *clearance* sistèmic procedents dels experiments *in vivo*, permeten calcular l'àrea necessària per al desenvolupament d'un pegat transdèrmic. Els valors relativament baixos de l'àrea necessària de pegat del Compost 5 indiquen que aquest fàrmac podria ser un possible candidat per al desenvolupament d'un pegat transdèrmic per mitjà de promotors.

# REFERÈNCIES



- 
- [1] H.A.E. Benson, A.C. Watkinson, *Topical and Transdermal Drug Delivery*, 7th ed., John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2011. doi:10.1002/9781118140505.
- [2] <http://www.omnimedicalsearch.com>.
- [3] P.M. Elias, Epidermal Lipids, Membranes, and Keratinization, *Int. J. Dermatol.* 20 (1981) 1–19. doi:10.1111/j.1365-4362.1981.tb05278.x.
- [4] A.S. Michaels, S.K. Chandrasekaran, J.E. Shaw, Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement, *AIChE J.* 21 (1975) 985–996. doi:10.1002/aic.690210522.
- [5] J. Kielhorn, S. Melching-Kollmuss, I. Mangelsdorf, *Environmental Health Criteria 235: Dermal Absorption*, World Health Organization Press, Geneva, 2006.
- [6] J. Crank, The diffusion equations, in: *Math. Diffus.*, Clarendon Press, Oxford, 1975: pp. 1–10.
- [7] R.J. Scheuplein, I.H. Blank, G.J. Brauner, D.J. Macfarlane, Percutaneous Absorption of Steroids, *J. Invest. Dermatol.* 52 (1969) 63–70. doi:10.1038/jid.1969.9.
- [8] W.J. Pugh, I.T. Degim, J. Hadgraft, Epidermal permeability–penetrant structure relationships: 4, QSAR of permeant diffusion across human stratum corneum in terms of molecular weight, H-bonding and electronic charge, *Int. J. Pharm.* 197 (2000) 203–211. doi:10.1016/S0378-5173(00)00326-4.
- [9] W.J. Pugh, Epidermal permeability — Penetrant structure relationships: 3. The effect of hydrogen bonding interactions and molecular size on diffusion across the stratum corneum, *Int. J. Pharm.* 138 (1996) 149–165. doi:10.1016/0378-5173(96)04533-4.
- [10] B. Idson, Percutaneous Absorption, *J. Pharm. Sci.* 64 (1975) 901–924. doi:10.1002/jps.2600640604.
- [11] G.B. Kasting, R.L. Smith, E.R. Cooper, Effect of lipid solubility and molecular size on percutaneous absorption, *Ski. Pharmacol.* 1 (1987) 138–153.

- [12] G.L. Flynn, Mechanism of percutaneous absorption from physicochemical evidence, in: R.L. Bronaugh, H.I. Maibach (Eds.), *Percutaneous Absorpt.*, Marcel Dekker, New York, 1985: pp. 17–42.
- [13] G.L. Flynn, S.H. Yalkowsky, Correlation and Prediction of Mass Transport across Membranes I: Influence of Alkyl Chain Length on Flux-Determining Properties of Barrier and Diffusant, *J. Pharm. Sci.* 61 (1972) 838–852. doi:10.1002/jps.2600610603.
- [14] R.L. Bronaugh, E.R. Congdon, Percutaneous Absorption of Hair Dyes: Correlation with Partition Coefficients, *J. Invest. Dermatol.* 83 (1984) 124–127. doi:10.1111/1523-1747.ep12263302.
- [15] B.W. Barry, S.M. Harrison, P.H. Dugard, Vapour and liquid diffusion of model penetrants through human skin; correlation with thermodynamic activity, *J. Pharm. Pharmacol.* 37 (1985) 226–236. doi:10.1111/j.2042-7158.1985.tb05050.x.
- [16] B.D. Anderson, W.I. Higuchi, P.V. Raykar, Heterogeneity effects on permeability-partition coefficient relationships in human stratum corneum, *Pharm. Res.* 5 (1988) 566–573. doi:10.1023/a:1015989929342.
- [17] J. Hadgraft, C. Valenta, pH, pKa and dermal delivery, *Int. J. Pharm.* 200 (2000) 243–247. doi:10.1016/S0378-5173(00)00402-6.
- [18] M.S. Roberts, R.A. Anderson, J. Swarbrick, Permeability of human epidermis to phenolic compounds, *J. Pharm. Pharmacol.* 29 (1977) 677–683. doi:10.1111/j.2042-7158.1977.tb11434.x.
- [19] P. Singh, M.S. Roberts, Skin permeability and local tissue concentrations of nonsteroidal anti-inflammatory drugs after topical application, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268 (1994) 144–151.
- [20] S.D. Roy, G.L. Flynn, Transdermal Delivery of Narcotic Analgesics: pH, Anatomical, and Subject Influences on Cutaneous Permeability of Fentanyl and Sufentanil, *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* 7 (1990) 842–847. doi:10.1023/A:1015912932416.
- [21] R.C. Wester, H.I. Maibach, Importance of in vivo percutaneous absorption

- measurements, in: R.L. Bronaugh, H.I. Maibach (Eds.), *Percutaneous Absorpt. Drug-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, 3rd ed., Marcel Dekker, New York, 1999: pp. 215–227.
- [22] OECD 427: Guideline for the testing of chemicals. Skin absorption: in vivo method, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 2004.
- [23] OECD Guidance document for the conduct of skin absorption studies, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 2004.
- [24] OECD 428: Guideline for the testing of chemicals. Skin absorption: in vitro method, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 2004.
- [25] SCCNFP: Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers, 2003.
- [26] A.R. Eppler, M.E.K. Kraeling, R.R. Wickett, R.L. Bronaugh, Assessment of skin absorption and irritation potential of arachidonic acid and glyceryl arachidonate using in vitro diffusion cell techniques, *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 2109–2117. doi:10.1016/j.fct.2007.05.004.
- [27] D. Southwell, B.W. Barry, R. Woodford, Variations in permeability of human skin within and between specimens, *Int. J. Pharm.* 18 (1984) 299–309. doi:10.1016/0378-5173(84)90145-5.
- [28] K. Sauermann, S. Clemann, S. Jaspers, T. Gambichler, P. Altmeyer, K. Hoffmann, J. Ennen, Age related changes of human skin investigated with histometric measurements by confocal laser scanning microscopy in vivo, *Ski. Res. Technol.* 8 (2002) 52–56.
- [29] C.S. Leopold, H.I. Maibach, Effect of lipophilic vehicles on in vivo skin penetration of methyl nicotinate in different races, *Int. J. Pharm.* 139 (1996) 161–167. doi:10.1016/0378-5173(96)04562-0.
- [30] S.M. Harrison, B.W. Barry, P.H. Dugard, Effects of freezing on human skin permeability, *J. Pharm. Pharmacol.* 36 (1984) 261–262. doi:10.1111/j.2042-



- 7158.1984.tb04363.x.
- [31] G.B. Kasting, L.A. Bowman, Electrical analysis of fresh, excised human skin: a comparison with frozen skin, *Pharm. Res.* 7 (1990) 1141–1146. doi:10.1023/a:1015928225089.
- [32] R.C. Wester, J. Christoffel, T. Hartway, N. Poblete, H.I. Maibach, J. Forsell, Human cadaver skin viability for in vitro percutaneous absorption: storage and detrimental effects of heat-separation and freezing, *Pharm. Res.* 15 (1998) 82–84. doi:10.1023/a:1011904921318.
- [33] K.R. Brain, K.A. Walters, A.. Watkinson, Investigation of skin permeation, in: M.S. Roberts, K.A. Walters (Eds.), *Dermal Absorpt. Toxic. Assess.*, Marcel Dekker, New York, 1998: pp. 161–187.
- [34] K.R. Brain, V.J. James, K.A. Walters, eds., *Perspectives in percutaneous penetration*, STS Publishing, Cardiff, 1998.
- [35] D.R. Friend, In vitro skin permeation techniques, *J. Control. Release.* 18 (1992) 235–248. doi:10.1016/0168-3659(92)90169-R.
- [36] T.J. Franz, Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data, *J. Invest. Dermatol.* 64 (1975) 190–195. doi:10.1111/1523-1747.ep12533356.
- [37] <http://www.permeagear.com>.
- [38] R.L. Bronaugh, H.I. Maibach, Percutaneous Absorption of Nitroaromatic Compounds: In Vivo and In Vitro Studies in the Human and Monkey, *J. Invest. Dermatol.* 84 (1985) 180–183. doi:10.1111/1523-1747.ep12264716.
- [39] R.L. Bronaugh, Methods for in vitro percutaneous absorption, in: H. Zhai, H.I. Maibach (Eds.), *Dermatotoxicology*, 6th ed., CRC Press, New York, 2004: pp. 520–526.
- [40] S.J. Bashir, A.L. Chew, A. Anigbogu, F. Dreher, M. H.I, Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping, *Ski. Res. Technol.* 7 (2001) 40–48.
- [41] M.J. Choi, H. Zhai, H.I. Maibach, Tape Stripping method and stratum corneum, in: H. Zhai, H.I. Maibach (Eds.), *Dermatotoxicology*, CRC Press,

- Boca Raton (Florida), 2004: pp. 533–548.
- [42] H. Löffler, F. Dreher, H.I. Maibach, Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal, *Br. J. Dermatol.* 151 (2004) 746–752. doi:10.1111/j.1365-2133.2004.06084.x.
- [43] T. Loftsson, F. Konrádsdóttir, M. Másson, Development and evaluation of an artificial membrane for determination of drug availability, *Int. J. Pharm.* 326 (2006) 60–68. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.07.009.
- [44] G. Oliveira, A.E. Beezer, J. Hadgraft, M.E. Lane, Alcohol enhanced permeation in model membranes. Part I. Thermodynamic and kinetic analyses of membrane permeation, *Int. J. Pharm.* 393 (2010) 61–67. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.03.062.
- [45] G. Oliveira, A.E. Beezer, J. Hadgraft, M.E. Lane, Alcohol enhanced permeation in model membranes. Part II. Thermodynamic analysis of membrane partitioning, *Int. J. Pharm.* 420 (2011) 216–222. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.08.037.
- [46] G. Ottaviani, S. Martel, P.A. Carrupt, Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 3948–3954.
- [47] A. Engesland, M. Skar, T. Hansen, N. Škalko-basnet, G.E. Flaten, New Applications of Phospholipid Vesicle-Based Permeation Assay: Permeation Model Mimicking Skin Barrier, *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 1588–1600. doi:10.1002/jps.23509.
- [48] A. Engesland, N. Škalko-Basnet, G.E. Flaten, Phospholipid Vesicle-Based Permeation Assay and EpiSkin® in Assessment of Drug Therapies Destined for Skin Administration, *J. Pharm. Sci.* 104 (2015) 1119–1127. doi:10.1002/jps.24315.
- [49] B. Sinkó, J. Kökösi, A. Avdeef, K. Takács-Novák, A PAMPA Study of the Permeability-Enhancing Effect of New Ceramide Analogues, *Chem. Biodivers.* 6 (2009) 1867–1874. doi:10.1002/cbdv.200900149.
- [50] B. Sinkó, T.M. Garrigues, G.T. Balogh, Z.K. Nagy, O. Tsinman, A. Avdeef, K.

- Takács-Novák, Skin–PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration, *Eur. J. Pharm. Sci.* 45 (2012) 698–707. doi:10.1016/j.ejps.2012.01.011.
- [51] G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah, J.R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, *Pharm. Res.* 12 (1995) 413–420.
- [52] M. Kansy, F. Senner, K. Gubernator, Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 1007–1010. doi:10.1021/jm970530e.
- [53] A. Avdeef, *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State*, John Wiley & Sons, Inc, 2003.
- [54] A. Avdeef, S. Bendels, L. i. Di, B. Faller, M. Kansy, K. Sugano, Y. Yamauchi, PAMPA—critical factors for better predictions of absorption, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 2893–2909.
- [55] A. Avdeef, O. Tsinman, PAMPA—A drug absorption in vitro model, *Eur. J. Pharm. Sci.* 28 (2006) 43–50. doi:10.1016/j.ejps.2005.12.008.
- [56] O. Tsinman, K. Tsinman, N. Sun, A. Avdeef, Physicochemical Selectivity of the BBB Microenvironment Governing Passive Diffusion—Matching with a Porcine Brain Lipid Extract Artificial Membrane Permeability Model, *Pharm. Res.* 28 (2011) 337–363. doi:10.1007/s11095-010-0280-x.
- [57] <http://www.biotek.es>.
- [58] K. Sugano, H. Hamada, M. Machida, H. Ushio, K. Saitoh, K. Terada, Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay, *Int. J. Pharm.* 228 (2001) 181–188. doi:10.1016/S0378-5173(01)00845-6.
- [59] A. Avdeef, *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., 2012.
- [60] A. Avdeef, P.E. Nielsen, O. Tsinman, PAMPA-A drug absorption in vitro model 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates, *Eur. J. Pharm. Sci.* 22 (2004) 365–374.

- doi:10.1016/j.ejps.2004.04.009.
- [61] P. Berben, A. Bauer-Brandl, M. Brandl, B. Faller, G.E. Flaten, A.-C. Jacobsen, J. Brouwers, P. Augustijns, Drug permeability profiling using cell-free permeation tools: Overview and applications, *Eur. J. Pharm. Sci.* 119 (2018) 219–233. doi:10.1016/j.ejps.2018.04.016.
- [62] F. Wohnsland, B. Faller, High-Throughput Permeability pH Profile and High-Throughput Alkane/Water log P with Artificial Membranes, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 923–930. doi:10.1021/jm001020e.
- [63] A. Avdeef, M. Strafford, E. Block, M.P. Balogh, W. Chambliss, I. Khan, Drug absorption in vitro model: filter-immobilized artificial membranes, *Eur. J. Pharm. Sci.* 14 (2001) 271–280. doi:10.1016/S0928-0987(01)00191-9.
- [64] M. Bermejo, A. Avdeef, A. Ruiz, R. Nalda, J.A. Ruell, O. Tsinman, I. González, C. Fernández, G. Sánchez, T.M. Garrigues, V. Merino, PAMPA—a drug absorption in vitro model 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones, *Eur. J. Pharm. Sci.* 21 (2004) 429–441. doi:10.1016/j.ejps.2003.10.009.
- [65] B. Sinkó, G. Vizserálek, K. Takács-Novák, Skin PAMPA: Application in practice, *ADMET DMPK.* 2 (2015). doi:10.5599/admet.2.4.150.
- [66] L. Luo, A. Patel, B. Sinko, M. Bell, J. Wibawa, J. Hadgraft, M.E. Lane, A comparative study of the in vitro permeation of ibuprofen in mammalian skin, the PAMPA model and silicone membrane, *Int. J. Pharm.* 505 (2016) 14–19. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.03.043.
- [67] M. Clough, N. Richardson, N. Langley, K. Tsinman, O. Tsinman, Assessment of Transdermal Penetration Enhancement by Topical Pharmaceutical Excipients Using Skin PAMPA Method. (T2267) in AAPS Annual Meeting and Exposition, in: San Antonio, 2013.
- [68] G. Vizserálek, S. Berkó, G. Tóth, R. Balogh, M. Budai-Szucs, E. Csányi, B. Sinkó, K. Takács-Novák, Permeability test for transdermal and local therapeutic patches using Skin PAMPA method, *Eur. J. Pharm. Sci.* 76 (2015) 165–172. doi:10.1016/j.ejps.2015.05.004.

- [69] G. Vizserálek, T. Balogh, K. Takács-Novák, B. Sinkó, PAMPA study of the temperature effect on permeability, *Eur. J. Pharm. Sci.* 53 (2014) 45–49. doi:10.1016/j.ejps.2013.12.008.
- [70] P.H. Lee, R. Conradi, V. Shanmugasundaram, Development of an in silico model for human skin permeation based on a Franz cell skin permeability assay, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 69–73. doi:10.1016/j.bmcl.2009.11.039.
- [71] B.E. Vecchia, A. Bunge, Skin absorption databases and predictive equations, in: R. Guy, J. Hadgraft (Eds.), *Transdermal Drug Deliv.*, Marcel Dekker, New York, 2003: pp. 57–141.
- [72] Pion, Instruction Manual for PAMPA explorer Permeability Analyzer.
- [73] A. Avdeef, The rise of PAMPA, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 1 (2005) 325–342. doi:10.1517/17425255.1.2.325.
- [74] S. Geinoz, R.H. Guy, B. Testa, P.-A. Carrupt, Quantitative Structure-Permeation Relationships (QSPeRs) to Predict Skin Permeation: A Critical Evaluation, *Pharm. Res.* 21 (2004) 83–92. doi:10.1023/B:PHAM.0000012155.27488.2b.
- [75] H. Patel, W. ten Berge, M.T.D. Cronin, Quantitative structure–activity relationships (QSARs) for the prediction of skin permeation of exogenous chemicals, *Chemosphere.* 48 (2002) 603–613. doi:10.1016/S0045-6535(02)00114-5.
- [76] S. Mitragotri, Y.G. Anissimov, A.L. Bunge, H.F. Frasch, R.H. Guy, J. Hadgraft, G.B. Kasting, M.E. Lane, M.S. Roberts, Mathematical models of skin permeability: An overview, *Int. J. Pharm.* 418 (2011) 115–129. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.02.023.
- [77] A. Tezel, S. Mitragotri, On the origin of size-dependent tortuosity for permeation of hydrophilic solutes across the stratum corneum., *J. Control. Release.* 86 (2003) 183–186.
- [78] A. Wilschut, W.F. ten Berge, P.J. Robinson, T.E. McKone, Estimating skin permeation. The validation of five mathematical skin permeation models,

- Chemosphere. 30 (1995) 1275–1296. doi:10.1016/0045-6535(95)00023-2.
- [79] B.J. Neely, S.V. Madihally, R.L. Robinson Jr, K.A.M. Gasem, Nonlinear quantitative structure-property relationship modeling of skin permeation coefficient, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 4069–4084.
- [80] P. Buchwald, N. Bodor, A simple, predictive, structure-based skin permeability model, *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (2001) 1087–1098. doi:10.1211/0022357011776478.
- [81] D. Neumann, O. Kohlbacher, C. Merkwirth, T. Lengauer, A Fully Computational Model for Predicting Percutaneous Drug Absorption, *J. Chem. Inf. Model.* 46 (2006) 424–429. doi:10.1021/ci050332t.
- [82] M.J. Kamlet, R.M. Doherty, J.L.M. Abboud, M.H. Abraham, R.W. Taft, Solubility: a new look, *Chemtech.* 16 (1986) 566–576.
- [83] M. Vitha, P.W. Carr, The chemical interpretation and practice of linear solvation energy relationships in chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1126 (2006) 143–194. doi:10.1016/j.chroma.2006.06.074.
- [84] M.H. Abraham, Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and application to physicochemical and biochemical processes, *Chem. Soc. Rev.* 22 (1993) 73–83.
- [85] M.H. Abraham, The Permeation of Neutral Molecules, Ions, and Ionic Species Through Membranes: Brain Permeation as an Example, *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 1690–1701. doi:10.1002/jps.22404.
- [86] M.H. Abraham, W.E. Acree, Equations for the Transfer of Neutral Molecules and Ionic Species from Water to Organic phases, *J. Org. Chem.* 75 (2010) 1006–1015. doi:10.1021/jo902388n.
- [87] M.H. Abraham, W.E. Acree, Jr, The transfer of neutral molecules, ions and ionic species from water to ethylene glycol and to propylene carbonate; descriptors for pyridinium cations, *New J. Chem.* 34 (2010) 2298–2305. doi:10.1039/c0nj00222d.
- [88] M.H. Abraham, W.E. Acree, Descriptors for ions and ion-pairs for use in linear free energy relationships, *J. Chromatogr. A.* 1430 (2016) 2–14.

- doi:10.1016/j.chroma.2015.07.023.
- [89] M.H. Abraham, H.S. Chadha, F. Martins, R.C. Mitchell, M.W. Bradbury, J.A. Gratton, Hydrogen bonding part 46: a review of the correlation and prediction of transport properties by an LFER method: physicochemical properties, brain penetration and skin permeability, *Pestic. Sci.* 55 (1999) 78–88. doi:10.1002/(SICI)1096-9063(199901)55:1<78::AID-PS853>3.0.CO;2-7.
- [90] M.H. Abraham, H.S. Chadha, R.C. Mitchell, The Factors that Influence Skin Penetration of Solutes, *J. Pharm. Pharmacol.* 47 (1995) 8–16. doi:10.1111/j.2042-7158.1995.tb05725.x.
- [91] M.H. Abraham, F. Martins, R.C. Mitchell, Algorithms for Skin Permeability Using Hydrogen Bond Descriptors: the Problem of Steroids, *J. Pharm. Pharmacol.* 49 (1997) 858–865. doi:10.1111/j.2042-7158.1997.tb06126.x.
- [92] M.H. Abraham, F. Martins, Human Skin Permeation and Partition: General Linear Free-Energy Relationship Analyses, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 1508–1523. doi:10.1002/jps.20070.
- [93] K. Zhang, M. Chen, G.K.E. Scriba, M.H. Abraham, A. Fahr, X. Liu, Human Skin Permeation of Neutral Species and Ionic Species: Extended Linear Free Energy Relationship Analyses, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 2034–2044. doi:10.1002/jps.23086.
- [94] K. Zhang, M.H. Abraham, X. Liu, An equation for the prediction of human skin permeability of neutral molecules, ions and ionic species, *Int. J. Pharm.* 521 (2017) 259–266. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.02.059.
- [95] E. Fuguet, C. Ràfols, E. Bosch, M.H. Abraham, M. Rosés, Selectivity of single, mixed, and modified pseudostationary phases in electrokinetic chromatography, *Electrophoresis.* 27 (2006) 1900–1914. doi:10.1002/elps.200500464.
- [96] M.H. Abraham, M. Rosés, C.F. Poole, S.K. Poole, Hydrogen bonding. 42. Characterization of reversed-phase high-performance liquid chromatographic C18 stationary phases, *J. Phys. Org. Chem.* 10 (1997) 358–368. doi:10.1002/(SICI)1099-1395(199705)10:5<358::AID-POC907>3.0.CO;2-N.

- [97] C. Lepont, C.F. Poole, Retention characteristics of an immobilized artificial membrane column in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 946 (2002) 107–124. doi:10.1016/S0021-9673(01)01579-5.
- [98] S.K. Poole, C.F. Poole, Quantitative structure–retention (property) relationships in micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1182 (2008) 1–24. doi:10.1016/j.chroma.2007.12.080.
- [99] E. Fuguet, C. Ràfols, E. Bosch, M.H. Abraham, M. Rosés, Solute–solvent interactions in micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A.* 942 (2002) 237–248. doi:10.1016/S0021-9673(01)01383-8.
- [100] J. He, M.H. Abraham, W.E. Acree, Y.H. Zhao, A linear free energy analysis of PAMPA models for biological systems, *Int. J. Pharm.* 496 (2015) 717–722. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.10.064.
- [101] M.H. Abraham, H.S. Chadha, G.S. Whiting, R.C. Mitchell, Hydrogen Bonding. 32. An Analysis of Water-Octanol and Water-Alkane Partitioning and the  $\Delta\log P$  Parameter of Seiler, *J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 1085–1100. doi:10.1002/jps.2600830806.
- [102] E. Lázaro, C. Ràfols, M.H. Abraham, M. Rosés, Chromatographic Estimation of Drug Disposition Properties by Means of Immobilized Artificial Membranes (IAM) and C18 Columns, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 4861–4870. doi:10.1021/jm0602108.
- [103] M. Hidalgo-Rodríguez, E. Fuguet, C. Ràfols, M. Rosés, Modeling Nonspecific Toxicity of Organic Compounds to the Fathead Minnow Fish by Means of Chromatographic Systems, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3446–3452. doi:10.1021/ac2034453.
- [104] P. Agrafiotou, C. Ràfols, C. Castells, E. Bosch, M. Rosés, Simultaneous effect of pH, temperature and mobile phase composition in the chromatographic retention of ionizable compounds, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4995–5009. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.119.
- [105] J. Li, J. Sun, S. Cui, Z. He, Quantitative structure-retention relationship studies using immobilized artificial membrane chromatography I: Amended linear solvation energy relationships with the introduction of a molecular electronic



- factor, J. Chromatogr. A. 1132 (2006) 174–182. doi:10.1016/j.chroma.2006.07.073.
- [106] J. Li, J. Sun, Z. He, Quantitative structure–retention relationship studies with immobilized artificial membrane chromatography: II: Partial least squares regression, J. Chromatogr. A. 1140 (2007) 174–179. doi:10.1016/j.chroma.2006.11.091.
- [107] M. Hidalgo-Rodríguez, E. Fuguet, C. Ràfols, M. Rosés, Estimation of Biological Properties by Means of Chromatographic Systems: Evaluation of the Factors That Contribute to the Variance of Biological–Chromatographic Correlations, Anal. Chem. 82 (2010) 10236–10245. doi:10.1021/ac102626u.
- [108] R. Perkins, H. Fang, W. Tong, W.J. Welsh, Quantitative structure-activity relationship methods: Perspectives on drug discovery and toxicology, Environ. Toxicol. Chem. 22 (2003) 1666–1679. doi:10.1897/01-171.
- [109] K. Roy, On some aspects of validation of predictive quantitative structure–activity relationship models, Expert Opin. Drug Discov. 2 (2007) 1567–1577. doi:10.1517/17460441.2.12.1567.
- [110] A. Tropsha, P. Gramatica, V.K. Gombar, The Importance of Being Earnest: Validation is the Absolute Essential for Successful Application and Interpretation of QSPR Models, QSAR Comb. Sci. 22 (2003) 69–77. doi:10.1002/qsar.200390007.
- [111] A. Golbraikh, A. Tropsha, Beware of  $q^2$ !, J. Mol. Graph. Model. 20 (2002) 269–276. doi:10.1016/S1093-3263(01)00123-1.
- [112] M. Hidalgo-Rodríguez, S. Soriano-Meseguer, E. Fuguet, C. Ràfols, M. Rosés, Evaluation of the suitability of chromatographic systems to predict human skin permeation of neutral compounds, Eur. J. Pharm. Sci. 50 (2013) 557–568. doi:10.1016/j.ejps.2013.04.005.
- [113] M.H. Abraham, J.C. McGowan, The use of characteristic volumes to measure cavity terms in reversed phase liquid chromatography, Chromatographia. 23 (1987) 243–246.
- [114] C.F. Poole, The Essence of Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 2003.

- [115] C. Horvath, W. Melander, Liquid Chromatography with Hydrocarbonaceous Bonded Phases; Theory and Practice of Reversed Phase Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 393–404. doi:10.1093/chromsci/15.9.393.
- [116] J.L.M. van de Venne, J.L.H.M. Hendrikx, R.S. Deelder, Retention behaviour of carboxylic acids in reversed-phase column liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 167 (1978) 1–16. doi:10.1016/S0021-9673(00)91142-7.
- [117] P.J. Schoenmakers, R. Tijssen, Modelling retention of ionogenic solutes in liquid chromatography as a function of pH for optimization purposes, *J. Chromatogr. A.* 656 (1993) 577–590. doi:10.1016/0021-9673(93)80820-X.
- [118] J.E. Hardcastle, I. Jano, Determination of dissociation constants of polyprotic acids from chromatographic data, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 717 (1998) 39–56. doi:10.1016/S0378-4347(98)00256-4.
- [119] M. Rosés, I. Canals, H. Allemann, K. Siigur, E. Bosch, Retention of Ionizable Compounds on HPLC. 2. Effect of pH, Ionic Strength, and Mobile Phase Composition on the Retention of Weak Acids., *Anal. Chem.* 68 (1996) 4094–4100. doi:10.1021/ac960105d.
- [120] M. Rosés, E. Bosch, Influence of mobile phase acid-base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds, *J. Chromatogr. A.* 982 (2002) 1–30. doi:10.1016/S0021-9673(02)01444-9.
- [121] M. Rosés, Determination of the pH of binary mobile phases for reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1037 (2004) 283–298. doi:10.1016/j.chroma.2003.12.063.
- [122] I. Canals, J.A. Portal, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionizable compounds on HPLC. 4. Mobile-phase pH measurement in methanol/water, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1802–1809. doi:10.1021/ac990943i.
- [123] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Retention of Ionizable Compounds on HPLC. 5. pH Scales and the Retention of Acids and Bases with Acetonitrile–Water Mobile Phases, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5193–5200. doi:10.1021/ac000591b.
- [124] J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Assignment of reference pH-values to primary

- standard buffer solutions for standardization of potentiometric sensors in acetonitrile-water mixtures, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 353 (1995) 148–155. doi:10.1007/BF00322949.
- [125] D. Sýkora, E. Tesarová, M. Popl, Interactions of basic compounds in reversed-phase high-performance liquid chromatography. Influence of sorbent character, mobile phase composition, and pH on retention of basic compounds, *J. Chromatogr. A.* 758 (1997) 37–51. doi:10.1016/S0021-9673(96)00691-7.
- [126] R. Bergés, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, Modelling retention in liquid chromatography as a function of solvent composition and pH of the mobile phase, *J. Chromatogr. A.* 869 (2000) 27–39. doi:10.1016/S0021-9673(99)00915-2.
- [127] J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Alvarez-Coque, Some observations on the prediction of retention in reversed-phase liquid chromatography using the pH as main factor, *Anal. Chim. Acta.* 521 (2004) 61–68. doi:10.1016/j.aca.2004.05.035.
- [128] N. Sanli, G. Fonrodona, J. Barbosa, G.A. Özkan, J.L. Beltran, Modelling retention in liquid chromatography of polyphenolic acids: Prediction of solvent composition and pH of the mobile phase, *Anal. Chim. Acta.* 537 (2005) 53–61. doi:10.1016/j.aca.2005.01.006.
- [129] J.K. Törnblom, T.F.W. Bureyko, C.D. MacKinnon, Simulating phenol high-performance liquid chromatography retention times as the pH changes: Mobile phase pH versus buffer pH, *J. Chromatogr. A.* 1095 (2005) 68–73. doi:10.1016/j.chroma.2005.07.115.
- [130] I. Canals, F.Z. Oumada, M. Rosés, E. Bosch, Retention of ionizable compounds on HPLC. 6. pH measurements with the glass electrode in methanol–water mixtures, *J. Chromatogr. A.* 911 (2001) 191–202. doi:10.1016/S0021-9673(00)01271-1.
- [131] L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch,  $\delta$  conversion parameter between pH scales (WSpH and SSPH) in acetonitrile/water mixtures at various compositions and temperatures, *Anal. Chem.* 79 (2007)

- 3180–3187. doi:10.1021/ac062372h.
- [132] M. Rosés, X. Subirats, E. Bosch, Retention models for ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography. Effect of variation of mobile phase composition and temperature, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 1756–1775. doi:10.1016/j.chroma.2008.12.042.
- [133] J.A.G. Domínguez, J.C. Díez-Masa, Part A. Hold-up volume concept in column chromatography, *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 969–981.
- [134] Y. V. Kazakevich, H.M. McNair, Thermodynamic Definition of HPLC Dead Volume, *J. Chromatogr. Sci.* 31 (1993) 317–322. doi:10.1093/chromsci/31.8.317.
- [135] R.M. McCormick, B.L. Karger, Distribution Phenomena Of Mobile-Phase Components And Determination Of Dead Volume In Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 52 (1980) 2249–2257. doi:10.1021/ac50064a005.
- [136] C.A. Rimmer, C.R. Simmons, J.G. Dorsey, The measurement and meaning of void volumes in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 965 (2002) 219–232. doi:10.1016/S0021-9673(02)00730-6.
- [137] G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-puchony, J. Inczédy, On the Determination of the Hold-Up Time in Reversed Phase Liquid Chromatography, *J. Liq. Chromatogr.* 3 (1980) 1669–1686. doi:10.1080/01483918008064759.
- [138] E. Bosch, P. Bou, H. Allemann, M. Rosés, Retention of Ionizable Compounds on HPLC. pH Scale in Methanol–Water and the pKa and pH Values of Buffers, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3651–3657. doi:10.1021/ac960104l.
- [139] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionizable compounds on high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 945 (2002) 83–96. doi:10.1016/S0021-9673(01)01486-8.
- [140] M.H. Abraham, Personal communication, (2019).
- [141] Bio-Loom, 2017. BioByte Corp. Claremont, CA, USA. www.biobyte.com.

- [142] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionizable compounds in high-performance liquid chromatography 14. Acid-base pK values in acetonitrile-water mobile phases, *J. Chromatogr. A.* 964 (2002) 55–66. doi:10.1016/S0021-9673(02)00558-7.
- [143] ACD/Percepta, [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com), Advanced Chemistry Development, Inc., Release (Build 2726, 5 359 May 2014).
- [144] H. Wan, A.G. Holmén, Y. Wang, W. Lindberg, M. Englund, M.B. Någård, R.A. Thompson, High-throughput screening of pKa values of pharmaceuticals by pressure-assisted capillary electrophoresis and mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 2639–2648. doi:10.1002/rcm.1229.
- [145] J.M. Cabot, E. Fuguet, M. Rosés, Determination of acidity constants of sparingly soluble drugs in aqueous solution by the internal standard capillary electrophoresis method, *Electrophoresis.* 35 (2014) 3564–3569. doi:10.1002/elps.201400353.
- [146] A. Port, M. Bordas, R. Enrech, R. Pascual, M. Rosés, C. Ràfols, X. Subirats, E. Bosch, Critical comparison of shake-flask, potentiometric and chromatographic methods for lipophilicity evaluation ( $\log P_{o/w}$ ) of neutral, acidic, basic, amphoteric, and zwitterionic drugs, *Eur. J. Pharm. Sci.* 122 (2018) 331–340. doi:10.1016/j.ejps.2018.07.010.
- [147] F. Rived, M. Rosés, E. Bosch, Dissociation constants of neutral and charged acids in methyl alcohol. The acid strength resolution, *Anal. Chim. Acta.* 374 (1998) 309–324. doi:10.1016/S0003-2670(98)00418-8.
- [148] J.M. Cabot, E. Fuguet, C. Ràfols, M. Rosés, Determination of acidity constants by the capillary electrophoresis internal standard method. IV. Polyprotic compounds, *J. Chromatogr. A.* 1279 (2013) 108–116. doi:10.1016/j.chroma.2013.01.018.
- [149] H. Baba, J. Takahara, H. Mamitsuka, In Silico Predictions of Human Skin Permeability using Nonlinear Quantitative Structure–Property Relationship Models, *Pharm. Res.* 32 (2015) 2360–2371. doi:10.1007/s11095-015-1629-y.
- [150] <http://www.pion-inc.com>.

- [151] M. Nakamura, K. Tamura, S. Murakami, Isotope effects on thermodynamic properties: mixtures of  $x(\text{D}_2\text{O}$  or  $\text{H}_2\text{O}) + (1 - x)\text{CH}_3\text{CN}$  at 298.15 K, *Thermochim. Acta.* 253 (1995) 127–136. doi:10.1016/0040-6031(94)02086-4.
- [152] J. V. Herráez, R. Belda, Refractive indices, densities and excess molar volumes of monoalcohols + water, *J. Solution Chem.* 35 (2006) 1315–1328. doi:10.1007/s10953-006-9059-4.
- [153] M. Hidalgo-Rodríguez, Estimació de propietats de biopartició mitjançant mesures cromatogràfiques, Universitat de Barcelona, 2013.
- [154] A. Méndez, E. Bosch, M. Rosés, U.D. Neue, Comparison of the acidity of residual silanol groups in several liquid chromatography columns, *J. Chromatogr. A.* 986 (2003) 33–44. doi:10.1016/S0021-9673(02)01899-X.
- [155] M.K. Chantooni, I.M. Kolthoff, Resolution of acid strength in tert-butyl alcohol and isopropyl alcohol of substituted benzoic acids, phenols, and aliphatic carboxylic acids, *Anal. Chem.* 51 (1979) 133–140. doi:10.1021/ac50037a039.
- [156] R. Lieckfeldt, J. Villalaín, J.C. Gómez-Fernández, G. Lee, Apparent pKa of the fatty acids within ordered mixtures of model human stratum corneum lipids, *Pharm. Res.* 12 (1995) 1614–1617.



**ANNEXOS**





# **ANNEX 1**



**Annex 1.** Valors dels descriptors moleculars d'Abraham de cada solut (E, S, A, B, V, J<sup>+</sup>, J<sup>-</sup>), els coeficients de partició octanol/aigua (log P<sub>o/w</sub>) i les constants de dissociació àcid-base en aigua (pK<sub>a</sub>).

Soluts	log K <sub>p</sub> <sup>a</sup>	E <sup>c</sup>	S <sup>c</sup>	A <sup>c</sup>	B <sup>c</sup>	V <sup>c</sup>	J <sup>+</sup> c	J <sup>-</sup> c	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	log P <sub>o/w</sub> <sup>f</sup>
2,4-Diclorofenol	-4.30	0.960	0.82	0.54	0.17	1.0199	0.0000	0.0000	7.89 <sup>d</sup>	-	3.06
2,4-Diclorofenol, anió	-	1.110	4.45	0.00	2.49	0.9984	0.0000	2.7500	-	-	-
2-Amino-4-nitrofenol	-6.54	1.415	1.95	1.01	0.43	1.0491	0.0000	0.0000	2.62 <sup>e</sup>	6.82 <sup>e</sup>	1.53
2-Clorofenol	-4.56	0.853	0.88	0.32	0.31	0.8975	0.0000	0.0000	8.48 <sup>d</sup>	-	2.15
2-Clorofenol, anió	-	1.003	2.98	0.00	2.20	0.8760	0.0000	1.7600	-	-	-
2-Feniletanol	-5.20	0.811	0.82	0.31	0.66	1.0569	0.0000	0.0000	-	-	1.36
2-Isopropil-5-Metilfenol (timol)	-4.35	0.822	0.80	0.43	0.44	1.3387	0.0000	0.0000	10.50 <sup>d</sup>	-	3.30
2-Isopropil-5-Metilfenol (timol), anió	-	0.972	2.52	0.00	2.29	1.3172	0.0000	1.5161	-	-	-
2-Naftol	-4.65	1.520	1.08	0.61	0.40	1.1441	0.0000	0.0000	9.57 <sup>d</sup>	-	2.70
2-Naftol, anió	-	1.670	6.55	0.00	3.00	1.1226	0.0000	3.5335	-	-	-
2-Nitrofenol	-4.08	1.015	1.05	0.05	0.37	0.9493	0.0000	0.0000	7.23 <sup>d</sup>	-	1.79
2-Nitrofenol, anió	-	1.165	2.95	0.00	2.20	0.9278	0.0000	1.7200	-	-	-
2-Nitro-p-fenilendiamina	-6.66	1.525	2.05	0.35	0.70	1.0902	0.0000	0.0000	4.36 <sup>e</sup>	-	0.53
2-Toluidina	-	0.966	0.92	0.23	0.45	0.9571	0.0000	0.0000	4.45 <sup>f</sup>	-	1.32
3-Metilfenol (m-cresol)	-4.89	0.822	0.88	0.57	0.34	0.9160	0.0000	0.0000	10.00 <sup>g</sup>	-	1.96
3-Nitrofenol	-5.33	1.050	1.57	0.79	0.23	0.9493	0.0000	0.0000	8.35 <sup>d</sup>	-	2.00
3-Nitrofenol, anió	-	0.972	2.80	0.00	2.10	0.8945	0.0000	1.6100	-	-	-
3-Xilè	-	0.623	0.52	0.00	0.16	0.9982	0.0000	0.0000	-	-	3.20
4-Amino-2-nitrofenol	-5.91	1.360	1.50	0.30	0.66	1.0491	0.0000	0.0000	3.60 <sup>d</sup>	7.59 <sup>d</sup>	0.96
4-Bromofenol	-4.52	1.080	1.17	0.67	0.19	0.9501	0.0000	0.0000	9.35 <sup>d</sup>	-	2.59
4-Bromofenol, anió	-	1.230	3.50	0.00	2.46	0.9286	0.0000	2.300	-	-	-
4-Cloro-3-metilfenol (4-cloro-cresol)	-4.34	0.920	0.99	0.67	0.22	1.0384	0.0000	0.0000	9.27 <sup>d</sup>	-	3.10
4-Clorofenol	-4.52	0.915	1.08	0.67	0.20	0.8975	0.0000	0.0000	9.38 <sup>d</sup>	-	2.39
4-Clorofenol, anió	-	1.065	2.95	0.00	2.38	0.8760	0.0000	2.0200	-	-	-
4-Etilfenol	-4.53	0.800	0.90	0.55	0.36	1.0569	0.0000	0.0000	10.20 <sup>d</sup>	-	2.47
4-Etilfenol, anió	-	0.950	2.84	0.00	2.27	1.0354	0.0000	1.6602	-	-	-
4-Hidroxifenilacetamida	-6.89	1.180	2.08	0.84	0.94	1.1724	0.0000	0.0000	9.99 <sup>e</sup>	-	-0.09

(Continuació Annex 1)

Soluts	log K <sub>p</sub> <sup>a</sup>	E <sup>c</sup>	S <sup>c</sup>	A <sup>c</sup>	B <sup>c</sup>	V <sup>c</sup>	J <sup>+c</sup>	J <sup>-c</sup>	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	log P <sub>ow</sub> <sup>f</sup>
4-Hidroxi-metilfenilacetat	-5.26	0.908	1.46	0.59	0.68	1.2722	0.0000	0.0000	-	-	0.45
4-Metilfenol (p-cresol)	-4.83	0.820	0.87	0.57	0.31	0.9160	0.0000	0.0000	10.26 <sup>d</sup>	-	1.94
4-Metilfenol (p-cresol), anió	-	0.970	2.75	0.00	2.10	0.8945	0.0000	1.6560	-	-	-
4-Nitrofenol	-5.33	1.070	1.72	0.82	0.26	0.9493	0.0000	0.0000	7.15 <sup>d</sup>	-	1.91
4-Nitrofenol, anió	-	1.220	4.85	0.00	2.09	0.9278	0.0000	2.2000	-	-	-
5-Fluorouracil	-6.82	0.720	0.84	0.57	1.02	0.7693	0.0000	0.0000	7.86 <sup>d</sup>	-	-0.89
8-Metoxipsoralè	-5.12	1.611	1.70	0.00	0.80	1.4504	0.0000	0.0000	-	-	2.07
Àcid 2-hidroxibenzoic (àcid salicílic)	-5.07	0.900	0.85	0.73	0.37	0.9904	0.0000	0.0000	2.98 <sup>f</sup>	-	2.26
Àcid 2-hidroxibenzoic (àcid salicílic), anió	-7.04	1.050	3.51	0.14	2.18	0.9689	0.0000	1.6351	-	-	-
Àcid 4-hidroxifenilacètic	-6.16	1.030	1.45	0.94	0.74	1.1313	0.0000	0.0000	4.50 <sup>e</sup>	10.19 <sup>e</sup>	0.75
Àcid 5,5-dietilbarbitúric (barbital)	-7.29	1.030	1.00	0.58	1.12	1.3739	0.0000	0.0000	7.97 <sup>d</sup>	-	0.65
Àcid 5-etil-5-fenilbarbitúric (fenobarbital)	-6.68	1.630	1.72	0.71	1.18	1.6999	0.0000	0.0000	7.44 <sup>d</sup>	-	1.47
Àcid 5-etil-5-fenilbarbitúric (fenobarbital), anió	-	1.780	4.90	0.07	3.77	1.6784	0.0000	2.4878	-	-	-
Àcid benzoic	-5.68	0.730	0.90	0.59	0.40	0.9317	0.0000	0.0000	4.20 <sup>f</sup>	-	1.87
Àcid benzoic, anió	-	0.880	3.64	0.00	2.88	0.9102	0.0000	2.3950	-	-	-
Alcohol 4-hidroxibenzílic	-6.26	0.998	1.30	0.86	0.79	0.9747	0.0000	0.0000	9.82 <sup>f</sup>	-	0.25
Alcohol benzílic	-5.30	0.803	0.87	0.39	0.56	0.9160	0.0000	0.0000	-	-	1.10
Aminopirina	-6.55	1.680	1.74	0.00	1.60	1.8662	0.0000	0.0000	5.00 <sup>f</sup>	-	0.80
Anilina	-4.94	0.955	0.96	0.26	0.41	0.8162	0.0000	0.0000	4.60 <sup>h</sup>	-	0.90
Anilina, catió	-	0.805	1.62	1.93	0.00	0.8377	0.6200	0.0000	-	-	-
Antipirina	-7.74 <sup>b</sup>	1.300	1.83	0.00	1.37	1.4846	0.0000	0.0000	-	-	0.23
Aspirina (àcid acetilsalicílic)	-5.50	0.781	1.69	0.71	0.67	1.2879	0.0000	0.0000	3.48 <sup>f</sup>	-	1.19
Aspirina, anió	-	1.000	4.15	0.00	3.28	1.2664	0.0000	2.2560	-	-	-
Atrazina	-5.56 <sup>b</sup>	1.220	1.29	0.17	1.01	1.6196	0.0000	0.0000	-	-	2.61
Atropina	-7.15	1.200	1.58	0.26	1.73	2.2820	0.0000	0.0000	9.60 <sup>d</sup>	-	1.83
Atropina, catió	-	1.050	5.40	2.19	0.00	2.3035	2.3363	0.0000	-	-	-
Benzaldehid	-4.51	0.820	1.00	0.00	0.39	0.8730	0.0000	0.0000	-	-	1.47
Benzè	-4.27	0.610	0.52	0.00	0.14	0.7164	0.0000	0.0000	-	-	2.13
Benzil nicotinat	-4.87	1.262	1.38	0.00	0.85	1.6393	0.0000	0.0000	3.16 <sup>e</sup>	-	2.40
Cafeïna	-6.85	1.500	1.82	0.08	1.25	1.3632	0.0000	0.0000	-	-	-0.07

(Continuació Annex 1)

<b>Soluts</b>	<b>log K<sub>p</sub><sup>a</sup></b>	<b>E<sup>c</sup></b>	<b>S<sup>c</sup></b>	<b>A<sup>c</sup></b>	<b>B<sup>c</sup></b>	<b>V<sup>c</sup></b>	<b>J<sup>+c</sup></b>	<b>J<sup>-c</sup></b>	<b>pK<sub>a1</sub></b>	<b>pK<sub>a2</sub></b>	<b>log P<sub>o/w</sub><sup>f</sup></b>
Capsaïcina	-	1.250	2.19	0.57	1.45	2.5971	0.0000	0.0000	9.76 <sup>e</sup>	-	3.04
Catecol	-5.87	0.970	1.10	0.88	0.47	0.8338	0.0000	0.0000	9.45 <sup>d</sup>	-	0.88
Clorfeniramina	-5.93	1.465	1.41	0.00	1.33	2.2098	0.0000	0.0000	3.64 <sup>i</sup>	9.27 <sup>i</sup>	3.17
Clorfeniramina, catió	-	1.315	4.35	1.85	0.00	2.2313	2.2856	0.0000	-	-	-
Codeïna	-6.57	2.160	2.14	0.14	1.80	2.2057	0.0000	0.0000	8.21 <sup>f</sup>	-	1.19
Codeïna, catió	-10.01	1.810	5.72	2.48	0.00	2.2272	2.8717	0.0000	-	-	-
Cortexolona	-7.20	1.910	3.45	0.36	1.60	2.7389	0.0000	0.0000	-	-	2.52
Corticosterona	-6.84	1.860	3.43	0.40	1.63	2.7389	0.0000	0.0000	-	-	1.94
Cortisona	-7.38	1.960	3.50	0.36	1.87	2.7546	0.0000	0.0000	-	-	1.47
Cumè	-	0.602	0.49	0.00	0.16	1.1391	0.0000	0.0000	-	-	3.66
Dexametasona	-7.27	2.040	3.51	0.71	1.92	2.9132	0.0000	0.0000	-	-	1.74
Diclofenac	-5.30	1.810	1.85	0.55	0.77	2.0250	0.0000	0.0000	4.21 <sup>j</sup>	-	4.50
Diclofenac, anió	-7.00	1.960	5.31	0.03	3.35	2.0035	0.0000	2.6243	-	-	-
Dietilcarbamazina	-6.15	0.645	1.30	0.00	1.55	1.7241	0.0000	0.0000	7.15 <sup>e</sup>	-	1.62
Digitoxina	-8.15	3.460	5.63	1.33	4.35	5.6938	0.0000	0.0000	-	-	2.83
Efedrina	-5.50	0.916	0.74	0.21	1.21	1.4385	0.0000	0.0000	9.71 <sup>d</sup>	-	0.93
Efedrina, catió	-	0.766	3.74	1.38	0.00	1.4600	1.9412	0.0000	-	-	-
Escopolamina	-7.58	1.686	1.32	0.09	2.17	2.2321	0.0000	0.0000	7.55 <sup>d</sup>	-	0.55
Escopolamina, catió	-	1.536	6.34	1.64	0.00	2.2536	3.5261	0.0000	-	-	-
Estradiol	-5.61	1.800	1.77	0.86	1.10	2.1988	0.0000	0.0000	10.27 <sup>e</sup>	-	4.01
Estriol	-7.95 <sup>b</sup>	1.970	1.74	1.06	1.63	2.2575	0.0000	0.0000	10.25 <sup>e</sup>	-	2.54
Estrona	-5.52	1.730	2.05	0.50	1.08	2.1558	0.0000	0.0000	10.25 <sup>e</sup>	-	3.13
Etilbenzè	-3.00	0.613	0.51	0.00	0.15	0.9982	0.0000	0.0000	-	-	3.15
Famotidina	-8.15	2.690	2.14	1.20	2.50	2.2617	0.0000	0.0000	-	-	-0.80
Famotidina, catió	-	2.540	7.52	2.50	0.00	2.2832	4.2532	0.0000	-	-	-
Fenol	-5.27	0.805	0.89	0.60	0.30	0.7751	0.0000	0.0000	9.98 <sup>g</sup>	-	1.47
Fenol, anió	-	0.955	2.80	0.00	2.12	0.7536	0.0000	1.6760	-	-	-
Fentanil	-5.81	1.830	1.75	0.00	1.81	2.8399	0.0000	0.0000	8.43 <sup>d</sup>	-	3.89
Fentanil, catió	-8.21	1.680	5.67	2.22	0.00	2.8615	2.8615	0.0000	-	-	-
Fluocinonida	-6.33	1.950	2.48	0.31	2.51	3.4601	0.0000	0.0000	-	-	3.19

(Continuació Annex 1)

Soluts	log K <sub>p</sub> <sup>a</sup>	E <sup>c</sup>	S <sup>c</sup>	A <sup>c</sup>	B <sup>c</sup>	V <sup>c</sup>	J <sup>+c</sup>	J <sup>-c</sup>	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	log P <sub>o/w</sub> <sup>f</sup>
Flurbiprofèn	-4.72	1.440	1.45	0.62	0.76	1.8389	0.0000	0.0000	4.19 <sup>k</sup>	-	4.16
Flurbiprofèn, anió	-6.36	1.590	4.56	0.07	3.36	1.8174	0.0000	2.5383	-	-	-
Griseofulvina	-6.44	1.750	2.64	0.00	1.44	2.3947	0.0000	0.0000	-	-	2.18
Hidrocortisona	-7.22	2.030	3.49	0.71	1.90	2.7976	0.0000	0.0000	-	-	1.61
Hidroquinona	-6.31	1.063	1.27	1.06	0.57	0.8338	0.0000	0.0000	-	-	0.59
Hidroxiprogesterona	-6.30	1.640	3.35	0.25	1.31	2.6802	0.0000	0.0000	-	-	3.17
Ibuprofèn	-4.58	0.730	0.70	0.57	0.79	1.7771	0.0000	0.0000	4.43 <sup>j</sup>	-	3.50
Ibuprofèn, anió	-6.15	0.880	3.50	0.08	3.31	1.7556	0.0000	2.4188	-	-	-
Indometacina	-5.39	2.240	1.47	0.58	1.43	2.5299	0.0000	0.0000	4.15 <sup>j</sup>	-	4.27
Indometacina, anió	-7.22	2.390	5.62	0.10	4.38	2.5084	0.0000	2.9899	-	-	-
Isoquinolina	-5.11	1.211	1.00	0.00	0.54	1.0443	0.0000	0.0000	5.36 <sup>d</sup>	-	2.08
Ketoprofèn	-5.22	1.650	2.26	0.55	0.89	1.9779	0.0000	0.0000	4.29 <sup>f</sup>	-	3.12
Ketoprofèn, anió	-6.84	1.800	5.49	0.01	3.39	1.9564	0.0000	2.4851	-	-	-
Ketorolac	-5.60	1.600	2.03	0.65	1.05	1.8712	0.0000	0.0000	3.50 <sup>d</sup>	-	1.68
Ketorolac, anió	-	1.750	5.20	0.05	3.60	1.8497	0.0000	2.4776	-	-	-
Lidocaïna	-5.51	1.110	1.51	0.07	1.24	2.0589	0.0000	0.0000	7.96 <sup>j</sup>	-	2.21
Lidocaïna, catió	-7.42	0.960	4.18	2.12	0.00	2.0804	1.7490	0.0000	-	-	-
Metil 4-hidroxibenzoat	-5.12	0.930	1.46	0.71	0.46	1.1313	0.0000	0.0000	8.37 <sup>f</sup>	-	1.96
Metil fenil èter (anisole)	-4.68	0.708	0.75	0.00	0.29	0.9160	0.0000	0.0000	-	-	2.11
Morfina	-7.24	2.230	1.30	0.39	2.01	2.0648	0.0000	0.0000	8.18 <sup>d</sup>	9.26 <sup>d</sup>	0.89
Morfina, catió	-	1.970	5.95	1.25	0.00	2.0863	3.9413	0.0000	-	-	-
N,N-Dimetilanilina	-	0.957	0.81	0.00	0.41	1.0980	0.0000	0.0000	5.07 <sup>d</sup>	-	2.31
N,N-Dimetilanilina, catió	-	0.807	2.00	0.96	0.00	1.1195	1.0483	0.0000	-	-	-
Naproxèn	-4.97	1.510	2.02	0.60	0.67	1.7821	0.0000	0.0000	4.28 <sup>l</sup>	-	3.34
Naproxèn, anió	-6.53	1.660	5.07	0.02	3.11	1.7606	0.0000	2.4261	-	-	-
Nicotina	-5.34	0.865	0.88	0.00	1.09	1.3710	0.0000	0.0000	3.13 <sup>j</sup>	8.24 <sup>j</sup>	1.17
Nicotina, catió	-	0.715	3.52	1.27	0.00	1.3925	1.8345	0.0000	-	-	-
o-Fenilendiamina	-6.70	1.260	1.40	0.24	0.73	0.9160	0.0000	0.0000	4.80 <sup>f</sup>	-	0.15
Oxicodona	-6.43	2.320	2.50	0.29	1.91	2.2644	0.0000	0.0000	7.60 <sup>e</sup>	-	1.01
p-Fenilendiamina	-6.98	1.300	1.66	0.44	0.83	0.9160	0.0000	0.0000	2.89 <sup>d</sup>	6.16 <sup>d</sup>	-0.30

(Continuació Annex 1)

Soluts	log K <sub>p</sub> <sup>a</sup>	E <sup>c</sup>	S <sup>c</sup>	A <sup>c</sup>	B <sup>c</sup>	V <sup>c</sup>	J <sup>+c</sup>	J <sup>-c</sup>	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	log P <sub>ow</sub> <sup>f</sup>
Piridina	-	0.631	0.84	0.00	0.52	0.6753	0.0000	0.0000	5.16 <sup>d</sup>	-	0.65
Piridina, catió	-	0.481	2.25	1.21	0.00	0.6968	1.0450	0.0000	-	-	-
Piroxicam	-6.02	2.560	2.90	0.17	1.49	2.2500	0.0000	0.0000	2.33 <sup>d</sup>	5.07 <sup>d</sup>	1.78
Piroxicam, anió	-7.50	2.710	6.81	0.00	3.78	2.2285	0.0000	2.7356	-	-	-
Prednisolona	-7.91	2.210	3.10	0.71	1.92	2.7546	0.0000	0.0000	-	-	1.42
Pregnenolona	-5.90	1.360	3.29	0.32	1.18	2.6645	0.0000	0.0000	-	-	4.22
Progesterona	-4.90	1.450	3.29	0.00	1.14	2.6215	0.0000	0.0000	-	-	3.87
Propranolol	-6.05	1.840	1.43	0.44	1.31	2.1480	0.0000	0.0000	9.57 <sup>j</sup>	-	2.98
Propranolol, catió	-7.50	1.690	4.31	2.07	0.00	2.1695	2.4319	0.0000	-	-	-
Ranitidina	-7.41	1.600	1.63	0.25	2.33	2.3985	0.0000	0.0000	2.18 <sup>l</sup>	8.38 <sup>l</sup>	1.03
Ranitidina, catió	-	1.450	6.87	2.13	0.00	2.4200	3.3742	0.0000	-	-	-
Resorcinol	-6.70	0.980	1.11	1.09	0.52	0.8338	0.0000	0.0000	9.81 <sup>g</sup>	-	0.80
Sufentanil	-5.53	1.800	2.28	0.00	1.91	3.1051	0.0000	0.0000	8.01 <sup>f</sup>	-	3.95
Sufentanil, catió	-8.11	1.650	6.16	3.02	0.00	3.1266	2.5848	0.0000	-	-	-
Testosterona	-5.54	1.540	2.56	0.32	1.17	2.3827	0.0000	0.0000	-	-	3.32
Toluè	-3.64	0.601	0.52	0.00	0.14	0.8573	0.0000	0.0000	-	-	2.73
Tramadol	-	1.230	1.15	0.31	1.30	2.2340	0.0000	0.0000	9.37 <sup>d</sup>	-	2.63
Tramadol, catió	-	1.200	4.56	1.50	0.00	2.2555	2.5348	0.0000	-	-	-
Warfarina	-	1.980	1.88	0.29	1.57	2.3077	0.0000	0.0000	5.01 <sup>l</sup>	-	2.70
Warfarina, anió	-	2.130	5.62	0.00	4.40	2.2862	0.0000	2.7620	-	-	-

<sup>a</sup> Ref. [94]; <sup>b</sup> Ref. [71]; <sup>c</sup> Ref. [140]; <sup>d</sup> Ref. [143]; <sup>e</sup> Valors calculats Ref. [143]; <sup>f</sup> Ref. [141]; <sup>g</sup> Ref. [142]; <sup>h</sup> Ref. [147]; <sup>i</sup> Ref. [148]; <sup>j</sup> Ref. [144]; <sup>k</sup> Ref. [145]; <sup>l</sup> Ref. [146]





# **ANNEX 2**



**D. Fernando A. Verdú Pascual**, Profesor Titular de Medicina Legal y Forense, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

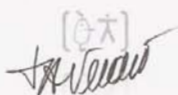
CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 8 de noviembre de 2013, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado:

*"Evaluación percutánea de fármacos aplicables en formulaciones dermocosméticas"*, número de procedimiento H1381683846659, cuya investigadora responsable es Dña. Teresa Mª Garrigues Pelufo,

ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a once de noviembre de dos mil trece.



FERNANDO ALEJO|  
VERDÚ|PASCUAL  
2013.11.11 09:30:07  
+01'00'



# **ANNEX 3**



**D. José María Montiel Company**, Profesor Contratado Doctor del departamento de Estomatología, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 8 de noviembre de 2018, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado:

*"Estudio de la absorción de activos cosméticos y farmacéuticos a través de piel humana y porcina"*  
número de procedimiento H1540295606992

cuyo responsable es D<sup>a</sup> Ana Melero Zaera

ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a doce de noviembre de dos mil dieciocho.







# **ANNEX 4**



**Annex 4.** Valors dels temps de retenció mesurats a diferents valors de pH de la fase mòbil ( $s_w$ pH, 40 % acetonitril) amb una columna Kinetex Evo C18 (2.6  $\mu$ m de mida de partícula, 4.6 x 100 mm). A tots els temps de retenció mesurats se'ls ha restat el temps extracolumna.

Soluts	$t_R$ (min)					
	$s_w$ pH=2.16	$s_w$ pH=3.55	$s_w$ pH=5.86	$s_w$ pH=6.84	$s_w$ pH=8.91	$s_w$ pH=10.84
2,4-Diclorofenol	3.172	3.108	3.132	3.157	2.291	0.725
2-Amino-4-nitrofenol	1.127	1.269	1.369	1.258	0.817	0.637
2-Clorofenol	1.930	1.893	1.905	1.937	1.821	0.794
2-Feniletanol	1.418	1.395	1.399	1.410	1.422	1.401
2-Isopropil-5-Metilfenol (timol)	5.444	5.332	5.371	5.455	5.442	4.865
2-Naftol	2.510	2.456	2.470	2.510	2.496	1.459
2-Nitrofenol	2.268	2.226	2.225	2.185	1.041	0.661
2-Nitro-p-fenilendiamina	0.815	0.993	1.125	1.134	1.155	1.140
2-Toluidina	0.846	1.316	1.692	1.717	1.730	1.682
3-Metilfenol (m-cresol)	1.751	1.741	1.720	1.748	1.744	1.435
3-Nitrofenol	1.718	1.681	1.685	1.704	1.507	0.691
3-Xilè	8.488	8.327	8.525	8.516	8.589	8.518
4-Amino-2-nitrofenol	0.932	1.298	1.369	1.398	1.163	0.651
4-Bromofenol	2.302	2.254	2.262	2.289	2.263	1.033
4-Cloro-3-metilfenol (4-cloro-cresol)	2.751	2.693	2.701	2.744	2.720	1.375
4-Clorofenol	2.090	2.053	2.056	2.094	2.076	1.021
4-Etilfenol	2.358	2.299	2.319	2.362	2.361	1.886
4-Hidroxifenilacetamida	0.905	0.931	0.939	0.949	0.949	0.779
4-Hidroximetilfenilacetat	1.186	1.181	1.172	1.191	1.191	1.177
4-Metilfenol (p-cresol)	1.744	1.734	1.714	1.741	1.738	1.479
4-Nitrofenol	1.628	1.598	1.591	1.541	0.934	0.661
5-Fluorouracil	0.832	0.853	0.830	0.882	0.767	0.621
8-Metoxipsoralè	2.320	2.278	2.309	2.337	2.334	2.276
Àcid 2-hidroxibenzoic (àcid salicílic)	1.592	1.313	0.778	0.785	0.722	0.633
Àcid 4-hidroxifenilacètic	1.005	1.005	0.792	0.774	0.706	0.631
Àcid 5,5-dietilbarbitúric (barbital)	1.054	1.046	1.049	1.066	0.953	0.657
Àcid 5-etil-5-fenilbarbitúric (fenobarbital)	1.365	1.344	1.343	1.359	0.969	0.641
Àcid benzoic	1.384	1.358	0.856	0.786	0.714	0.613
Alcohol 4-hidroxibenzílic	0.944	0.925	0.942	0.963	0.966	0.821
Alcohol benzílic	1.257	1.252	1.242	1.260	1.260	1.245
Aminopirina	0.818	0.922	1.319	1.308	1.305	1.328
Anilina	0.819	1.101	1.389	1.404	1.414	1.379
Antipirina	1.030	1.068	1.116	1.079	1.086	1.120
Aspirina (àcid acetilsalicílic)	1.289	1.241	0.799	0.747	0.705	0.601
Atrazina	2.434	2.467	2.502	2.539	2.528	2.459
Atropina	0.924	0.929	1.085	1.158	2.612	2.995
Benzaldehid	1.863	1.823	1.832	1.850	1.846	1.830
Benzè	3.305	3.249	3.298	3.299	3.319	3.260

(Continuació Annex 4)

Soluts	$t_R$ (min)					
	$^s_{w}pH=2.16$	$^s_{w}pH=3.55$	$^s_{w}pH=5.86$	$^s_{w}pH=6.84$	$^s_{w}pH=8.91$	$^s_{w}pH=10.84$
Benzil nicotinat	2.018	3.051	3.140	3.192	3.175	3.083
Cafeïna	0.932	0.950	0.975	0.963	0.956	0.984
Capsaïcina	5.596	5.632	5.513	5.643	5.618	3.391
Catecol	1.103	1.092	1.093	1.123	1.124	0.799
Clorfeniramina	0.904	1.651	1.582	1.894	7.473	7.326
Codeïna	0.822	0.935	1.077	1.086	1.613	1.468
Cortexolona	2.014	1.982	1.973	2.016	2.004	1.950
Corticosterona	1.866	1.878	1.844	1.895	1.876	1.821
Cortisona	1.399	1.387	1.387	1.415	1.421	1.381
Cumè	13.129	12.873	13.236	13.195	13.304	12.953
Dexametasona	1.711	1.842	1.689	1.698	1.722	1.672
Diclofenac	7.395	7.229	2.444	1.337	0.956	0.865
Dietilcarbamazina	0.803	0.952	0.949	1.047	1.318	1.219
Digitoxina	3.663	3.714	3.576	3.656	3.667	3.519
Efedrina	0.830	0.922	0.939	1.008	2.023	2.014
Escopolamina	0.814	0.971	0.983	1.066	1.317	1.256
Estradiol	3.048	2.967	2.981	3.040	3.036	2.475
Estriol	1.227	1.205	1.206	1.234	1.228	1.117
Estrona	4.097	3.973	3.997	4.064	4.067	3.139
Etilbenzè	8.405	8.246	8.442	8.427	8.491	8.297
Famotidina	0.789	0.914	0.958	0.957	0.952	0.945
Fenol	1.424	1.396	1.401	1.422	1.419	1.143
Fentanil	1.294	1.463	2.284	3.264	9.889	9.780
Fluocinonida	6.139	5.950	6.026	6.067	6.040	5.884
Flurbiprofèn	5.931	5.792	2.384	1.233	0.801	0.638
Griseofulvina	2.828	2.746	2.806	2.869	2.851	2.765
Hidrocortisona	1.336	1.347	1.315	1.324	1.327	1.298
Hidroquinona	0.966	0.943	0.954	0.967	0.956	0.917
Hidroxiprogesteron	4.140	4.152	4.092	4.162	4.160	4.018
Ibuprofèn	7.558	7.429	4.052	1.664	0.947	0.717
Indometacina	7.501	7.315	2.805	1.421	0.953	0.888
Isoquinolina	0.822	1.167	1.799	1.819	1.819	1.772
Ketoprofèn	3.116	3.033	1.519	1.038	0.755	0.660
Ketorolac	2.103	2.010	0.961	0.919	0.739	0.668
Lidocaïna	0.932	1.048	1.334	2.160	4.530	4.477
Metil 4-hidroxibenzoat	1.449	1.430	1.425	1.447	1.321	0.727
Metil fenil èter (anisole)	3.047	3.057	3.018	3.043	3.060	3.037
Morfina	0.789	0.903	0.905	0.923	1.218	0.793
N,N-Dimetilanilina	0.848	1.599	3.974	4.052	4.083	3.999
Naproxèn	3.215	3.153	1.798	1.095	0.747	0.627
Nicotina	0.755	1.026	0.931	1.030	1.484	1.394
o-Fenilendiamina	0.796	0.903	1.024	1.033	1.039	1.026
Oxicodona	0.811	0.920	1.054	1.152	2.439	2.508
p-Fenilendiamina	0.753	0.868	0.903	0.917	0.951	0.918
Piridina	0.777	0.916	1.113	1.126	1.125	1.132
Piroxicam	1.873	2.112	1.087	0.965	0.728	0.664
Prednisolona	1.300	1.261	1.277	1.291	1.301	1.265
Pregnenolona	9.877	9.940	9.660	9.854	9.942	9.796
Progesterona	9.725	9.467	9.581	9.782	9.748	9.375

(Continuació Annex 4)

Solut	$t_R$ (min)					
	$^s_{w}pH=2.16$	$^s_{w}pH=3.55$	$^s_{w}pH=5.86$	$^s_{w}pH=6.84$	$^s_{w}pH=8.91$	$^s_{w}pH=10.84$
Propranolol	1.124	1.186	1.655	1.861	5.453	5.469
Ranitidina	0.793	0.937	0.898	0.936	1.238	1.102
Resorcinol	1.021	1.009	1.010	1.030	1.021	0.804
Sufentanil	1.664	1.931	3.655	6.403	16.623	16.188
Testosterona	3.159	3.091	3.092	3.155	3.152	3.046
Toluè	5.176	5.084	5.182	5.177	5.213	5.102
Tramadol	0.962	1.001	1.326	1.421	3.842	4.864
Warfarina	4.459	4.354	2.613	1.323	0.743	0.643



# **ANNEX 5**





**Annex 5.** Valors dels logaritme de les permeabilitats efectives skin PAMPA mesurades a diferents valors de pH. Totes aquestes mesures s'han realitzat a unes condicions experimentals de 4 hores d'incubació i amb agitació.

Soluts	log P <sub>e</sub>							
	pH=3	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9	pH=10
2,4-Diclorofenol	-3.92	-3.92	-3.92	-3.94	-4.04	-4.18	-4.41	-4.61
2-Isopropil-5-Metilfenol (timol)	-	-4.01	-	-4.01	-	-4.00	-	-4.00
2-Nitro-p-fenilendiamina	-5.51	-5.32	-5.26	-5.26	-5.22	-5.03	-4.75	-4.73
2-Toluïdina	-5.16	-4.46	-4.19	-4.13	-4.13	-4.09	-4.00	-3.98
3-Metilfenol (m-cresol)	-	-4.32	-	-4.33	-	-4.29	-	-4.23
4-Amino-2-nitrofenol	-4.83	-4.66	-4.59	-4.58	-4.61	-4.67	-4.75	-4.89
4-Clorofenol	-	-4.28	-	-4.26	-	-4.23	-	-4.25
4-Etilfenol	-	-4.20	-	-4.17	-	-4.18	-	-4.13
4-Hidroxifenilacetamida	-	-6.13	-	-6.02	-	-6.08	-	-5.21
4-Hidroxi-metilfenilacetat	-5.12	-	-5.12	-	-4.97	-	-4.62	-
4-Nitrofenol	-4.89	-4.91	-4.93	-4.99	-5.14	-5.16	-5.16	-5.17
5-Fluorouracil	-5.77	-5.75	-5.80	-5.77	-5.77	-5.75	-5.42	-5.15
8-Metoxipsoralè	-4.33	-	-4.28	-	-4.28	-	-4.20	-
Àcid 2-hidroxibenzoic (àcid salicílic)	-4.79	-5.50	-5.95	-6.06	-6.12	-6.05	-5.57	-5.25
Àcid 5,5-dietilbarbitúric (barbital)	-5.70	-5.70	-5.79	-5.79	-5.78	-5.74	-5.44	-5.20
Àcid 5-etil-5-fenilbarbitúric (fenobarbital)	-6.05	-6.05	-6.07	-6.04	-6.05	-6.05	-5.68	-5.49
Àcid benzoic	-4.82	-5.06	-5.50	-5.79	-5.89	-5.82	-5.49	-5.28
Alcohol 4-hidroxibenzílic	-	-5.84	-	-5.86	-	-5.65	-	-5.09
Aminopirina	-6.04	-5.93	-5.73	-5.69	-5.65	-5.56	-5.04	-5.10
Anilina	-5.61	-5.03	-4.63	-4.55	-4.56	-4.50	-4.35	-4.33
Antipirina	-5.61	-	-5.67	-	-5.60	-	-5.11	-
Aspirina (àcid acetilsalicílic)	-5.89	-5.99	-	-	-	-	-5.68	-5.40
Atrazina	-4.66	-4.66	-4.66	-4.67	-4.68	-4.71	-4.52	-4.55
Atropina	-6.00	-5.99	-5.97	-5.97	-6.02	-6.00	-5.70	-5.50
Benzil nicotinat	-4.47	-4.14	-4.18	-4.15	-4.15	-4.14	-	-
Cafeïna	-5.43	-	-5.46	-	-5.47	-	-4.95	-
Capsaïcina	-4.50	-4.64	-4.68	-4.66	-4.68	-4.63	-4.56	-4.55
Catecol	-	-5.39	-	-5.39	-	-5.19	-	-
Clorfeniramina	-	-	-	-	-5.46	-4.72	-4.23	-4.13
Codeïna	-	-	-	-	-5.85	-5.62	-5.10	-5.03
Cortexolona	-5.43	-	-5.48	-	-5.43	-	-4.92	-
Corticosterona	-5.57	-	-5.59	-	-5.60	-	-5.04	-
Cortisona	-6.07	-	-6.11	-	-6.09	-	-5.51	-
Dexametasona	-6.22	-	-6.27	-	-6.27	-	-5.69	-
Diclofenac	-3.79	-3.89	-4.46	-5.23	-5.77	-5.85	-5.46	-5.35
Dietilcarbamazina	-6.98	-6.84	-6.51	-6.14	-5.79	-5.32	-5.01	-5.00
Efedrina	-	-	-	-	-	-5.76	-5.01	-4.86
Escopolamina	-	-	-	-	-	-5.93	-5.56	-5.37
Estradiol	-	-4.19	-	-4.10	-	-4.07	-	-4.03
Estriol	-	-6.01	-	-6.13	-	-5.81	-	-5.27
Famotidina	-6.49	-6.46	-6.46	-6.44	-6.50	-6.48	-5.76	-5.39

(Continuació Annex 5)

Solut	log P <sub>e</sub>							
	pH=3	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9	pH=10
Fentanil	-	-	-7.46	-5.86	-4.88	-4.16	-3.89	-3.90
Fluocinonida	-5.38	-	-5.43	-	-5.32	-	-4.88	-
Flurbipofèn	-3.69	-3.83	-4.45	-5.35	-5.88	-5.86	-5.64	-5.60
Griseofulvina	-5.25	-	-5.34	-	-5.23	-	-4.89	-
Hidrocortisona	-6.13	-	-6.16	-	-6.22	-	-5.58	-
Hidroquinona	-5.83	-	-5.91	-	-	-	-	-
Hidroxiprogesterona	-4.73	-	-4.64	-	-4.72	-	-4.57	-
Ibuprofèn	-3.61	-3.71	-4.34	-4.95	-5.40	-5.57	-5.44	-5.30
Indometacina	-4.40	-4.63	-5.32	-5.70	-5.88	-5.68	-5.40	-5.24
Isoquinolina	-5.48	-5.13	-4.52	-4.24	-4.20	-4.17	-4.14	-4.13
Ketoprofèn	-4.68	-4.98	-5.72	-	-	-	-5.93	-5.75
Ketorolac	-5.30	-5.83	-6.16	-6.19	-6.19	-5.71	-	-5.28
Lidocaïna	-	-	-	-5.58	-5.13	-4.64	-4.27	-4.27
Metil 4-hidroxibenzoat	-4.87	-4.88	-4.86	-4.94	-4.84	-4.78	-4.75	-4.88
Metil fenil èter	-4.29	-	-4.36	-	-4.36	-	-4.32	-
Morfina	-6.18	-6.20	-6.21	-6.17	-6.15	-6.10	-5.72	-5.43
N,N-Dimetilanilina	-6.88	-5.26	-4.28	-3.98	-3.95	-3.97	-4.04	-4.06
Naproxèn	-4.19	-4.36	-4.94	-5.63	-5.94	-5.91	-5.59	-5.39
Nicotina	-	-5.99	-5.93	-5.83	-5.51	-5.07	-4.56	-4.54
o-Fenilendiamina	-5.72	-5.56	-5.43	-5.43	-5.40	-5.27	-4.85	-4.83
Oxicodona	-	-	-	-6.09	-5.90	-5.25	-4.83	-4.73
p-Fenilendiamina	-7.45	-6.45	-6.16	-5.88	-5.53	-5.06	-4.93	-4.88
Piridina	-10.70	-10.54	-4.80	-4.55	-4.49	-4.42	-4.29	-4.25
Piroxicam	-4.67	-4.72	-4.86	-5.28	-5.57	-5.68	-5.49	-5.42
Prednisolona	-6.44	-	-6.41	-	-6.41	-	-5.74	-
Progesterona	-4.11	-	-4.14	-	-4.13	-	-4.15	-
Propranolol	-6.12	-6.07	-5.99	-5.78	-5.31	-4.72	-4.26	-4.28
Ranitidina	-6.16	-6.17	-6.18	-6.17	-6.20	-6.16	-5.69	-5.36
Sufentanil	-6.21	-6.18	-6.14	-5.70	-4.61	-4.06	-3.94	-3.96
Testosterona	-4.54	-	-4.53	-	-4.48	-	-4.36	-
Tramadol	-	-	-6.17	-5.97	-5.61	-4.92	-4.51	-4.37
Warfarina	-4.62	-4.76	-5.14	-5.62	-5.79	-5.87	-5.56	-5.56

