

31 2ci



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES  
"CUAUTITLAN"**

**U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES-CUAUTITLAN**



**DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES**

**ESTUDIO DE LA LIBERACION DE ACIDO NALDIXICO  
Y DEXAMETASONA ENTRAMPADOS EN  
ERITROCITOS HUMANOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A N :**

**MARIA DEL REFUGIO MANJARREZ DIAZ  
MARIA TERESA RAMIREZ RODRIGUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: Q. F. B. JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

**1991**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE

<i>CAPITULO I</i>	1
1. Objetivos	2
<i>CAPITULO II</i>	3
2. Generalidades	4
2.1 Introducción	4
2.1.1. Propiedades generales del eritrocito	6
2.1.2. Eritrocitos fantasmas	10
2.1.3. Membrana eritrocítica	11
2.1.4. Técnicas de entrapamiento	17
2.2. Acción sostenida	28
2.3. Modelos matemáticos	30
2.4. Características de los fármacos	39
<i>CAPITULO III</i>	46
3. Material y Métodos	47
3.1. Material	47
3.1.1. Material de cristalería	47
3.1.2. Equipo	47
3.1.3. Reactivos	48
3.1.4. Principios activos	48
3.1.5. Material biológico	48
3.2. Métodos	49
3.2.1. Metodología para entrapamiento	49

3.2.2. Metodología para liberación	49
3.2.3. Metodología para microscopía	50
<i>CAPITULO IV</i>	52
4. Resultados y análisis estadístico	53
<i>CAPITULO V</i>	88
5. Discusión	89
<i>CAPITULO VI</i>	102
Conclusiones	103
<i>ANEXO I</i>	104
Información estadística	104
<i>ANEXO 2</i>	108
Validación de los métodos analíticos	108
<i>ANEXO 3</i>	113
Observaciones generales	113
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	117

## CAPITULO I

## 1 OBJETIVOS

1. Evaluar a los eritrocitos como un sistema acarreador y liberador de fármacos.
2. Caracterizar la liberación del Ácido nalidixico y Dexametasona entrampados por el método de dilución hipotónica en eritrocitos de humanos.
3. Observar los cambios morfológicos que sufre el eritrocito durante el proceso de entrampamiento.

## CAPITULO II

## 2. GENERALIDADES

### 2.1. INTRODUCCIÓN

A través del tiempo se ha observado que algunos fármacos son eliminados rápidamente del organismo y otros alcanzan niveles tóxicos modificando la respuesta terapéutica.

A raíz de estos problemas se inició la búsqueda de nuevos sistemas de liberación que pudieran controlar la liberación de los fármacos para favorecer la respuesta terapéutica y disminuir los efectos tóxicos. Se han utilizado diversos sistemas sintéticos y naturales. Entre los sistemas sintéticos se pueden mencionar los polímeros (Poliláctico y Poliglicólico); y de los sistemas biológicos, los eritrocitos y liposomas.

Conforme se avanzó en las investigaciones sobre los eritrocitos como portadores de fármacos se descubrió que gracias a sus características fisicoquímicas y morfológicas son capaces de entrapar fármacos y biomoléculas. El porcentaje de entrapamiento varía según el método empleado.<sup>1-2</sup>

Los eritrocitos acarreadores; al ser introducidos al torrente sanguíneo, llegan a órganos específicos, liberan cantidades suficientes de fármaco para alcanzar el nivel terapéutico óptimo y pueden ser eliminados fácilmente de la circulación. Debido a eso se ven disminuidos los efectos tóxicos causados por la administración de fármacos en forma libre.

A raíz de las anteriores observaciones se ha propuesto el uso de los eritrocitos acarreadores como un sistema de liberación



sostenida.

Existen algunos modelos matemáticos que tratan de explicar como es liberado el fármaco por el sistema portador: el modelo de Hixon Crowel, el de Higuchi, el de Peppas y el modelo de Chandrasekan entre otros.<sup>54</sup>

Los modelos matemáticos se basan en las características del sistema portador y del fármaco.

### 2.1.1. PROPIEDADES GENERALES DEL ERITROCITO

El eritrocito es uno de los componentes celulares de la sangre. Es un derivado celular altamente especializado encargado de aportar oxígeno a los tejidos.<sup>4</sup> Para ello debe cumplir dos funciones fundamentales:

a) Captar el oxígeno en los capilares pulmonares y liberarlo en los capilares tisulares.

b) Circular libremente en la red sanguínea atravesando fácilmente aún los más pequeños capilares de diámetro inferior al suyo.<sup>5</sup>

El eritrocito humano carece de núcleo, es altamente pleomórfico ya que pasa a través de una gama de formas transitorias pero normalmente posee una forma de disco biconcavo con un diámetro de 6-9  $\mu\text{m}$ , un espesor de 1  $\mu\text{m}$  en el centro y 2-2.5  $\mu\text{m}$  en la periferia (Figura 2.1). Los eritrocitos se consideran macrocitos cuando su diámetro rebasa los 9  $\mu\text{m}$ . Su membrana tiene 6 nm de espesor. El eritrocito al microscopio electrónico muestra una membrana con una estructura bien definida y un contenido denso y homogéneo en el que no se aprecian orgánoides subcelulares (Figura 2.2). Contiene hemoglobina (Hb) en grandes concentraciones a la cual se une el oxígeno.

La vida media del eritrocito es de 120 días. Por lo cual encontramos en circulación células jóvenes y viejas. Se dice que las células viejas poseen menos cargas negativas que las jóvenes y se cre que esto juega un papel importante en su destrucción por el sistema retículo endotelial. También se ha sugerido que la disminución de ácido siálico sobre las superficies de los eritrocitos expone nuevos sitios antigénicos que pueden ser

reconocidos por los macrofagos.<sup>6</sup>

Como en todas las células, el catión principal es el  $K^+$  con  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  mientras que los aniones más importantes son  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $Hb^-$  y fosfato inorgánico; el 2,3-difosfoglicerato es el principal compuesto que contiene fosfato en su molécula.<sup>7</sup> La concentración de potasio en la célula es de casi 20 veces superior a la concentración de dicho ión en el plasma. Por el contrario, la concentración de sodio es cerca de 5 veces más grande en el plasma que en el centro del eritrocito. Este gradiente de concentración se mantiene a pesar del movimiento gradual de los iones de potasio fuera de la célula y de sodio en el interior. El eritrocito dispone de varios mecanismos de bombeo que desplazan el potasio hacia el seno del eritrocito y extraen el sodio. Estos dispositivos se representan como 1A, 1B y II. La bomba 1A sirve para alrededor de 50% de la capacidad de bombeo del sodio del eritrocito normal. Requiere tanto la presencia del potasio y sodio para su funcionamiento en la acción de expulsar una molécula de sodio por cada molécula de potasio que penetra. Es sensible a la inhibición por los glucósidos cardíacos. La bomba 1B se parece al 1A pero se diferencia porque no necesita la presencia del potasio en el medio externo. Las bombas 1A y 1B funcionan con ATP. La bomba II, no se inhibe por los glucósidos cardíacos y no utiliza ATP. Interviene en el 20 a 25% de la salida del sodio de la célula. Además de las bombas para sodio y potasio el eritrocito parece tener la capacidad de extraer iones calcio en una forma activa.<sup>8</sup>

El eritrocito se comporta como un osmómetro hinchándose y contrayéndose como respuesta a aumentos y disminuciones de la presión osmótica del fluido exterior.

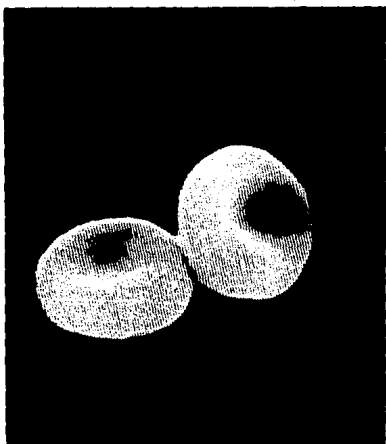


Figura 2.1. Microtografía de un eritrocito normal (X4500).

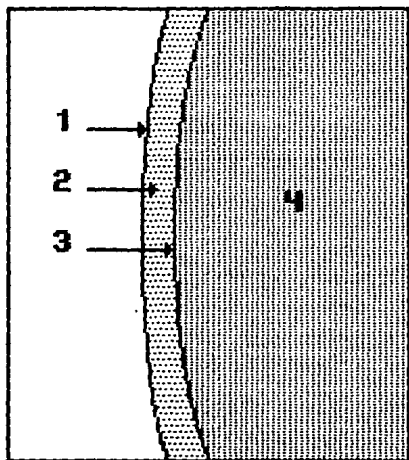


Figura 2.2. Esquema de un eritrocito humano (X200000)

- 1) Lámina densa osmófila externa de la membrana protoplasmática.
- 2) Lámina clara intermedia de la membrana protoplasmática.
- 3) Lámina densa osmófila interna de la membrana protoplasmática.
- 4) Citoplasma, cuyo principal elemento es la hemoglobina.

En presencia de una solución suficientemente hipotónica se hincha y, como consecuencia, la membrana plasmática se rompe. En un medio isotónico la hemólisis puede ser provocada por diversos agentes tensoactivos, por lo general, jabones, cloroformo y detergentes.

### 2.1.2. ERITROCITOS FANTASMAS

La lisis hipotónica se produce cuando la célula es tensionada más allá de su capacidad. Castle y Daland<sup>9</sup> estudiaron la hemólisis de células en soluciones hipotónicas y encontraron que la ruptura de la membrana ocurre en el punto donde el volumen celular es cercano a 160 % de su volumen original. Este volumen corresponde al de una esfera que tiene la misma área superficial al de una célula biconcava original. Esta lisis provoca la pérdida brusca de la hemoglobina y otras proteínas citoplasmáticas. Los poros se forman cuando la membrana no puede soportar los cambios osmóticos rápidos.

Experimentos realizados con eritrocitos en un campo eléctrico sugieren que la desorganización de los componentes de la membrana es debido a la producción de un desbalance osmótico. Esto provoca el descontrol de la extracción de los iones del seno del eritrocito y, por consiguiente, la presión osmótica ejercida por la hemoglobina y otros aniones no permeables es la suficiente para romper la membrana del eritrocito.<sup>10</sup>

Aún después de la desorganización de sus componentes, la membrana eritrocítica conserva su integridad geométrica y puede recobrar sus propiedades originales si se restauran las condiciones normales.

Las células resultantes del proceso anterior se conocen como eritrocitos fantasmas.<sup>11</sup>

### 2.1.3. MEMBRANA ERITROCITICA

Es una capa fina flexible, elástica que circunscribe la superficie externa de cada célula. Su importancia radica en la regulación del contenido de la célula ya que todos los elementos nutritivos que entran en la misma, así como los productos de desecho o secreciones que salen de ella, deben atravesarla. Impide la entrada de unas sustancias y facilita la de otras. Una barrera de esta naturaleza es una membrana selectivamente permeable.<sup>12</sup>

La membrana plasmática posee poros microscópicos por los cuales pasan ciertas sustancias, el tamaño de estos poros determina el tamaño máximo de las moléculas que pueden atravesarla. Existen otros factores que determinan si la sustancia atraviesa o no la membrana; estos factores son: carga eléctrica, número de moléculas de agua ligadas a la superficie de la partícula y la solubilidad del fármaco en los lípidos.

Las membranas están rodeadas por medio acuoso. Bajo condiciones normales el agua entra y sale constantemente a través de la membrana celular. La difusión del agua a través de una membrana selectivamente permeable se denomina ósmosis. Al igual que otras sustancias el agua difunde de un área de mayor a otra de menor concentración (Figura 2.3).<sup>13</sup>

La membrana aislada del eritrocito es uno de los modelos de membrana plasmática mejor estudiada por su facilidad de aislamiento (Figura 2.4). La composición química de la membrana muestra que está constituida de un 40% de lípidos y 60% de proteínas (Porcentaje sobre peso seco). Teniendo en cuenta los

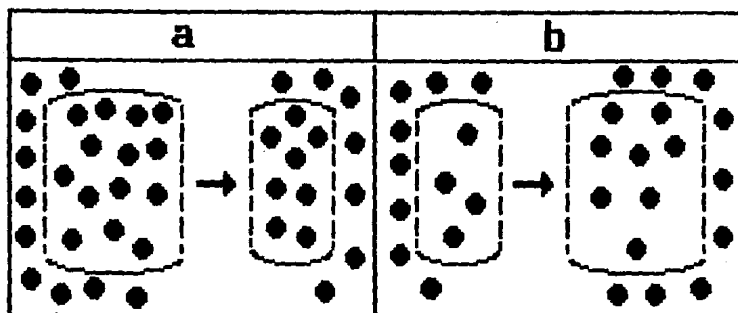


Figura 2.3. a) Cuando la concentración de partículas es mayor dentro de la célula que en el exterior el agua entra y provoca su hinchamiento. b) Cuando la concentración de partículas es menor dentro que en el exterior el agua sale y provoca la contracción de la célula.

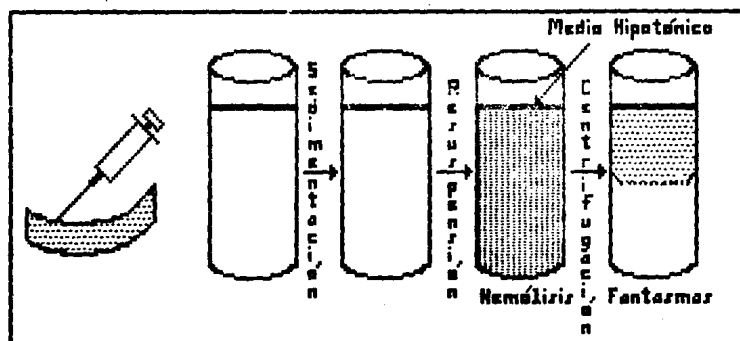


Figura 2.4. Aislamiento de membranas de eritrocitos humanos.



pesos moleculares medios de los componentes encontrados se calcula que existe una molécula protéica por cada 75 moléculas de lípidos. Se cree que estas moléculas protéicas y lipídicas están organizadas según el modelo de mosaico fluido de Singer y Nicholson (Figura 2.5).

Este modelo afirma que los fosfolípidos de la membrana se hallan ordenados en bicapas formando una matriz, o lámina fluida de cristales líquidos. En esta bicapa las moléculas lipídicas individuales pueden moverse lateralmente dotando a la bicapa de fluidez, flexibilidad, una resistencia eléctrica elevada y una relativa impermeabilidad a las moléculas muy polares.

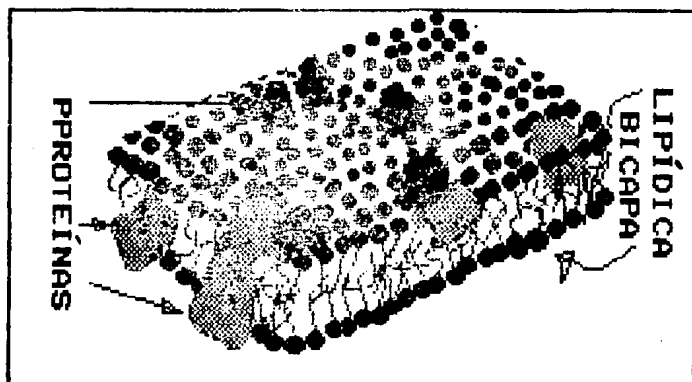


Figura 2.5. Modelo del mosaico fluido de Singer y Nicholson.<sup>14</sup>

El modelo del mosaico fluido postula que las proteínas de la membrana son globulares, para interpretar el elevado contenido de hélice  $\alpha$ . Algunas de las proteínas se encuentran parcialmente incluidas en la membrana y penetran en la fase lipídica desde cada lado, mientras que otras se hallan totalmente sepultadas en ellas. La extensión con que una proteína globular penetra en el interior de la fase lipídica está determinada por su secuencia aminoácida y la localización sobre su superficie de los grupos no polares de los aminoácidos. De esta manera las diversas proteínas de la membrana forman una estructura de tipo mosaico en la fluida bicapa fosfolipídica. El mosaico no es fijo o estático porque las proteínas son libres para difundir lateralmente en dos dimensiones por lo menos en algunas membranas. Se cree que la viscosidad relativa de la bicapa lipídica es de 100 a 1000 veces superior a la del agua.

El modelo del mosaico fluido interpreta satisfactoriamente muchas características y propiedades de las membranas biológicas. Es aplicable a membranas con contenidos de proteínas muy diferentes por unidad de superficie membranosa. Explica la variación de espesor de diferentes tipos de membranas y permite interpretar la simetría de las membranas naturales como una consecuencia del ordenamiento de las proteínas en la superficie de la bicapa lipídica. El modelo interpreta también las propiedades eléctricas y de permeabilidad de las membranas así como la observación de que algunos de los componentes proteicos se mueven a gran velocidad.<sup>14</sup>

Los lípidos, en su mayor parte (98%), tienen un polo hidrófilo y un polo hidrófobo. Las especies químicas más abundantes (% en peso) son los fosfolípidos (55% del total de los

lípidos) seguidos del colesterol (25%) y los glucolípidos (18%). Los lípidos totalmente hidrófobos (2%) están representados por ácidos grasos. Los constituyentes mayores de los fosfolípidos son: esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, que en su conjunto superan el 98% del total de los fosfolípidos. Los dos primeros alcanzan del 50-70% de los fosfolípidos según las diferentes especies de mamíferos.

Considerando el peso molecular de cada tipo de componente sobresale el alto contenido de colesterol. El colesterol inhibe las fases de transición inducidas por la temperatura y también la disminución drástica de la fluidez que puede ocurrir a bajas temperaturas (Figuras 2.6 y 2.7).<sup>19,10</sup>

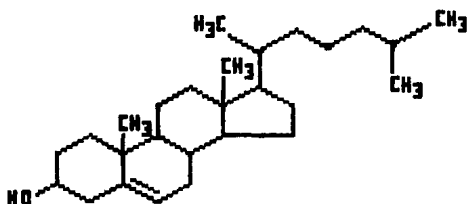


Figura. 2.6. Fórmula estructural del colesterol.

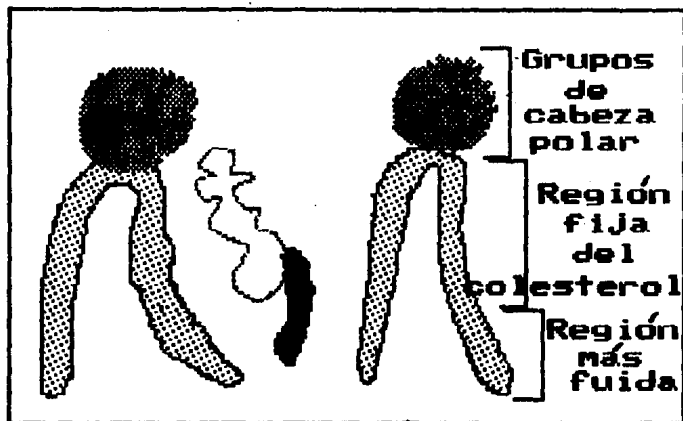


Figura. 2. 7. Interacción del colesterol con dos moléculas de fosfolípidos en una monocapa.

Las proteínas de la membrana de los eritrocitos son de diversos tipos. Considerando la estructura tridimensional de la membrana se pueden describir proteínas intrínsecas y extrínsecas similares a la de cualquier otra célula. Los pesos moleculares de las proteínas del eritrocito humano oscilan entre 20,000 y 250,000 además de que se han caracterizado total o parcialmente unas 20 proteínas. La mitad de las cuales representan más del 80% del total.

El mantenimiento y/o el cambio de forma del eritrocito, entre otros factores, se debe a la interacción de las proteínas intrínsecas y extrínsecas.<sup>17,48</sup>

## 2.1.4. TÉCNICAS DE ENTRAMPAMIENTO EN ERITROCITOS

El porcentaje de entrampamiento máximo de los fármacos en los eritrocitos depende de la especie donadora, condiciones de trabajo y el método utilizado.

Existen seis métodos para entrapar sustancias en los eritrocitos, los cuales son :

- A. Dilución hipotónica. <sup>10-26</sup>
- B. Diálisis hipotónica. <sup>27-35</sup>
- C. Hemólisis eléctrica. <sup>36-40</sup>
- D. Perturbación química de la membrana. <sup>41</sup>
- E. Cambios de temperatura. <sup>42-44</sup>
- F. Eritrocitos fantasmas. <sup>45-51</sup>

A continuación se mencionan brevemente cada uno de estos métodos.

### A. DILUCIÓN HIPOTÓNICA

#### FUNDAMENTO:

El procedimiento de entrampamiento involucra un hinchamiento gradual de las células al colocarlo en un medio hipotónico, el cual no resulta en la ruptura de la membrana de los eritrocitos, pero la hace permeable a las sustancias que van a ser entrampadas.

## METODO EXPERIMENTAL

El proceso de entrapamiento se lleva a cabo bajo condiciones asepticas a temperatura ambiente. Todos los pasos son realizados con gran cuidado y los transportes del paquete celular con pipeta volumétrica debe hacerse lentamente para evitar la lisis de los eritrocitos.

- 1.- Extraer la sangre de los donadores en tubos heparinizados.
- 2.- Centrifugar a 800g por 7 minutos.
- 3.- Eliminar el plasma y los leucocitos.
- 4.- Transferir un mililitro del paquete celular a un tubo de ensayo.
- 5.- Adicionar 4 mililitros de la solución de Hank modificada isotónica (KCL 10.18g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1g/l;  $\text{NaHCO}_3$  1.273 g/l; NaCL 0.31 g/l;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1g/l glucosa 2g/l) diluida hasta una tonicidad de 0.67 al tubo de ensayo con paquete celular.
- 6.- Mezclar por inversión varias veces .
- 7.- Centrifugar a 800g por 5 minutos.
- 8.- Eliminar el sobrenadante.
- 9.- Colocar 0.2 ml de membranas eritrociticas (obtenidas de la lisis de eritrocitos con agua y posterior centrifugación) sobre el paquete eritrocítico.
- 10.- Adicionar 0.2 ml de solución hipotónica con fármaco al tubo con paquete.
- 11.- Mezclar por inversión lenta.
- 12.- Centrifugar a 800g por 3 minutos.
- 13.- Se repiten los pasos del 10-12 hasta la aparición de hemólisis en el sobrenadante.
- 14.- Una vez que se llega al punto anterior se extrae el

sobrenadante e inmediatamente se le adiciona solución de Hank modificada isotónica.

15.- Las células se centrifugan a 500g por 5 minutos.

16.- Descartar el sobrenadante.

17.- Lavar con 10 mililitros de la solución de Hank modificada isotónica y centrifugar a 500g por 5 minutos.

18.- Repetir el paso 17 dos veces más.

PORCENTAJE GENERAL DE ENTRAMPAMIENTO.

1 - 8 %.

Tabla 2.1. Fármacos entrampados por dilución hipotónica.

Fármaco	PM	Porcentaje entrampado	Especie donadora
Insulina <sup>10,20</sup>	5000	4.8	conejo, cerdo y ratón
Alfa-1-Antitripsina <sup>10</sup>		20.0	"
Cortisol 2ifosfato <sup>10</sup>	440	17.0	"
Metotrexato <sup>10</sup>	454	15.5	"
Ciclofosfamida <sup>10</sup>	250	8.8	"
		9.0	ratas
Asparginasa <sup>22,25</sup>	130000	5.0	ratón y ratas
Urogastrona <sup>25</sup>		17.6	ratas

## B. DIÁLISIS HIPOTÓNICA

### FUNDAMENTO:

El entrapamiento de eritrocitos se consigue por el hinchamiento cuidadoso de los eritrocitos hasta la aparición de poros en su membrana los cuales permitirán el paso libre de moléculas grandes y pequeñas. Los eritrocitos se preparan utilizando membranas para diálisis.

### MÉTODO EXPERIMENTAL.

- 1.- Extraer las muestras sanguíneas en tubos heparinizados.
- 2.- Centrifugar la sangre completa de 500 - 1000g. <sup>24</sup>
- 3.- Eliminar el líquido sobrenadante.
- 4.- Lavar 4 veces el paquete celular con solución amortiguadora isotónica de fosfatos ( 10mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH=7.0; 2mM NaCl; 10mM de glucosa).
- 5.- Colocar el paquete celular en bolsas de diálisis.
- 6.- Dializar el paquete celular en 13 litros de solución amortiguadora de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (5mM 25 a 35 minutos.
- 7.- Retirar los eritrocitos de la bolsa de diálisis.
- 8.- Colocar un mililitro de eritrocitos dializados en un tubo de ensaye.
- 9.- Adicionar el fármaco a entrapar en solución.
- 10.- Restaurar las condiciones isotónicas por la adición de NaCl (1.5 M).
- 11.- Lavar 4 veces con solución amortiguadora isotónica de fosfatos.
- 12.- Colocar los eritrocitos a 37°C.



Nota: Las muestras sanguíneas deben procesarse lo más rápido posible.

PORCENTAJE GENERAL DE ENTRAMPAMIENTO:

30-80 %

Tabla 2.2 Fármacos entrampados por diálisis hipotónica

Fármaco	PM	Porcentaje entrampado	Especie donadora
Dactinomicina <sup>27</sup>	528	17-30	Perro, becerro, ratón
Adriamicina <sup>27</sup>	544	NR	Perro, becerro, ratón
Sacarosa <sup>21,22</sup>	342	NR	Perro, becerro, ratón
B-Galactosidasa <sup>28</sup>		25-40	Humano, caballo becerro, porcino.
Fosfatasa Alcalina <sup>28</sup>		28-32	Humano, caballo, perro becerro, porcino.
Sacarosa <sup>29</sup>	342	29-35	Perro
Arabinósido de <sup>30</sup> citosina	243	>40	Perro
Metotrexato <sup>28</sup>	454	28-36	Perro.

\* NR no reportado en la literatura.

## C. HEMÓLISIS ELÉCTRICA

### FUNDAMENTO:

Los poros de la membrana eritrocítica se hacen presentes cuando el potencial de transmembrana inducido por un apropiado campo eléctrico (KV/cm) excede a un valor crítico de un voltio. El radio efectivo de los poros es variado y esto es debido al ajuste de la intensidad, duración del campo eléctrico y fuerza iónica del medio. Los poros permanecen abiertos a bajas temperaturas pero cierran completamente a 37°C.

### MÉTODO EXPERIMENTAL.

- 1.- Extracción de sangre en tubos heparinizados de donadores sanos
  - 2.- Centrifugar para obtener paquete eritrocítico.
  - 3.- Lavar 3 veces con una solución que contenga 150mM de NaCl y 7mM de solución amortiguadora de fosfatos a pH=7.
  - 4.- Suspender nuevamente los eritrocitos en solución amortiguadora de NaCl y solución del fármaco a entrapar (las dos soluciones deben de tener la misma osmolaridad ó muy cercana, 300 miliosmolal la cual se supone es isotónica.
- NOTA: si es necesario conservar la suspensión, se debe mantener a una temperatura de 0-4°C.
- 5.- Colocar la suspensión celular a una temperatura de 37°C.
  - 6.- Colocar la suspensión en el campo eléctrico..
  - 7.- Aplicar el voltaje durante algunos microsegundos.

### PORCENTAJE GENERAL DE ENTRAMPAMIENTO:

5-20 %

Tabla 2.3 Fármacos atrapados por hemólisis eléctrica

Fármaco	PM	Porcentaje atrapado	Especie donadora
Sacarosa <sup>88</sup>	342	N.R	Humano

#### D. PERTURBACIÓN QUÍMICA DE LA MEMBRANA

##### FUNDAMENTO:

La anfotericina B es un antibiótico micótico que se une al colesterol en la membrana plasmática de las células eucarióticas. Provoca la aparición de poros de gran tamaño en la membrana mejorando así la salida de iones y la entrada de moléculas pequeñas y grandes, incluyendo el DNA.

##### MÉTODO EXPERIMENTAL:

- 1.- Extracción de sangre en tubos heparinizados de donadores sanos
- 2.- Centrifugar para obtener paquete eritrocítico.
- 3.- Lavar el paquete celular 4 ó 5 veces con solución de NaCl 0.9%.
- 4.- Lavar con medio isotónico de sacarosa (250mM de sacarosa, 6mM KCl, 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 2mM de solución amortiguadora de fosfatos a pH=7.4 y 10mM de glucosa).
- 5.- Las células lavadas se suspenden en el medio isotónico de sacarosa.
- 6.- Incubar con anfotericina B los eritrocitos.

- 7.- Adicionar el fármaco al medio anterior.
- 8.- Incubar la suspensión 37°C. por 30 minutos con una agitación lenta y cuidadosa.
- 9.- Centrifugar la suspensión a 3000g durante 5 minutos a 4°C.
- 10.- Lavar el paquete eritrocítico 3 veces con solución isotónica de fosfatos que contenga 2mM de EDTA.

**PORCENTAJE GENERAL DE ENTRAMPAMIENTO:**

20%

Tabla 2.4. Fármacos entrampados por perturbación química.

Fármaco	PM	Porcentaje entrampado	Especie donadora
Daunomicina <sup>45</sup>		20	Humano, ratón

**E. CAMBIOS DE TEMPERATURA.**

**FUNDAMENTO:**

Al cambiar rápidamente la temperatura a una suspensión eritrocítica se observa que hay apertura o agrandamiento de los poros de la membrana. A temperaturas inferiores al punto de fusión para un lípido particular la membrana puede llegar a solidificarse. A temperaturas mayores, a medida que la membrana

se funde, el lípido recobra su estado fluido.

**MÉTODO EXPERIMENTAL:**

- 1.- Extracción de sangre de donadores sanos.
- 2.- Centrifugar la suspensión celular por 15 minutos a 5000 rpm en una centrifuga con refrigeración.
- 3.- Suspender los eritrocitos en una solución isotónica.
- 4.- La solución isotónica debe contener el fármaco a encapsular.
- 5.- Aplicar los cambios de temperatura de  $0.05^{\circ}\text{C}$  durante 2 microsegundos.
- 6.- Centrifugar la suspensión celular.
- 7.- Lavar la suspensión celular.

**PORCENTAJE GENERAL DE ENTRAMPAMIENTO**

No reportado.

Tabla 2.5. Fármaco entrampado por cambios de temperatura.

Fármaco	PM	Porcentaje entrampado	Especie donadora
Glucosa <sup>44</sup>	180	N. R	Humano

## F. ERITROCITOS FANTASMAS

### FUNDAMENTO:

Al introducir los eritrocitos en un medio hipotónico (por lo general debe ser menor a 0.67 en la escala de tonicidad) se produce el rompimiento de la membrana eritrocítica causando la salida de la hemoglobina, si estas membranas se colocan en un medio isotónico se unen nuevamente dando origen a los llamados eritrocitos fantasmas. Estos eritrocitos poseen sus propiedades de permeabilidad originales.

Si se adiciona al medio en que se encuentran los eritrocitos hemolizados un fármaco ó algún material biomolecular al restaurar las condiciones isotónicas éste queda en el interior de los eritrocitos fantasmas

### METODO EXPERIMENTAL:

- 1.- Extracción de sangre de donadores sanos bajo condiciones estériles en un tubo heparinizado.
- 2.- Centrifugar la sangre a 1600g por minuto.
- 3.- Descartar el sobrenadante y lavar tres veces con solución isotónica de cloruro de sodio (0.9 de tonicidad).
- 4.- Preparar una suspensión celular al 50% (p/v) isotónica -TRIS a pH= 7.4:
- 5.- Colocar 1 mililitro de la suspensión celular en 10 mililitros del medio hemolizante que contiene 1 mmol de  $MgSO_4$  por cada 4 mmol de agua.
- 6.- Adicionar el fármaco a la solución eritrocítica.

- 7.- Restaurar las condiciones isotónicas por la adición de NaCl.
- 8.- Incubar a 37°C de 30 a 50 minutos.
- 9.- Centrifugar para obtener los eritrocitos fantasmas.
- 10.- Lavar tres veces los eritrocitos fantasmas con solución isotónica.

PORCENTAJE GENERAL DE ENTRAMPAMIENTO

No reportado

Tabla 2.6. Fármacos entrampados en eritrocitos fantasmas

Fármaco	PM	Porcentaje entrampado	Especie utilizada
Desferroxamina <sup>46</sup>	561	NR	Ratas
Asparginasa <sup>47</sup>		20%	Monos
Arginasa <sup>48</sup>		5-14%	Humano
Daunomicina <sup>50</sup>		4mg/ml	Raton
B-Glucosidasa <sup>51</sup>		NR	Humano
B-Galactosidasa <sup>51</sup>		NR	Humano
Clorpromazina <sup>49</sup>	310	NR	NR

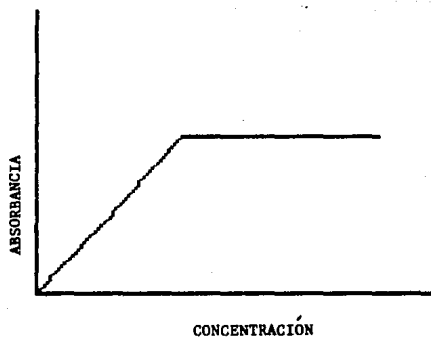
## 2.2. ACCIÓN SOSTENIDA

El objetivo principal del tratamiento con fármacos se puede decir que es la disminución pronta y constante de la enfermedad o de sus síntomas. Para lograr este propósito se han realizado investigaciones con el fin de encontrar una combinación fármaco-portador ideal mediante el cual se alcancen y mantengan por mayor tiempo los niveles de fármaco a un valor constante en un intervalo terapéutico específico, (Figura 2.8a); esto es lo que se conoce como acción sostenida. Esta forma de dosificación está planeada para llevar a cabo una liberación rápida de una fracción predeterminada de la dosis total. Esta fracción es una cantidad de fármaco que producirá la respuesta farmacológica deseada. La fracción remanente de la dosis total es entonces liberada tan rápido como es requerida para mantener constante la intensidad máxima inicial de la actividad farmacológica por algún período de tiempo mayor que el tiempo esperado por la administración de una dosis usual de fármaco (Figura 2.8b).<sup>52-54</sup>

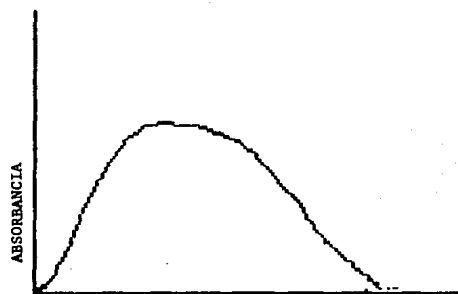
Así, la velocidad de absorción del fármaco de la dosis de mantenimiento en el cuerpo debería igualar la velocidad de eliminación durante el tiempo que se requiera mantener la respuesta farmacológica.<sup>55</sup>

Un beneficio potencial de una combinación fármaco-portador es que se puede utilizar para mantener los niveles del fármaco dentro del índice terapéutico conocido clínicamente, sin riesgos de alterar sus propiedades químicas o impartir efectos secundarios indeseados. Recientemente se han utilizado liposomas como sistemas portadores de fármacos.<sup>55, 56</sup>





( A )



( B )  
CONCENTRACION

Figura 2.8. Caso para una acción sostenida (a). Caso para una dosis simple (b).

## 2.3. -MODELOS MATEMÁTICOS

### 2.3.1. DIFUSIÓN.

En un sistema disperso las partículas difunden espontáneamente desde las zonas de concentración más elevadas a aquellas otras de concentración inferior, hasta que la concentración se hace completamente uniforme en todo el sistema.<sup>98</sup>

La difusión es el principal mecanismo para la liberación de sustancias.

#### PRIMERA Y SEGUNDA LEY DE FICK.

En una forma general la energía parcial molar de un soluto en solución esta dada por la siguiente ecuación :

$$\mu = \mu^{\circ} + R T \ln a$$

Donde :  $\mu$  = energía parcial molar libre.

$\mu^{\circ}$  = energía parcial molar libre en el estado estándar.

R = constante universal de los gases.

T = temperatura absoluta.

a = actividad del soluto.

Si la solución es diluida puede ser tratada como ideal por lo cual quedaria :

$$\mu = \mu^{\circ} + R T \ln C$$

Donde : C = concentración molar del soluto.

Asumiendo que la molécula es inalterable, el cambio en la energía molar libre  $d\mu$  debido a un gradiente de concentración  $dC$  se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{d\mu}{dC} = \frac{d}{dC} (\mu^0 + R T \ln C)$$

ó

$$d\mu = R T (dC / C)$$

Esta diferencia de energía libre es el trabajo realizado sobre el sistema en la transferencia de una mol de soluto desde  $C + dC$  hasta  $C$ . El trabajo es la fuerza por la diferencia de distancia, ó  $d\mu = -Fdx$  quedando:

$$F = - \frac{d\mu}{dx} = - \frac{RT}{C} \left[ \frac{dC}{dx} \right]$$

La velocidad de una molécula se incrementa cuando se aplica una fuerza dirigida hasta que ésta se iguala con la fuerza friccional.

Esta fuerza friccional ( $F_f$ ) es directamente proporcional a la velocidad de la molécula y el número de moléculas.

$$F_f = N v f$$

Donde :  $v$  = velocidad en la dirección  $x$ .  
 $N$  = número de moléculas por mol.  
 $f$  = constante de proporcionalidad.

Por lo tanto:

$$Nvf = - \frac{RT}{C} \left[ \frac{dC}{dx} \right]$$

ó

$$Cv = \frac{RT}{Nf} \left[ \frac{dC}{dx} \right] = \frac{KT}{f} \left[ \frac{dC}{dx} \right]$$

Donde  $K$  = constante de Boltzmann  
 $Cv$  = flujo (J)

Por tanto:

$$J = \frac{KT}{f} \left( \frac{dC}{dx} \right)$$

El flujo es la cantidad del soluto a través de un plano de área superficial, la cual es normal para la dirección de transporte, por unidad de tiempo.

En este punto, el flujo se ha relacionado al gradiente de concentración,  $K$  y  $f$  son constantes para cada sustancia y si se mantiene constante la temperatura entonces la relación  $KT/f$  puede tomarse como una constante global para cada sustancia. Einstein demostró que esta constante de proporcionalidad es igual al

coeficiente de difusión (D) por lo tanto:

$$J = - D \left[ \frac{dC}{dx} \right]$$

Esta es la forma unidimensional de la primera ley de Fick. El signo negativo en la ecuación anterior nos indica que cuando el gradiente de concentración es positivo, el flujo será en la dirección de la concentración menor, explicando adecuadamente el proceso de difusión.

Sin embargo, cuando las concentraciones están cambiando con el tiempo se puede conocer  $dC/dx$  al inicio del experimento, pero el flujo de masa continuamente estará cambiando el gradiente de concentración. Por lo cual es necesario introducir tiempo como una variable. Entonces se tiene que:

$$J = - D(x) \left[ \frac{\partial C}{\partial x} \right],$$

Donde la derivada parcial indica que la derivada con respecto a  $x$  es tomada a cierto tiempo ( $t$ ). Aquí se ha asumido que el coeficiente de difusión es independiente del tiempo pero puede depender de la posición y puede escribirse  $D(x)$ . La figura 2.10 considera el flujo de moléculas a través de una caja rectangular de largo  $\delta x$  y un área superficial  $A$ . Considerando lo anterior se obtiene la siguiente ecuación:

$$J_{in} = J(x) = - D(x) \left[ \frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \right],$$

$$J_{\text{ex}} = J(x + \delta x)$$

o

$$J_{\text{ex}} = -D\delta x \left[ \frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \right]_t - \delta \left[ D\delta x \frac{\partial C(x,t)}{\partial x} \right]_t$$

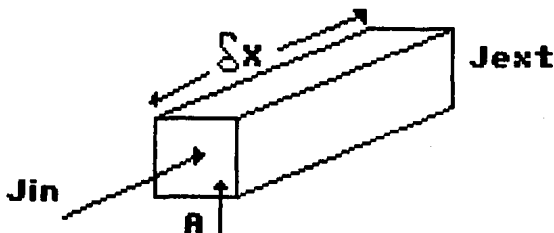


Figura 2.10. Flujo a través de una caja rectangular.

El cambio en la cantidad de soluto por unidad de tiempo dentro de la caja es  $J_{\text{in}} - J_{\text{ex}}$  y puede ser también igual a:

$$\left[ \frac{\delta C}{\delta t} \right] V$$

Donde  $V$  es el volumen de la caja rectangular, por lo tanto:  
 $V = A\delta x$

$$\frac{\delta C}{\delta x} = \frac{C J_{\text{in}} A - J_{\text{ex}} A}{A\delta x}$$

$$\frac{-D \left[ \frac{\partial C}{\partial x} \right]_A + \left[ D \left[ \frac{\partial C}{\partial x} \right]_L + \delta D \left[ \frac{\partial C}{\partial x} \right]_L \right]_A}{A \delta x}$$

$\delta$

$$\frac{\delta C}{\delta t} = \frac{\delta \left[ D \left[ \frac{\partial C}{\partial x} \right]_L \right]}{\delta x}$$

Tomando límites:

$$\lim_{\delta t \rightarrow 0} \frac{\delta C}{\delta t} = \lim_{\delta x \rightarrow 0} \frac{\delta \left[ D \left[ \frac{\delta C}{\delta x} \right] \right]_L}{\delta x}$$

da:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} D \left[ \frac{\partial C}{\partial x} \right]_L$$

la ecuación anterior es la segunda ley de Fick. Si D es independiente de la posición, entonces la ecuación anterior se simplifica a:<sup>50</sup>

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left[ \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right]$$

### 2.3.2. -NICOLAS A. PEPPAS.

A continuación se presenta una ecuación semiempírica simple bajo condiciones Sink. La forma general de esta ecuación es :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^{-n} \quad (1)$$

Donde  $M_t / M_\infty$  = Fracción liberada.

$t$  = Tiempo de liberación.

$K$  = Constante que contempla las características estructurales y geométricas de los sistemas de entrega.

$n$  = Exponente de liberación, indicativo del mecanismo de liberación.

La difusión del fármaco soluble en agua de una superficie plana con una liberación controlada mediante un dispositivo polimérico de grosor  $\delta$  puede ser expresado mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right) \quad (2)$$

Donde:  $D$  es independiente de la concentración. Bajo condiciones Sink estrictas tenemos que  $t=0$

$$-\frac{\delta}{2} < x < \frac{\delta}{2} \quad c = C_0 \quad (3)$$



$$t > 0 \quad x = \pm \frac{\delta}{2} \quad c = C_1 \quad (4)$$

Resolviendo la ecuación (2) bajo las condiciones (3) y (4) queda expresada de la siguiente manera:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left[ \frac{D_t}{\delta^2} \right]^{1/2} \left[ \pi^{-1/2} + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \operatorname{erfc} \frac{n\delta}{2\sqrt{Dt}} \right] \quad (5)$$

Con la expresión anterior puede analizarse la liberación del fármaco. Sin embargo para tiempos cortos ( $M_t/M_\infty < 0.60$ ) el segundo término tiende a cero quedando de la siguiente manera:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left[ \frac{D_t}{n\delta^2} \right]^{1/2} = Kt^{1/2} \quad (6)$$

Por consiguiente las gráficas de fracción de fármaco liberada en función de la raíz cuadrada del tiempo, bajo condiciones Sink se obtiene una línea recta si el mecanismo predominante de la liberación es la difusión Fickiana.

En muchas situaciones experimentales incluyendo el caso de sistemas poliméricos hinchables de liberación, el mecanismo de difusión es no fickiano, en estos casos se puede usar una expresión general de la ecuación (6).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad (7)$$

Esta ecuación puede usarse solo en sistemas donde el coeficiente de difusión del fármaco es claramente independiente de la concentración.

El análisis de la liberación usando la ecuación (1) requiere una buena reproducibilidad y análisis estadístico usando el 95 % de confianza. Para la determinación del exponente  $n$  puede usarse únicamente la porción inicial de la curva de liberación ( $M_t/M_\infty < 0.05$ ).

## 2.4. - CARACTERÍSTICAS DE LOS FÁRMACOS

### 2.4.1. - ÁCIDO NALIDÍXICO.

#### DESCRIPCIÓN

Nombre:

1-etil-1,4-dihidro-7-metil-4-oxo-1,8-naptiridina-3-ácido  
carboxílico

Fórmula molecular:  $C_{12}H_{12}N_2O_3$

Peso molecular: 232.24.

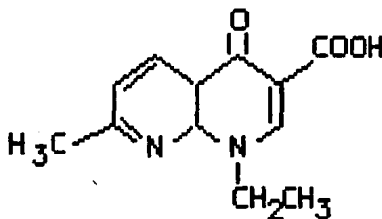


Figura 2.11. Fórmula estructural del ácido nalidíxico.

Apariencia y color:

El ácido nalidíxico es un cristal blanco o ligeramente amarillo.

## SOLUBILIDAD

Soluble en cloroformo y en soluciones de hidróxidos alcalinos y carbonatos alcalinos; poco soluble en alcohol; ligeramente soluble en éter, casi insoluble en agua.<sup>61</sup>

Tabla 2.7. Solubilidad del ácido nalidíxico.

Solvente	Solubilidad (mg/ml)
Cloroformo	3.5
Tolueno	1.6
Acetato de etilo	0.8
Metanol	1.3
Etano	0.9
Isopropanol	0.4
Agua destilada	0.1
Eter etílico	0.1

## ESPECTRO DE ABSORCIÓN

Zubenko y Shcherba reportaron que existen dos bandas de absorción en la región ultravioleta para el ácido nalidíxico en metanol y NaOH 0.1 N a 258 y 324 o 332 nm, respectivamente.

## ESTABILIDAD Y DEGRADACIÓN .

El ácido nalidíxico es estable por cinco años bajo condiciones razonables de temperatura y humedad.

#### ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

El ácido nalidixico es un antiséptico urinario para las infecciones de las vías urinarias por bacterias gram negativas. Efectivo cuando se toma por vía oral. No tiene actividad general significativa.

El ácido nalidixico inhibe muchas bacterias gram negativo in vitro a concentraciones de 1-5 mcg/ml. Se necesitan concentraciones mucho mayores para inhibir los organismos gram positivos. La mayor parte de las cepas de Escherichia coli son inhibidas, así como algunas de las aerobacter, Klebsiella y proteus. Las especies de pseudomonas generalmente son resistentes.

El ácido nalidixico puede bajar el pH de la orina para la inhibir el crecimiento de las bacterias. También es un inhibidor específico y poderoso de la síntesis de DNA por E.Coli. Esta inhibición de la autoduplicación del DNA puede ser la base de la acción quimioterápica de este compuesto.

#### ABSORCIÓN, METABOLISMO Y EXCRECIÓN

Después de la administración bucal, el medicamento es fácilmente absorbido en el intestino. En sangre, virtualmente todo el ácido nalidixico está firmemente unido a proteínas. Así pues no hay acción antibacteriana general importante. Cerca del 20% del medicamento absorbido es excretado en forma activa y 80% en forma inactiva como un conjugado con ácido glucurónico. Los valores del medicamento activo en la orina llegan hasta 20-250 mcg/ml.

#### DOSIS

La única indicación para este agente es la infección de las vías urinarias con organismos coliformes. La dosis para los adultos es de 1g por vía oral, 4 veces al día, durante una semana o más. La dosis para los niños es de 30-60 mg/kg/día por vía oral de 2-4 dosis divididas. Para uso prolongado la dosificación puede ser reducida.

#### REACCIONES ADVERSAS

El ácido nalidixico pueden provocar hiperglucemia y glucosuria. Ocasionalmente se presentan trastornos gastrointestinales, erupciones cutáneas, sensibilización a la luz solar, trastornos visuales y estimulación del SNC. Se han reportado convulsiones después de sobredosis.<sup>62-64</sup>

#### PREPARACIONES EXISTENTES

El ácido nalidixico (NegGram) se encuentra en tabletas de 250, 500 y 1000 mg o en una suspensión de 250 mg/5ml.

## 2.4.2. -DEXAMETASONA

### DESCRIPCIÓN.

Fórmula molecular:  $C_{22}H_{29}FO_5$

Peso molecular: 392.45

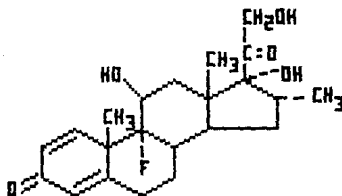


Figura 2.12 Fórmula estructural de la Dexametasona.

### APARIENCIA, COLOR Y OLOR .

Cristales de color blanco o blanco amarillento, inodoro.

### ABSORBANCIA EN ULTRAVIOLETA.

La dexametasona exhibe una banda simple cerca de 240 nm en solución.

### ESTABILIDAD

La dexametasona es estable al aire pero debe ser protegida de la luz.

### PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS.

La dexametasona es uno de los esteroides sintéticos de mayor actividad antiinflamatoria; su potencia es aproximadamente 25 veces mayor que la del cortisol, pero su actividad mineralocorticosteroide es prácticamente nula. Su dosis para el

efecto antiinflamatorio es de 0.75mg. Es eficaz por vía oral y vía parenteral.

#### SOLUBILIDAD

Tabla 2.8. Solubilidad de la Dexametasona en diferentes disolventes.

Disolvente	Temperatura	Solubilidad
agua destilada	37°C	11.6 mg/ 100ml
agua destilada	25°C	8.4 mg/ 100ml.
agua destilada	25°C	10.0 mg/ 100ml.
miristato de isopropilo	37°C	23.3 mg/ 100ml.
aceite mineral	37°C	0.01 mg/ 100ml.
etanol	---	1 en 42
cloroformo	---	1 en 163
acetona	---	soluble
eter	---	poco soluble
acetato de etilo	25°C	4.1mg/g
piridina	---	~ 10%

#### INDICACIONES.

Es útil para el tratamiento de inflamaciones corneales, artritis reumatoide, otras enfermedades de la colágena, dermatosis alérgica y otras enfermedades de la piel. También se usa en el tratamiento de algunas leucemias, linfomas y anemias hemolíticas, así como en inflamaciones de tejido blando y asma bronquial.



#### DOSES Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN.

En enfermedades crónicas no graves la dosis es de 0.5-1 mg al día por vía oral dividida en 2-4 fracciones. En enfermedades agudas que amenace la vida como en la carditis reumática aguda, crisis de LED, reacciones alérgicas, pénfigo etc. se usan de 4-12 mg. al día por vía intravenosa dividida por lo menos en 4 fracciones, aumentando la dosis si es necesario para lograr el control del padecimiento. <sup>66</sup>

#### PRESENTACIONES.

##### ALIN (Chinoin)

Frasco con 30 tabletas de 0.5 mg; misma presentación con tabletas de 0.75 mg.

##### ALIN DEPTO (Chinoin)

Ampolleta suspensión de 1 ml con 7.88 mg de dexametasona base.

##### DECADRON (Merck Sharp & Dohme)

Frasco ampula de 2ml con 8mg de fosfato sódico de dexametasona.

##### DEXOCLIN (Clin-Byla)

Frasco gotero con 5 ml al 0.1% de dexametasona equivalente a una concentración de 1mg/ml.

### **CAPITULO III**

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. MATERIAL

##### 3.1.1. MATERIAL DE CRISTALERIA

Pipetas volumétricas.

Vasos de precipitado.

Agitadores.

Matraz volumétrico.

Probetas.

Tubos de ensaye.

Frascos viales.

Pipetas pasteur.

Pipetas graduadas.

Cámara de Newvauwer.

##### 3.1.2. EQUIPO

Centrifuga.

Balanza analítica.

Agitador magnético.

Agitador mecánico.

Potenciómetro.

Microscopio de fluorescencia. Zeiss. West. Germany 2008.

Microscopio de barrido. JSM-25II. Scanning microscope.

Espectrofotómetro Beckman modelo 28.

Secador de muestras a punto crítico.  
Fine coat ion sputter J.F.C.-1100.

### 3.1.3. REACTIVOS

NaCl

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

KCl

Glucosa

NaHCO<sub>3</sub>

Membrana (tamaño de poro 0.0009 mm.).

### 3.1.4. PRINCIPIOS ACTIVOS

Dexametasona

Acido Nalidixico

### 3.1.5. MATERIAL BIOLÓGICO

Sangre humana fresca

### 3.2. MÉTODOS

#### 3.2.1. METODOLOGÍA PARA ENTRAMPAMIENTO

- 1.- Extraer sangre de pacientes sanos en tubos con heparina.
- 2.- Centrifugar a 2500 rpm durante 15 minutos.
- 3.- Desechar el plasma y las células blancas.
- 4.- Colocar 1 ml del paquete celular en tubos de ensayo.
- 5.- Adicionar 4 ml de la solución hipotónica 0.67 de Hank.
- 6.- Agitar cuidadosamente.
- 7.- Centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos.
- 8.- Desechar el sobrenadante y adicionar 4 ml de solución hipotónica con fármaco a una concentración de 5mg/ml.
- 9.- Agitar cuidadosamente y dejar así durante una hora.
- 10.- Transcurrido este tiempo centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos.
- 11.- Adicionar 4 ml de solución isotónica de Hank para restaurar condiciones.
- 12.- Centrifugar y lavar el paquete eritrocítico.

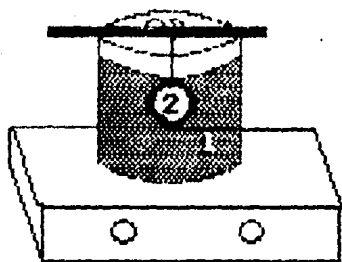
#### 3.2.2. METODOLOGÍA PARA LIBERACIÓN

- 1.- Colocar 1 ml. del paquete eritrocítico en los atados y cestas (Figuras 3.1).
- 2.- Colocar los dispositivos anteriores en 80 ml. de solución isotónica de Hank.
- 3.- Tomar muestras a los siguientes tiempos: 0.25, 0.5, 1, 2, 3, .... 24 horas.

- 4.- Leer directamente las muestras en el espectrofómetro.
- 5.- Regresar la muestra al medio de liberación.

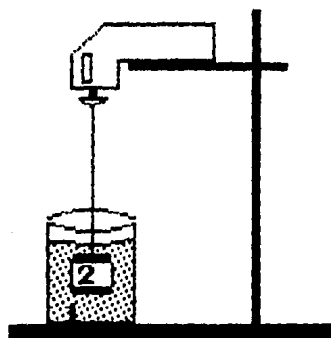
### 3.2.3. METODOLOGÍA PARA MICROSCOPIA

- 1.- Colocar 0.5 mililitros de paquete eritrocítico en 4 mililitros de glutaraldehído al 2% en solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.2.
- 2.- Agitar lentamente y dejarlo reposar durante media hora.
- 3.- Centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos.
- 4.-Lavar el paquete eritrocítico con 4 ml de solución amortiguadora de fosfatos.
- 5.- Suspender el paquete eritrocítico en 4 mililitros de solución amortiguadora de fosfatos.
- 6.- Colocar una gota de la suspensión anterior en una placa de agarosa.
- 7.- Fijar durante una hora.
- 8.- Transcurrido este tiempo deshidratar las muestras con concentraciones de alcohol a diferentes concentraciones partiendo del 50 % y siguiendo con 60,70,80,90, y alcohol absoluto.
- 9.- Secar a punto crítico la muestra con CO<sub>2</sub>
- 10.- Cubrir de oro.
- 11.- Observar al microscopio electrónico de barrido.<sup>68</sup>



### SISTEMA DE ATADOS

1. SOLUCIÓN DE HANK ISOTÓNICA
2. ERITROCITOS EN MEMBRANA DE DIÁLISIS



### SISTEMA DE CESTAS

Figura 8.1. Esquema de los sistemas de liberación usados.

## **CAPITULO IV**



#### 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El proceso de entrapamiento para la dexametasona en un mililitro de eritrocitos se llevó a cabo en tres días diferentes por duplicado. Los datos obtenidos pueden verse en la Figura 4.1 (en el segundo día solo se obtuvo un dato) los cuales poseen una media de 7.6876 y una desviación estándar de 0.9821. Como puede verse las cantidades entrapadas de dexametasona se encuentran entre 6.2-8.7 mg.

Los eritrocitos con dexametasona se colocaron en el medio de liberación durante 24 hrs. utilizando el método de atados. No se obtuvieron datos de liberación. Por lo cual se realizó un barrido de la solución final, en el cual puede verse un pico a 206nm (Figura 4.2).

Con lo que respecta al ácido nalidixico el proceso de entrapamiento se realizó en cinco días diferentes por duplicado (Figura 4.3). Los datos obtenidos tienen una media de 5.0716 y una desviación estándar de 1.9393. Las cantidades entrapadas de ácido nalidixico se encuentran entre 1.8-7.5 mg

Para ilustrar la liberación de ácido nalidixico desde los eritrocitos se eligieron 8 conjuntos de datos para cada uno de los métodos (Figuras 4.4. y 4.5).

Se hizo la comparación entre las concentraciones liberadas (mg/ml) de ácido nalidixico para los métodos antes mencionados en función de los días trabajados (Figura 4.6).

En esta comparación se realizó un análisis de variancia de cantidad liberada ver tabla 4.1. También se compararon las cantidades atrapadas de ácido nalidixico y las cantidades liberadas para cada uno de los métodos en función de los días trabajados (Figuras 4.7 para atados y 4.8 para cestas).

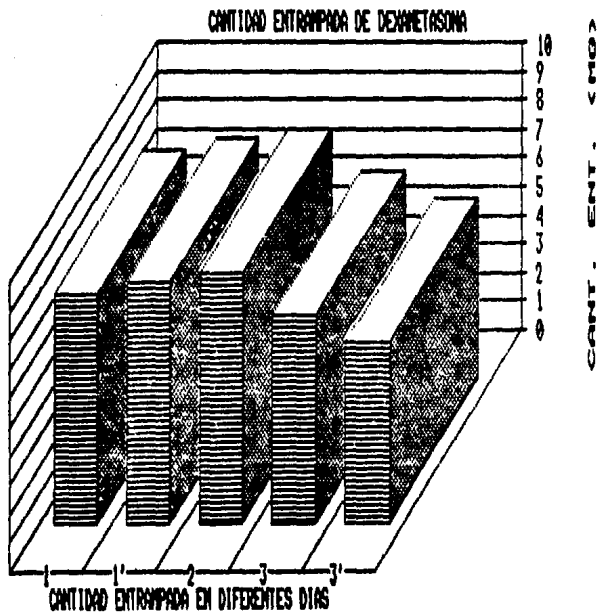


Figura 4.1 . Gráfica de cantidad atrapada de Dexametasona en función de los días trabajados.

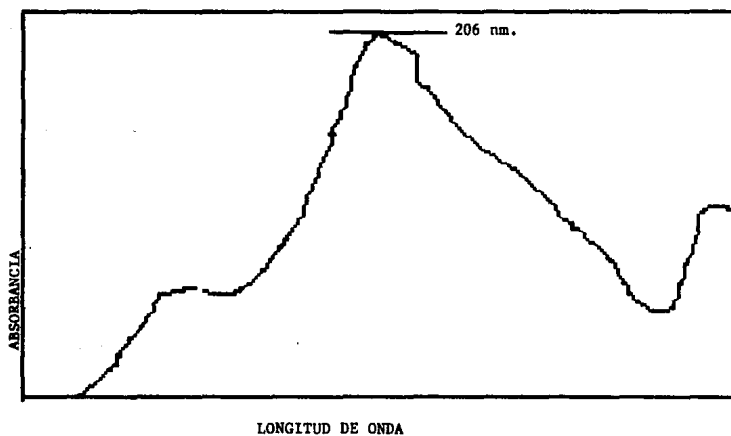


Figura 4.2. Barrido de la solución final de liberación de Dexametasona. Escala: 100 nm/min. Velocidad de la carta 2 in/min.

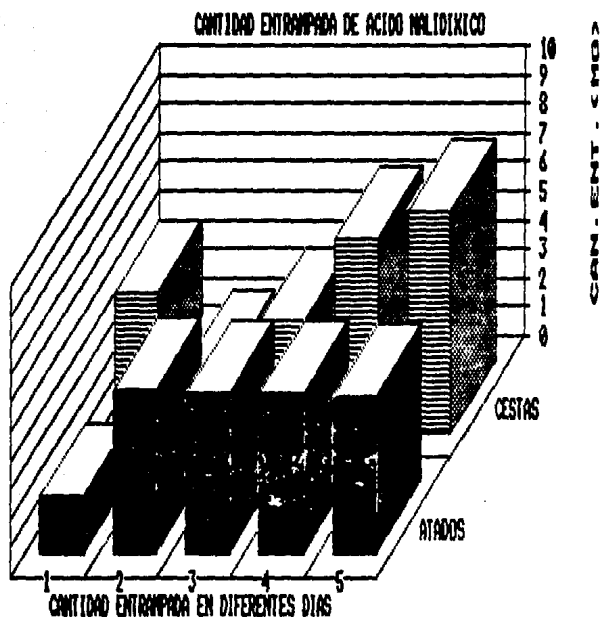


Figura 4.2. Gráfica de cantidad promedio entrampada de ácido malidico en función de los días trabajados para los métodos de cestas y atados.

LIBERACIÓN DE ACIDO MALIDINICO DESDE ERITROCITOS

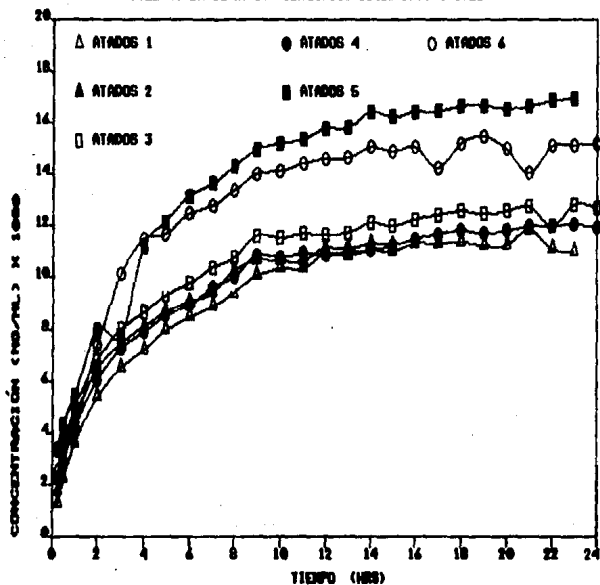


Figura 4.4. Gráfica de concentración liberada de Acido malidínico en función del tiempo utilizando el método de atados.

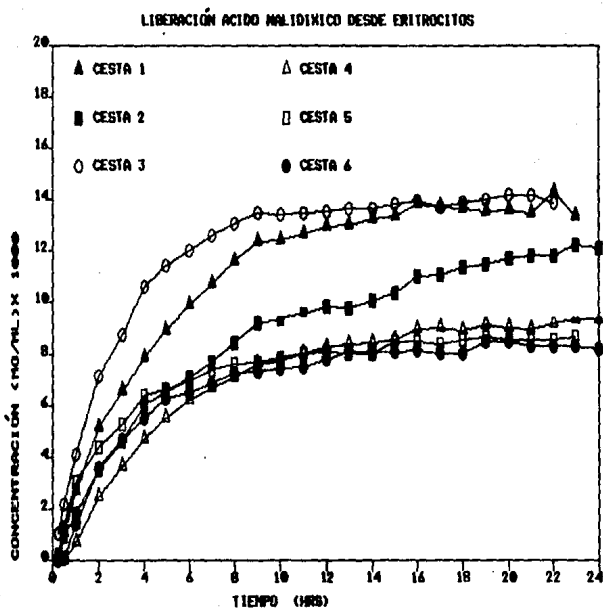


Figura 4.5 . Gráfica de concentración liberada de Ácido maláxico en función del tiempo utilizando el método de cestas.

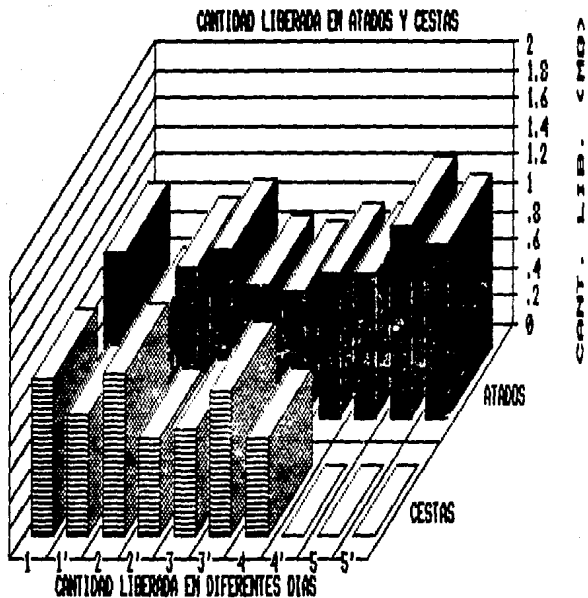


Figura 4.6. Gráfica de cantidad liberada de ácido nalidíxico desde los eritrocitos para los métodos de atados y cestas en función de los días trabajados.

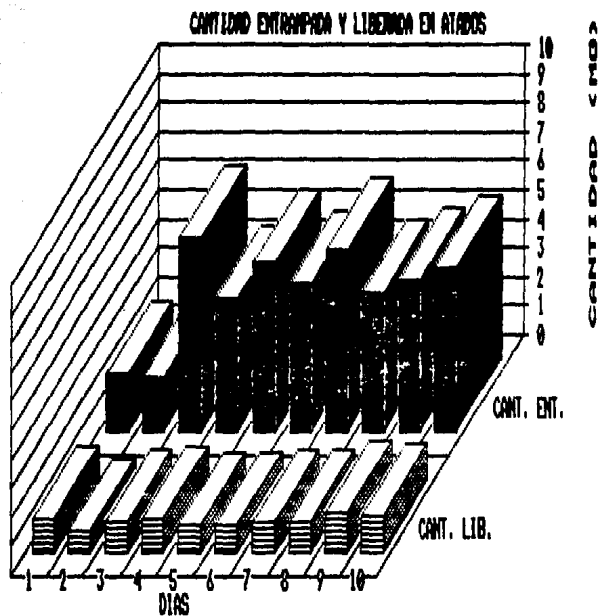


Figura 4.7. Gráfica de comparación entre la cantidad entrapada y liberada para el método de atados en función de los días trabajados.



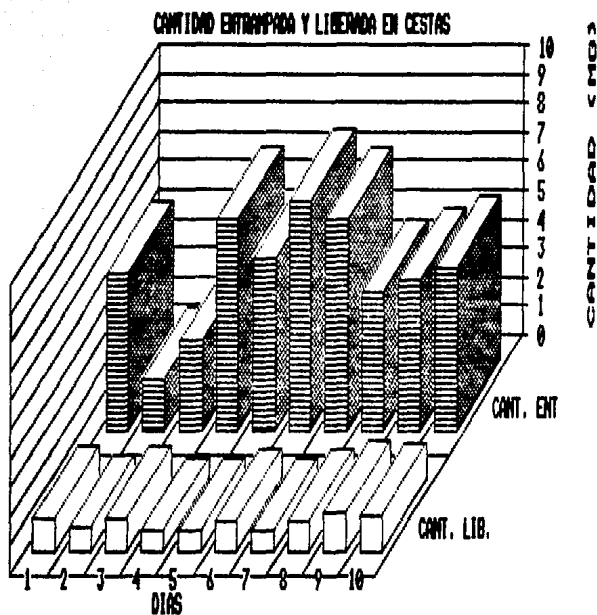


Figura 4.8. Gráfica de comparación entre la cantidad entrampada y liberada para el método de cestas en función de los días trabajados

Para comprobar que los datos de liberación obtenidos pertenecían al ácido nalidixico se hizo un barrido de la solución final de liberación (Figura 4.9). Donde puede verse el pico característico del ácido nalidixico a 200 nm y otro pico a 210 nm.

El tratamiento de los datos de liberación de ácido nalidixico se llevo a cabo bajo las condiciones de dos modelos: 1) Modelo de Peppas y 2) modelo eritrocítico.

El modelo de Peppas aplicado a los datos bajo la condición de  $M_t/M_\infty$  0.5 puede verse en las Figuras 4.10-4.13. Al ocupar todos los datos se obtuvieron las Figuras 4.14-4.17. Para cada una de las curvas se obtuvieron datos de correlación y pendiente. Así mismo se realizó un análisis de variancia para pendientes (tablas 4.2-4.3) y correlaciones (tabla 4.4.-4.5).

Para el modelo eritrocítico se utilizaron todos los datos de liberación obtenidos en las 24 horas de muestreo (Figuras 4.18-4.21). Además, se realizó un análisis de variancia para pendiente y correlación (tablas 4.6-4.7).

TABLA 4.1 ANÁLISIS DE VARIANCIA DE CONCENTRACIÓN LIBERADA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	F
MÉTODO	1	8.675049	8.675049	.4345747
DÍAS	4	18.04785	4.511963	.2260258
ERROR DE MUESTREO	10	72.36646	7.236646	
ERROR	3	59.88648	19.96216	

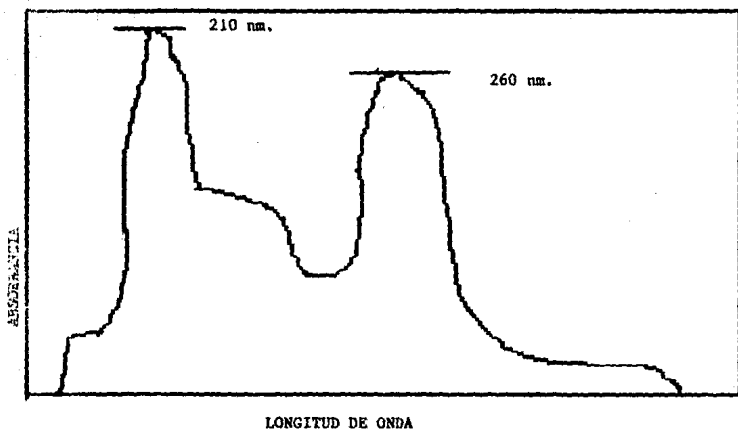


Figura. 4.9. Barrido de la solución final de liberación de Ácido nalidíxico.

FORMA LOGARÍTMICA DEL MODELO DE PEPPAS EN ATADOS

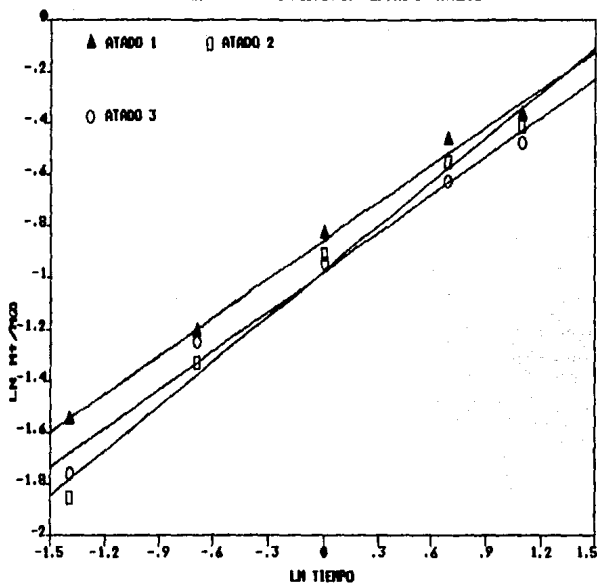


Figura 4.10. Gráfica de liberación de ácido nalidíxico utilizando la forma logarítmica del modelo matemático de Peppas con  $M_t/M_\infty < 0.6$ . Para el método de atados.

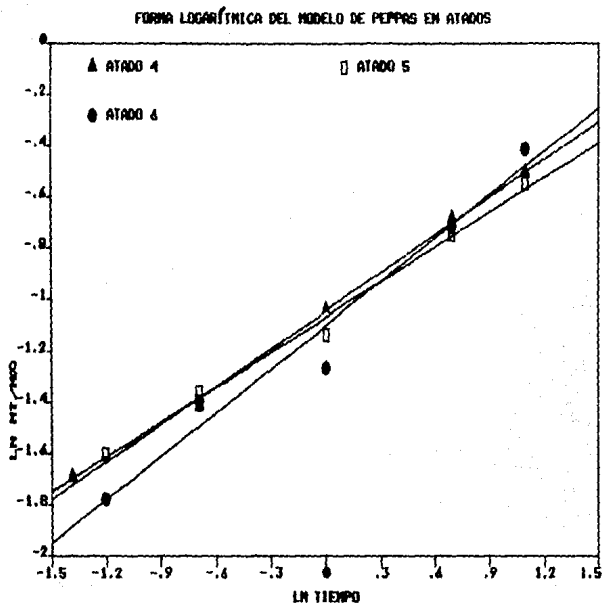


Figura 4.11. Gráfica de liberación de ácido ascórbico utilizando la forma logarífmica del modelo matemático de Peppas con  $MI/MCO < 0.6$ . Para el método de atados.

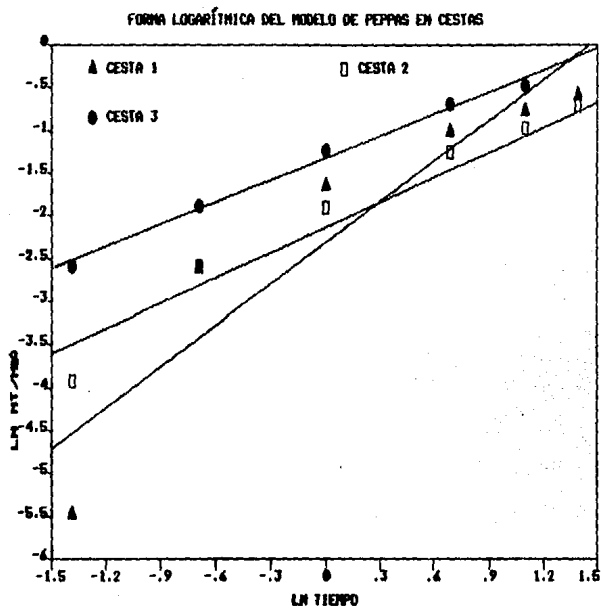


Figura 4.12. Gráfica de liberación de ácido nalidixico utilizando la forma logarítmica del modelo matemático de Peppas con  $M/M_{\infty} < 0.6$ . Para el método de cestas.

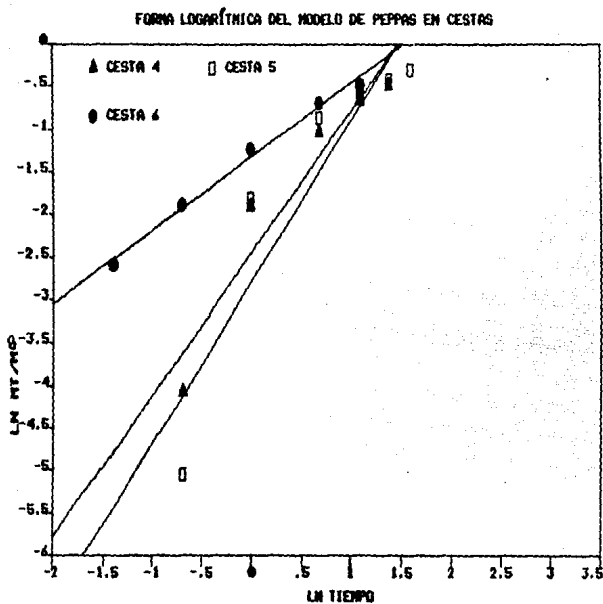


Figura 4.28. Gráfica de liberación de ácido valdánico utilizando la forma logarítmica del modelo matemático de Peppas con  $MT/MG < 0.5$ . Para el método de cestas.

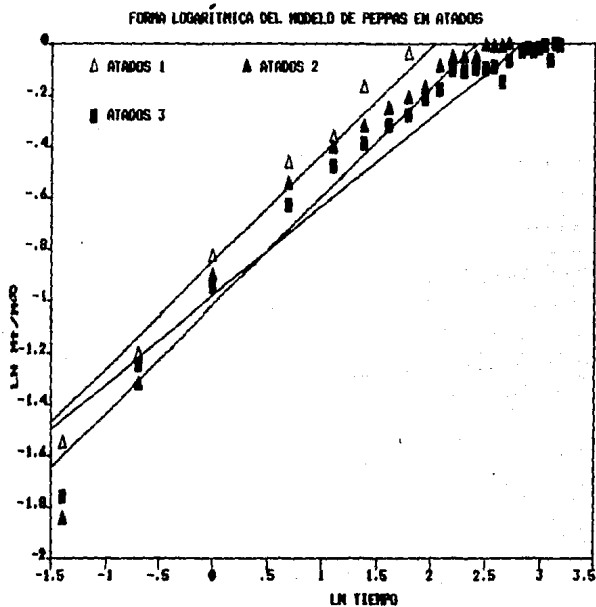


Figura 4.14. Gráfica de liberación de ácido valproico utilizando la forma logarítmica del modelo matemático de peppas con todos los datos. Para el método de atados.



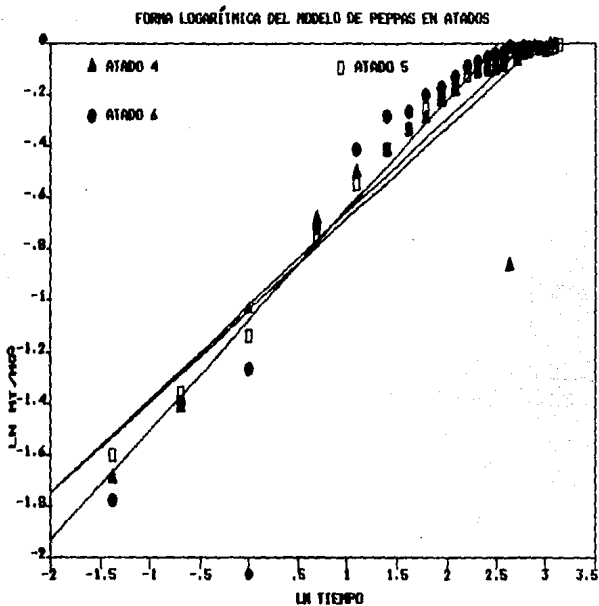


Figura 4.15. Gráfica de liberación de ácido valdecoxibico utilizando la forma logarítmica del modelo matemático de Peppas con todos los datos. Para el método de atados.

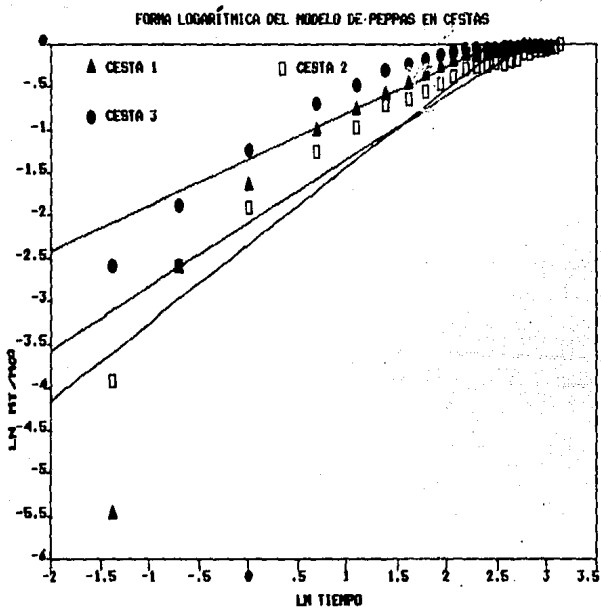


Figura 4.16. Gráfica de liberación de ácido ascórbico utilizando la forma logarítmica del modelo matemático de Peppas con todos los datos. Para el método de cestas.

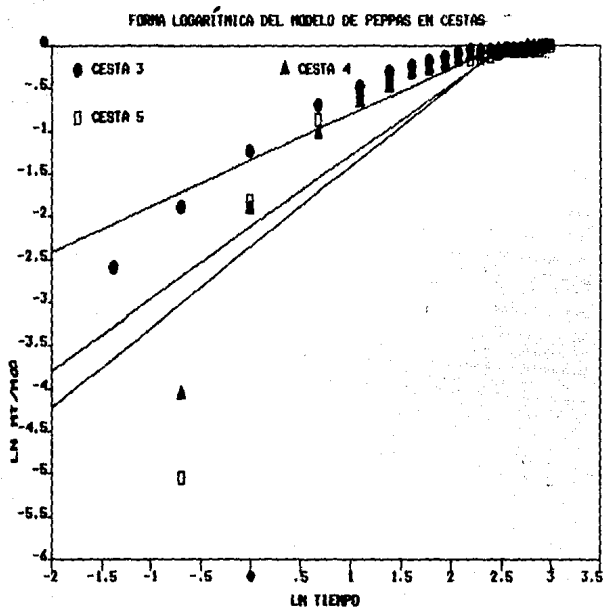


Figura 4.17. Gráfica de liberación de ácido salicílico utilizando la forma logarítmica del modelo matemático de Peppas con todos los datos. Para el método de cestas.

TABLA 4.2 ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA PENDIENTES CON  
MT/MINF < 0.6

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	F
MÉTODO	1	1.556476	1.556476	3.746082
DIAS	4	0.6026106	0.1506527	0.3625866
ERROR DE MUESTREO	10	1.511206	0.1511206	
ERROR	3	1.246483	0.4154943	

TABLA 4.3 ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA PENDIENTES CON  
MT/MINF > 0.6

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	F
MÉTODO	1	3.49849	3.49849	-0.283973
DIAS	4	1.570019	0.3925047	-3.1859E-2
ERROR DE MUESTREO	10	0.3169127	3.16912E-2	
ERROR	3	-36.95928	-12.31976	

TABLA 4.4. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA CORRELACIONES  
CON  $MT/MIN F < 0.6$

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	F
MÉTODO	1	2.59208E-03	2.592087E-03	2.993392
DIAS	4	1.436234E-03	3.590584E-04	0.4146476
ERROR DE MUESTREO	10	3.5552298E-03	3.555298E-04	
ERROR	3	2.597809E-03	8.659363E-04	

TABLA 4.5 ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA CORRELACIONES  
CON  $MT/MIN F > 0.6$

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	F
MÉTODO	1	2.110291E-02	2.110291E-02	-1.1188E-3
DIAS	4	8.537292E-03	2.134323E-03	-1.1316E-4
ERROR DE MUESTREO	10	7.669449E-03	7.669222E-04	
ERROR	3	-56.58317	-18.86106	

MODELO ERITROCÍTICO: ATADOS 1-3

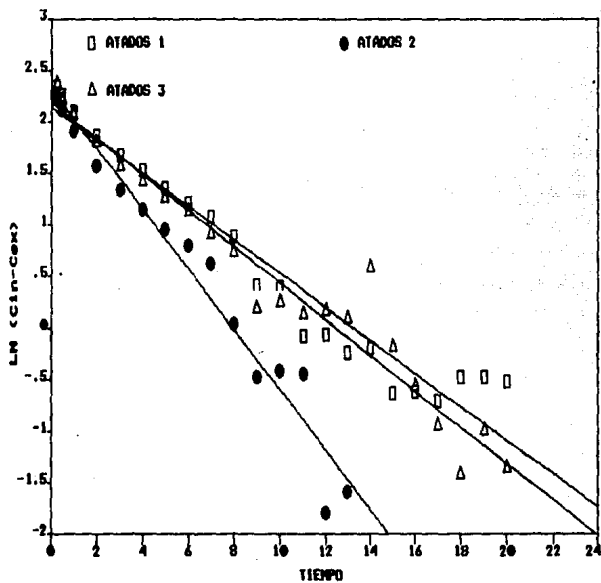


Figura 4.18. Gráfica de liberación de ácido nalidíxico utilizando el modelo eritrocítico. Para el método de atados.

MODELO ERITROCÍTICO: ATADOS 4-6

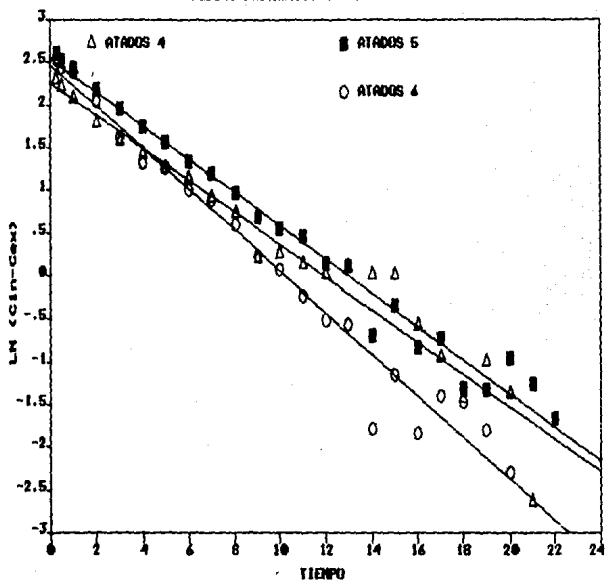


Figura 4.19 Gráfica de liberación de ácido nalidíxico utilizando el modelo eritrocítico para el método de atados.

MODELO ERITROCÍTICO: CESTAS 1-3

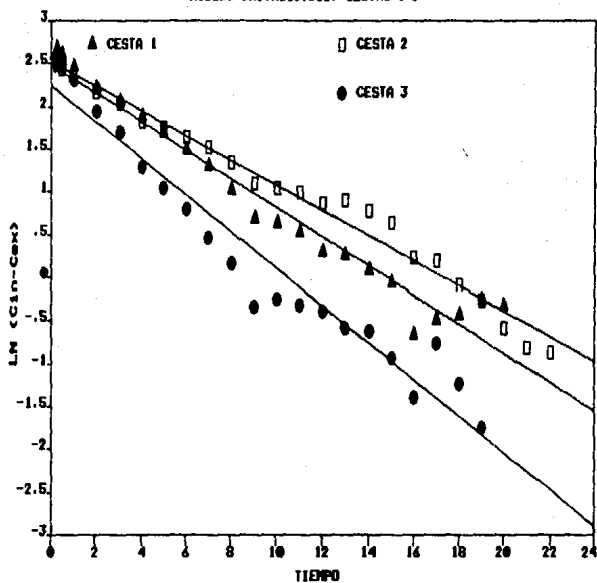


Figura 4.20. Gráfica de liberación de ácido nalidíxico utilizando el modelo eritrocítico para el método de cestas.



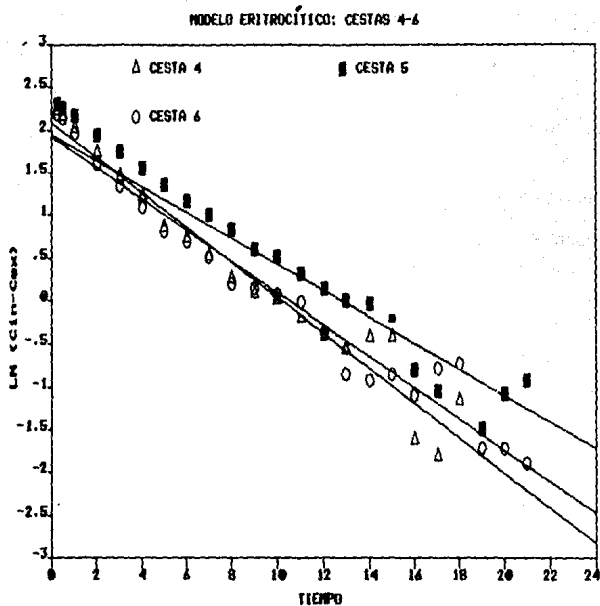


Figura 4.21. Gráfica de liberación de ácido nalidíxico utilizando el modelo eritrocítico. Para el método de cestas.

TABLA 4.6 ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA PENDIENTES DEL MODELO ERITROCÍTICO

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	F
MÉTODO	1	4.912615E-03	4.912615E-03	.3173308
DIAS	4	1.463664E-02	3.659159E-03	.2363637
ERROR DE MUESTREO	10	1.500482E-02	1.509482E-03	
ERROR	3	4.644317E-02	1.548106E-02	

TABLA 4.7 ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA CORRELACIÓN DEL MODELO ERITROCÍTICO

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	F
MÉTODO	1	6.484986E-04	6.484986E-04	2.26007E-4
DIAS	4	3.408432E-02	8.52108E-03	2.96966E-3
ERROR DE MUESTREO	10	1.787186E-03	1.787186E-04	
ERROR	3	-8.608122	-2.869374	

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Para la observación de los cambios morfológicos de los eritrocitos durante el proceso de entrapamiento se trabajó únicamente con los eritrocitos tratados con ácido nalidixico.

Los eritrocitos control aparecieron en su gran mayoría como discos biconcavos, en general no presentaron irregularidades en su membrana (Figura 4.22) aunque en algunos campos se observaron eritrocitos en forma de estrellas (Figura 4.23).

Los eritrocitos al ser colocados en un medio hipotónico presentan una forma casi esférica, aparentemente sin cambios en su membrana (Figuras 4.24-4.25).

Después de separar los eritrocitos del medio hipotónico se les adicionó una solución de Ácido nalidixico en medio hipotónico observandose que la mayor parte de los eritrocitos poseen un volumen celular intermedio entre el volumen celular de los eritrocitos control y los eritrocitos en un medio hipotónico (Figura 4.26 y 4.27). Algo importante en estas figuras es la presencia poros en los eritrocitos.

Al colocar los eritrocitos en un medio isotónico casi recobran su tamaño original y se ve que algunos eritrocitos tienen pequeños poros en su membrana (Figuras 4.28 y 4.29).

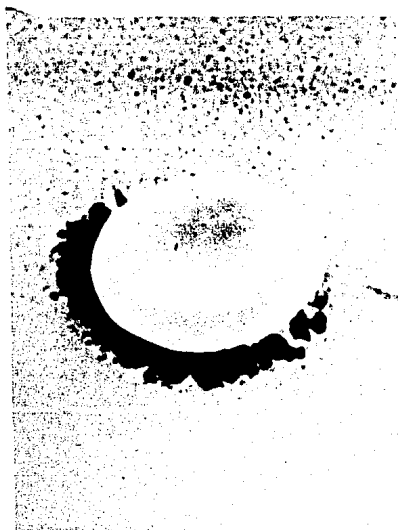


Figura 4.22 Microfotografía de un eritrocito normal (X10000) al microscopio electrónico de barrido.

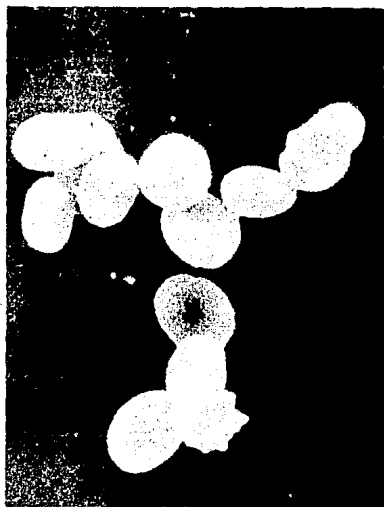


Figura 4.29. Microfotografía de eritrocitos normales (X4500). Se observan eritrocitos crenados (forma de estrella), así como el apilamiento característico de los eritrocitos al pasar a través de los capilares (releaux).

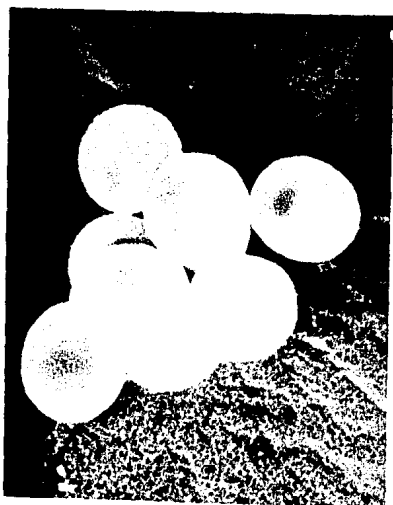


Figura 4.24 Microfotografía de eritrocitos en medio hipotónico(X4500). Los eritrocitos pierden la forma biconcava, tienden a una forma esférica sin aparentes alteraciones en su membrana.

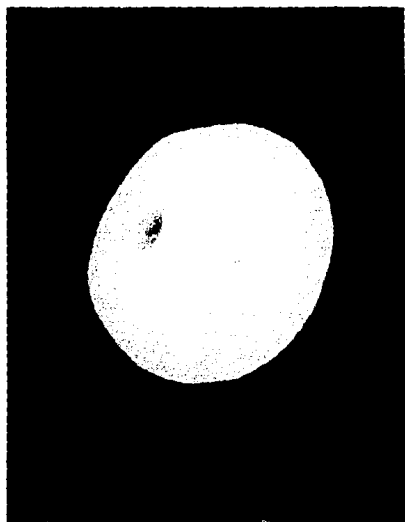


Figura 4.25 Microfotografía del acercamiento de un eritrocito en medio hipotónico ( $\times 10000$ ). Puede apreciarse con mayor claridad que no existen alteraciones en la membrana del eritrocito.

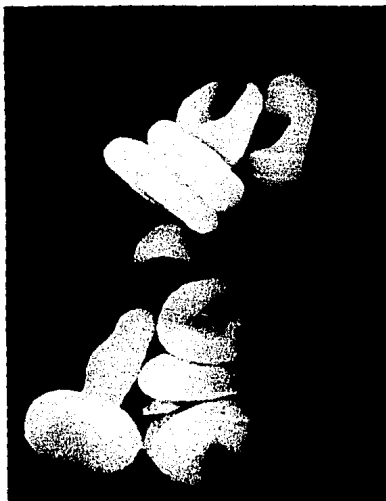


Figura 4.26 Microfotografía de eritrocitos en solución de Hank hipotónica con fármaco (X4500). Existen eritrocitos deformes y en algunos pueden observarse agujeros en la membrana. También se aprecia una disminución del volumen celular.





Figura 4.27 Acercamiento de la figura anterior (X10000).  
Se aprecia con claridad el poro en el eritrocito.

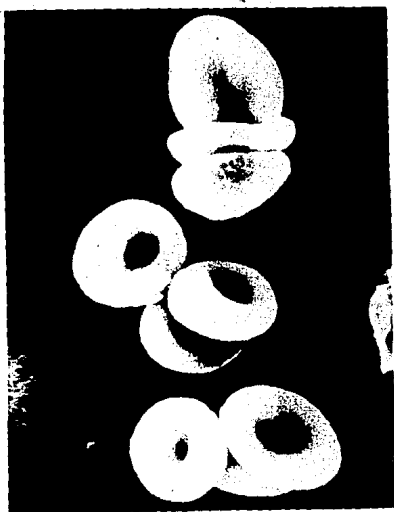


Figura 4.28 Microfotografía de eritrocitos en solución de Hank isotónica (X4500). Puede observarse el apilamiento al igual que al final de cada tratamiento. La mayor parte de los eritrocitos se muestran sin alteraciones en su membrana, sin embargo, algunos presentan rugosidades y pequeñas cavidades (posiblemente huellas dejadas por un poro).

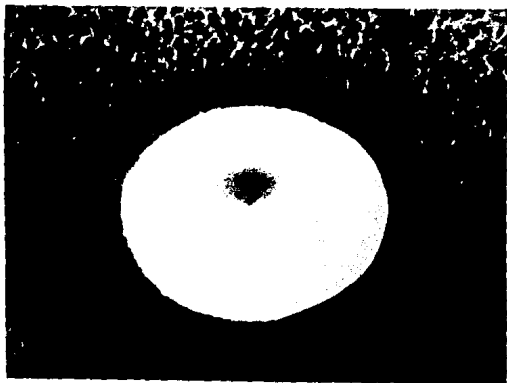


Figura 4.29 Acercamiento de un eritrocito con alteraciones en su membrana en medio isotónico de reconstitución (X50000). Pueden observarse claramente las huellas dejadas posiblemente por los poros por los cuales penetró el fármaco.

## CAPITULO V

## 5. DISCUSIÓN

El entrapamiento y la liberación de un fármaco en los eritrocitos depende de las características de ambos. La liposolubilidad, pKa, peso molecular, estructura molecular y el coeficiente de partición son las características más importantes de las que dependen estos procesos.

Sin embargo, una de ellas no es definitiva para determinarlos y así tenemos que al comparar las cantidades entrapadas de dexametasona y de ácido nalidixico (Figura 4.3) se observa que es mayor para la primera (Figura 4.1), a pesar de que posee un peso molecular mayor. Mientras que en la liberación los resultados indican que no sale de los eritrocitos.

Para corroborar lo anterior se realizó un barrido de la solución final de liberación. En el espectro no aparece el pico de máxima absorción de la dexametasona (244 nm.), pero pudo observarse un pico a 206 nm (Figura 4.2). Este resultado apoya el hecho de que la dexametasona no fué liberada por los eritrocitos, lo cual puede deberse a que como la dexametasona es un derivado del colesterol (componente de la membrana), por su parecido estructural se quedó en ella.

A diferencia de la dexametasona, el ácido nalidixico si se liberó de los eritrocitos. Esto se comprobó mediante el barrido que se realizó a la solución de liberación. El espectro muestra un pico de máxima absorbancia a 260 nm (característico del ácido nalidixico) pero también se obtuvo un pico a 210 nm (Figura 4.9).

El pico de 208-210 nm en ambos espectros indica la presencia de una sustancia proveniente probablemente de los eritrocitos. Para comprobarlo se realizó un barrido de la solución de liberación del control y en el espectro apareció nuevamente el pico a 208 nm (Figura A5).

Podría pensarse también que es fibrina (Ver anexo 2, Figura A6). Esto no puede ser posible porque el tamaño del poro de la membrana de diálisis no permite la salida de una proteína tan grande; suponemos que puede ser alguna sustancia proveniente de la lisis de algunos de los eritrocitos pero no puede asegurarse.

En las gráficas de concentración en función del tiempo para cada uno de los sistemas elegidos (Figuras 4.4-4.5) pudo observarse que todas las curvas siguen una misma tendencia. La concentración va aumentando rápidamente las primeras nueve horas, pero después de este tiempo sigue aumentando pero con una menor velocidad.

Lo anterior indica que aproximadamente a las nueve horas la concentración interna en el eritrocito y la concentración en el medio de liberación casi se equilibra.<sup>22</sup>

En estas mismas figuras podemos ver que a tiempos cortos la liberación es muy rápida de tal manera que aún a las 0.15 hrs se obtienen concentraciones de ácido nalidixico considerables. La causa de esto puede ser la solución que se encuentra en los espacios intercelulares del paquete de eritrocitos. El ácido nalidixico de la solución se encuentra disponible para salir al seno de la solución y el paso limitante no sería la membrana del eritrocito.

La liberación del ácido nalidíxico desde los eritrocitos se explicó mediante dos modelos: a) Peppas y b) modelo eritrocítico. A continuación se discuten ambos modelos.

#### a) MODELO DE PEPPAS

El modelo semiempírico de Peppas<sup>60</sup> es una relación matemática desarrollada a partir de la ecuación de difusión de Fick. Esta ecuación indica que la fracción liberada de fármaco está relacionada exponencialmente con el tiempo. El exponente "n" está relacionada con el tipo de mecanismo de liberación.

Cuando  $n=0.5$  se observa una difusión fickiana y la cantidad liberada es dependiente de  $t^{0.5}$ . Cuando  $n=1$ , se tiene un transporte de tipo II y la cantidad liberada es independiente del tiempo.

En las gráficas 4.4-4.5 se puede ver que la concentración liberada en función del tiempo alcanza un estado estacionario. Con este dato fue posible determinar la cantidad total liberada necesaria para encontrar las fracciones liberadas a cada tiempo y ajustar los datos al modelo de Peppas. Las correlaciones encontradas variaron de 0.95-0.998 además de una que fué de 0.92. Una correlación indica que tanto se ajustan los datos a un modelo, entonces nuestros datos pueden ajustarse al modelo de Peppas y explicar la liberación del ácido nalidíxico.

Los valores de n se encuentran en la tabla 5.1. Como puede verse existen valores diferentes de 0.5, al encontrar los intervalos de confianza y análisis estadístico se demuestra que pueden considerarse como 0.5 ( $\alpha=0.05$ ) y que las variaciones observadas solo son debidas al error experimental; esto se

observó tanto al considerar la totalidad de los datos como hasta  $Mt/Ma < 0.6$  y es debido a la gran variación de los datos.

Tabla 5.1. Valores de n para el modelo de Peppas considerando solo hasta  $Mt/Ma < 0.6$ .

MÉTODO	DÍAS				
	1	2	3	4	5
ATADOS	.4938	.57	.567	.3724	.4587
	1.1051	.41	.579	.4834	.5654
CESTAS	1.3921	.3185	.6403	1.6332	.8520
	.9532	.8618	1.214	1.189	2.10

Por lo tanto el mecanismo de liberación a partir del eritrocito es de tipo fickiano para los atados bajo las condiciones trabajadas, mientras que para las cestas podemos decir que existen varios mecanismos que explican la liberación.

Los factores que podrían causar variaciones son el día y el método ya que la liberación para cada método: cestas y atados, se efectuó por duplicado 5 días diferentes. Un análisis de variancia mostró que no existen diferencias significativas (tablas 4.2-4.7,  $\alpha=0.05$ ) entre métodos o días, ni al considerar la totalidad de datos o hasta  $Mt/Ma < 0.6$ .



## b) MODELO ERITROCÍTICO

En trabajos publicados solo en uno se menciona que la liberación a partir de los eritrocitos es de tipo fickiano<sup>19</sup> pero no mencionan la forma en que lo determinan. Para establecer un modelo que explique la liberación de los fármacos desde los eritrocitos se debe considerar su estructura y su composición.

En el interior de los eritrocitos existen proteínas a las cuales pueden unirse los fármacos, sin embargo el tiempo de permanencia de una molécula de fármaco a la proteína es muy corto (milésimas de segundo)<sup>22</sup>, esto provoca que la concentración en el interior del eritrocito sea constante. Bajo estas consideraciones se desarrolló el siguiente modelo.

Partiendo de la primera ley de difusión de Fick tenemos:

$$J = - DP \left( \frac{dC}{dx} \right) (1)$$

donde:

J = flujo

D = coeficiente de difusión

dC = diferencial de concentraciones

dx = grosor de la capa de difusión

P = constante de partición

debido a que no se varía el grosor de la membrana se toma como una constante ó quedando de la siguiente manera:

$$J = -DP \left[ \frac{dC}{\delta} \right] \quad (2)$$

Considerando que el flujo es la cantidad de moléculas que pasan a través de una membrana de area A en un determinado tiempo tenemos que :

$$J = \frac{dM}{dt A} \quad (3)$$

igualando la ecuación 2 y 3

$$\frac{dM}{dt A} = -DP \left[ \frac{dC}{\delta} \right] \quad (4)$$

Si la concentración interna del eritrocito se mantiene constante (Figura 5.1), es decir que  $C_{in} - C_{ex} = dC$  la ecuación 4 quedaría:

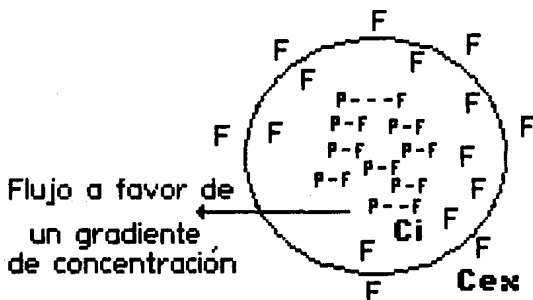


Figura 5.1. Representación esquemática del modelo eritrocítico.

$$\frac{dM}{dt} \Lambda = - \frac{DP}{\delta} (C_{in} - C_{ex}) \quad (5)$$

$$\frac{dM}{dt} = - \frac{DAP}{\delta} (C_{in} - C_{ex}) \quad (6)$$

al integrar a D, A, P y  $\delta$  en una constante tenemos

$$\frac{dM}{dt} = - K (C_{in} - C_{ex}) \quad (7)$$

donde K es la constante de permeabilidad

Si

$$C = \frac{M}{V} \quad \text{entonces} \quad CV = M \quad (8)$$

Sustituyendo 8 en 7

$$\frac{VdC}{dt} = - K (C_{in} - C_{ex}) \quad (9)$$

$$\frac{dC}{dt} = - \frac{K}{V} (C_{in} - C_{ex}) \quad (10)$$

Tomando como una sola constante  $K/V$

$$\frac{dC}{dt} = -K' (C_{in} - C_{ex}) \quad (11)$$

$$dC = - K' (C_{in} - C_{ex}) dt \quad (12)$$

$$\frac{dC}{C_{in} - C_{ex}} = - K' dt \quad (13)$$

Integrando la ecuación 13 de  $t_0-t$  y  $C_0-C$

$$\ln (C_{in} - C_{ex}) = \ln C_{in} - K' t \quad (14)$$

Los datos de concentración obtenidos se ajustaron al modelo matemático encontrado. Las correlaciones y pendientes obtenidas fueron las que se muestran en la tabla 5.2. Solo existen 2 correlaciones relativamente bajas (0.87, 0.91) las demás son superiores a 0.95. Al igual que con el modelo de Peppas éste muestra también muy buen ajuste a nuestros datos. Por lo tanto se puede decir que explica las variaciones experimentales y que la cinética de salida es de primer orden.

Tabla 5.2 Valores de pendientes obtenidas para el modelo eritrocítico. Entre parentesis se encuentra la correlación correspondiente.

MÉTODOS	DIAS				
	1	2	3	4	5
ATADOS	.2967	.1620	.1587	.1749	.1959
	(.957)	(.9110)	(.9828)	(.9345)	(.9909)
	.3403	.1378	.2911	.1883	.2333
	(.9839)	(.8716)	(.9802)	(.9781)	(.9754)
CESTAS	.1593	.1991	.2317	.2122	.0927
	(.9687)	(.9701)	(.9829)	(.9712)	(.9708)
	.1454	.2142	.2470	.1759	.1779
	(.99)	(.9736)	(1)	(.989)	(.9697)

Con los datos de las pendientes se puede determinar la constante de permeabilidad ( $K=(ADK/\delta)$ ) la cual considera las características del eritrocito y las cualidades del fármaco que

es liberado desde él. En la tabla 5.3 se muestran estos valores.

Tabla 5.3 Valores de la constante de permeabilidad. Se consideró que el volumen del medio de liberación fué de 80 ml.

MÉTODOS	DIAS				
	1	2	3	4	5
ATADOS	23.7384	12.9610	12.7007	13.9957	15.6791
	27.2263	11.0079	23.2693	15.0714	17.8679
CESTAS	12.7459	15.9279	18.5345	16.9794	7.2744
	11.6342	17.1396	19.7672	14.0751	14.2388

Los valores así obtenidos varían entre 7 y 28; esta variabilidad se debe a los factores que no pudieron controlarse como: temperatura, tipo de sangre, calidad de los reactivos entre otros.

Debido a la misma variabilidad se sospechó que no había diferencias entre las medias para días y métodos, el análisis de variancia demostró esto (tablas 4.1-4.7).

Otro aspecto importante fué establecer si existía una relación entre la cantidad atrapada y la cantidad liberada. Para esto se realizó una gráfica de cantidad atrapada contra cantidad liberada y como puede verse no existe ninguna relación entre ellas (Figuras 4.7-4.8). Una manera más sencilla de poder corroborar esto es observando las figuras 4.7-4.8 donde puede verse que en uno de los sistemas se atrapó una cantidad más pequeña sin embargo hubo una liberación considerable, inclusive mayor que en los otros sistemas en las cuales se atrapó una

mayor cantidad.

Por último cabe hacer una observación con respecto a la membrana de diálisis. Se realizaron tres pruebas (ver anexo 4) mediante las cuales pudo determinarse que ésta no influía en la liberación del fármaco desde los eritrocitos.

La liberación de los fármacos desde los eritrocitos puede verse modificada si ocurren cambios en la estructura de su membrana. Algunos investigadores encontraron que ocurren cambios morfológicos debido al proceso de entrapamiento. En este trabajo se presentan microfotografías que muestran los cambios en las diversas etapas del proceso de entrapamiento.

Como se menciona en las observaciones generales (Anexo 3) existió una ligera hemólisis durante el entrapamiento, sin embargo en los eritrocitos control fué mayor que en los tratados con fármaco. Esto se debe a que los eritrocitos control se sometieron en dos ocasiones a un medio hipotónico (0.67) mientras que los eritrocitos tratados solo en una ocasión ya que en la segunda la presión osmótica fue mayor por la presencia del fármaco.

Apoyan esta explicación las fotografías tomadas en las diferentes etapas de entrapamiento. En ellas se puede ver que hay una disminución del tamaño y del volumen celular de los eritrocitos al pasar de la solución hipotónica (tonicidad de 0.67) a la solución hipotónica con ácido nalidixico (Figuras 4.25-4.27).

Para explicar la presencia de ligera hemólisis en las

muestras tratadas hay que recordar que la población eritrocítica es heterogénea en cuanto a tamaño y edad. Se ha comprobado que los eritrocitos ven disminuidas sus características elásticas y metabólicas al aumentar su edad. Por lo cual ellos disminuyen su resistencia a los cambios bruscos de tonicidad, temperatura y potencial de membrana. Lo anterior también explicaría el porque existen poros en las membranas de algunos eritrocitos, aún después de restaurar las condiciones isotónicas (Figuras 4.26-4.28).

Los eritrocitos en forma de estrellas que aparecen en las figuras 4.23 y 4.28 no son deformidades ocasionadas por el tratamiento de entrapamiento ya que aparecen tanto en los eritrocitos control como en los tratados. Se encontró que este fenómeno se denomina crenación y es ocasionado por la presencia de anticoagulante.<sup>6p</sup>

Como se mencionó anteriormente hay una gran dispersión en nuestros datos, la cual se puede controlar fijando algunas variables que durante este trabajo no se logró hacer. A continuación se mencionan algunas, que consideramos más importantes:

#### 1) Temperatura de trabajo

Todo el trabajo se realizó a temperatura ambiente, la cual, aunque no se midió, variaba. Debido a la liberación tan lenta y a que tuvo que muestrearse durante 24 horas, entonces los eritrocitos estuvieron expuestos a esos cambios.

La temperatura normal a la que se encuentran los eritrocitos es la temperatura corporal, por lo que se recomienda efectuar posteriores investigaciones a esa temperatura. Además la permeabilidad de la membrana depende de la temperatura, así que

las constantes de permeabilidad encontradas podrían ser diferentes si se trabaja a 37° en condiciones controladas.

### 2) Control completo del equipo

La velocidad de agitación no pudo ser controlada adecuadamente, el equipo con que se contó no lo permitió. Se recomienda proveerse del equipo adecuado para poder mantener constante este factor que muy posiblemente haya causado variaciones en la liberación al modificar el gradiente de concentración.

Así mismo algunas de las canastillas de diálisis reaccionaron con el medio, y aunque aparentemente no influyeron en los resultados se debe considerar como un factor a controlar.

Algunos de los agitadores magnéticos se calentaban durante el proceso de liberación lo cual aumentaba la temperatura de nuestros sistemas. Como la temperatura afecta los resultados y el calentamiento fue gradual, las variaciones quizá también fueron graduales, sin embargo se desconoce el grado de las mismas.

### 3) Condiciones estrictamente asépticas

El trabajo no se desarrolló bajo condiciones estériles como debería haberse realizado. Esto no se pudo hacer debido a las limitaciones de equipo sin embargo se consideró que al trabajar en condiciones asépticas se podría alcanzar nuestros objetivos.

Al finalizar el trabajo consideramos que si es necesario trabajar en condiciones estériles ya que inclusive algunas fotografías en microscopio electrónico mostraron bacterias en algunos campos. Al finalizar la liberación no se tomaron microfotografías por lo que no sabemos si hubo crecimiento



bacteriano dentro de las bolsas de diálisis. Nosotros sospechamos que si hubo ya que algunos de los sistemas tenían eritrocitos oscurecidos y si hubo hemólisis, no fue apreciable.

#### 4) Tipo de sangre.

Debido a que la sangre, para poder trabajar, tenía que ser fresca, el donador no fue siempre el mismo. No se conservó la sangre porque en trabajos previos, los investigadores del Área recomiendan trabajar con sangre de al menos 4 horas de haberse extraído<sup>1-52</sup>. Aunque no es probable que el tipo de sangre influya en el entrapamiento de los fármacos se recomienda usar un solo tipo de sangre.

## **CAPITULO VI**

## CONCLUSIONES

Bajo la condiciones experimentales podemos concluir que:

1.- Es posible entrapar fármacos en los eritrocitos, por lo que estos elementos de la sangre pueden ser acarreadores de los mismos.

2.- La dexametasona no es liberada por los eritrocitos por lo cual no es un acarreador adecuado para este fármaco.

3.- El ácido nalidíxico es liberado por los eritrocitos por lo cual podríamos decir que puede ser acarreado por ellos.

4.- La liberación del ácido nalidíxico sigue un mecanismo de liberación de tipo fickiano y sigue una cinética de primer orden.

5.- El modelo eritrocítico explica satisfactoriamente la liberación del ácido nalidíxico desde los eritrocitos.

6.- El efecto del tratamiento sobre las características morfológicas de los eritrocitos no es muy apreciable.

7.- No existe diferencia significativa desde el punto de vista estadístico entre los sistemas de atados y cestas.

## ANEXO 1

### INFORMACIÓN ESTADÍSTICA

#### VALIDACIÓN

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación general incluye una evaluación de la precisión, linealidad y exactitud y proporciona una medida de comportamiento del método.

La validación de un método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

La capacidad se expresa en este caso en términos de parámetros analíticos.

#### LINEARIDAD

La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

#### RANGO

El rango de un método analítico es el intervalo entre los

niveles superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles) el cual se ha demostrado que es preciso, exacto, y lineal utilizando el método descrito.

#### EXACTITUD

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

#### PRECISION

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando un procedimiento se aplica repetidamente a diferentes, muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

La precisión es una medida del grado de reproductividad y o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

#### REPETIBILIDAD

Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un analista, usando los mismos aparatos y técnicas.

#### REPRODUCIBILIDAD

Es la precisión de un método analítico expresada como

la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas en diferentes días en el mismo y/o diferentes laboratorios y utilizando el mismo y/o diferentes equipos.

#### LÍMITE DE DETECCIÓN

Es la mínima concentración de una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

#### LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Es la menor concentración de la sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo condiciones de operación establecidas .

#### ESPECIFICIDAD

Es la habilidad de un método analítico para dar una respuesta debida unicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

#### DETERMINACIONES

Linealidad del sistema. Se determina construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón utilizando cuando menos cinco diluciones y haciendo análisis por duplicado para cada dilución.

$$b = 0 \quad , \quad r \geq 0.99 \quad \text{y} \quad r^2 \geq 0.98.$$

Precisión del sistema. Se denomina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al

100 % establecido en la linealidad del sistema.

$$CV = 1.5 \%$$

Linealidad del método. Se determina con placebos adicionados del principio activo (placebos cargados) cada uno de manera independiente, cuando a menos a tres diferentes concentraciones incluyendo el 100 % haciendo los análisis por triplicado de cada concentración. La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método (Control de calidad y estabilidad) y preferentemente deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

$$m = 1 \quad , \quad b = 0 \quad \text{y} \quad r^2 = 0.98 .$$

El coeficiente de variación dependerá del tipo de método y la muestra, hay que tomar en cuenta la forma farmacéutica y la concentración. Para métodos espectrofotométricos el coeficiente de variación es igual a 3 %.<sup>57</sup>

## ANEXO 2

### VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

1.- La solución concentrada de Dexametasona presentó su máxima absorbancia a una longitud de onda de 244 nm (figura A1).

2.- La solución concentrada de Acido nalidixico presentó su máxima absorbancia a una longitud de 280 nm (figura A2).

3.- Se realizaron curvas estándar para cada uno de los fármacos utilizados tres días diferentes por triplicado:

- a) en medio isotónico.
- b) en medio isotónico con hemólisis.
- c) en medio hipotónico.
- d) en medio hipotónico con hemólisis.

4.- A cada una de las curvas anteriores se les determinó:

- a) Parámetros de regresión lineal.
- b) Coeficientes de variación .
- c) Prueba de ordenada al origen.
- d) Prueba de líneas paralelas.

5.- Las pruebas anteriores sirvieron para comprobar la linealidad de cada una de las curvas, así como para demostrar que la hemólisis y el medio no influyen en forma significativa.

6.- En base al análisis estadístico realizado se eligieron las mejores curvas estándar (Dexametasona figura A3; Acido



nalidixico figura A40).

7.- Se determinó precisión y exactitud del método .

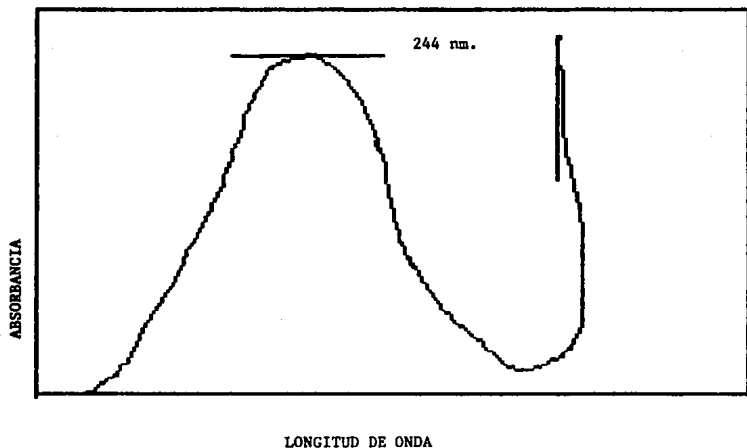


Figura A4. Barrido de Dexametasona (Espectrofotómetro Beckman modelo 20)

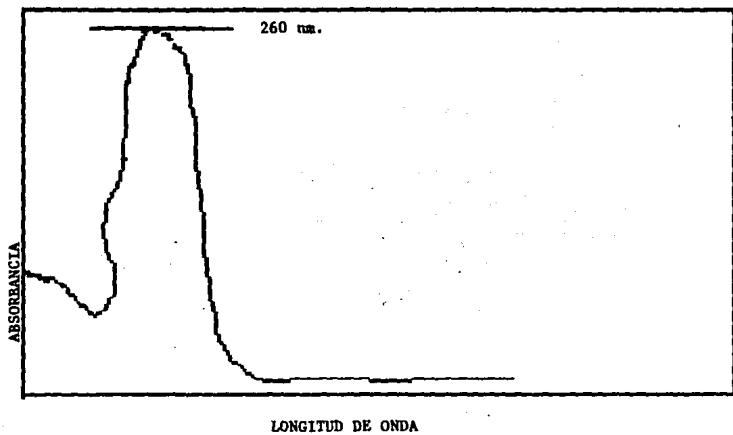


Figura A2 . Barrido de Ácido valproico . (Espectrofotómetro Beckman modelo 20).

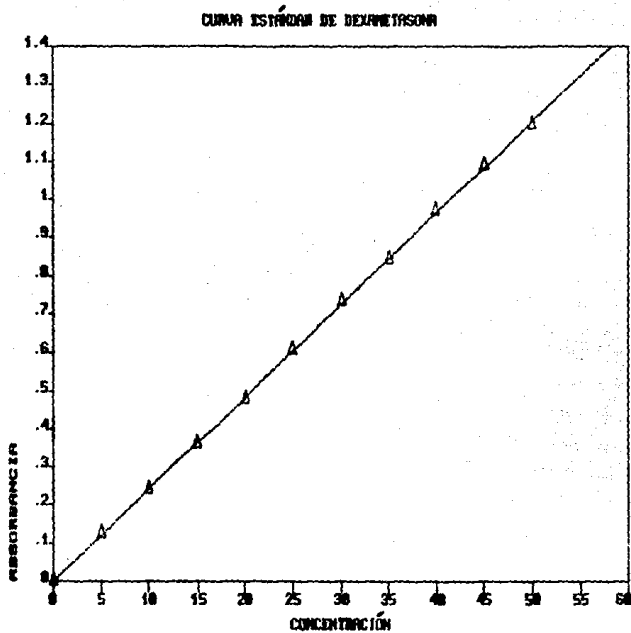


Figura A9. Curva estándar de Dexametazona en solución de Nank.

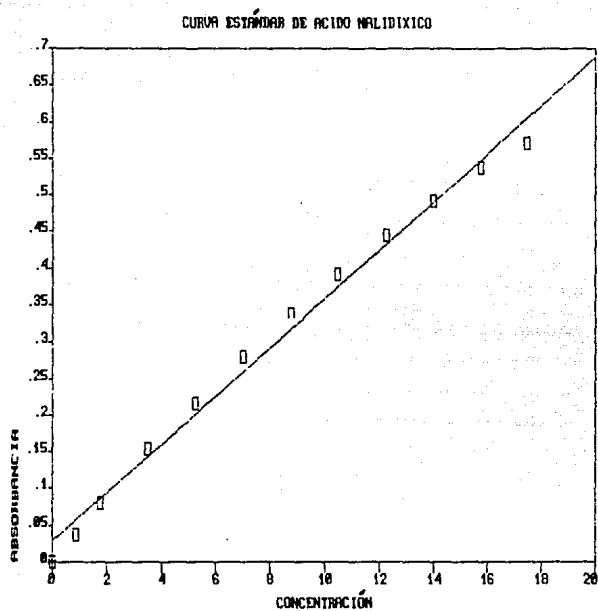


Figura A4. Curva estándar de Ácido maldixico en solución de Hank.

## ANEXO 3

### OBSERVACIONES GENERALES

1.- Durante el proceso de entrapamiento los eritrocitos control mostraron una mayor hemólisis que los eritrocitos tratados (la hemólisis presentada por las muestras no fué muy significativa).

2.- A lo largo de la liberación en los sistemas de atados en algunas ocasiones existió la formación de vortex, lo cual evitaba el contacto de los eritrocitos con el medio de liberación.

3.- Al término de la liberación se observó que los eritrocitos control y los tratados con Dexametasona tenían un color rojo más oscuro que el que presentaban al inicio del proceso.

4.- Al término de la liberación se corrieron barridos en el espectrofotómetro de las soluciones finales de liberación de Dexametasona y Acido Nalidixico además del control. Al hacer una comparación entre estos barridos se encontró que :

a) La solución de los eritrocitos control presentó un pico a una longitud de 210 nm (figura A5).

5.- Al microscopio electrónico se observaron a los eritrocitos rodeados de fibrina (figura A5).

6.- Se realizaron dos pruebas de liberación de la solución concentrada (6mg/ml) en membranas de diálisis en solución de Hank

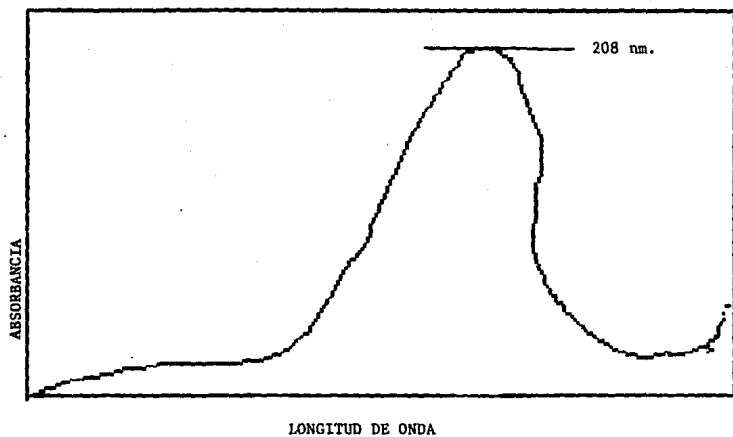


Figura A5. Barrido de la solución final de los eritrocitos control.

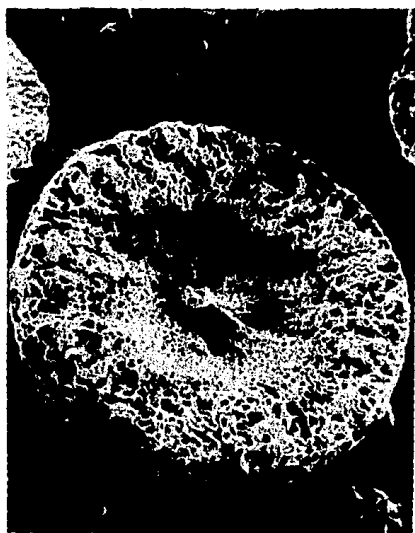


Figura A6 Fotografia de un eritrocito control a 500 aumentos

utilizando los sistemas de atados y cestas. Se obtuvieron los siguientes perfiles de liberación (Figura A7) donde puede verse que se alcanza un estado estacionario aproximadamente a las tres horas. Con lo anterior puede decir que el paso limitante en la liberación del Ácido nalidíxico desde los eritrocitos es su membrana.

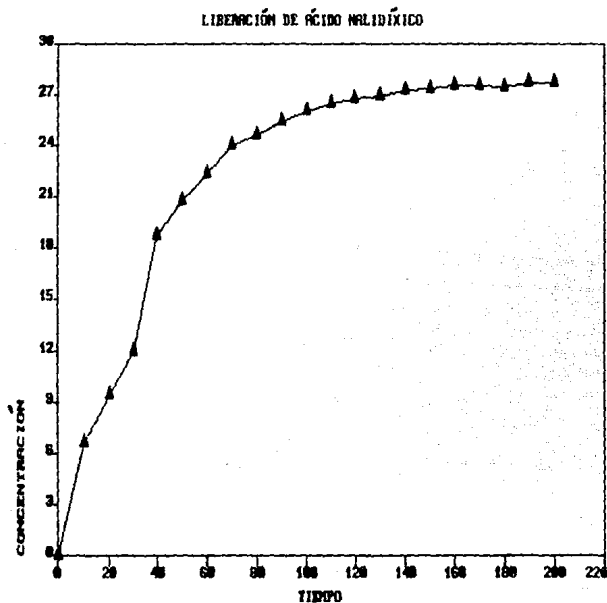


Figura A6. Curva de liberación de solución de ácido nalidíxico desde membrana de diálisis.



## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- De Loach J. R. Encapsulation of exogenous agents in erythrocytes and the circulating survival of carrier erythrocytes. *Journal of Applied Biochemistry* 5, 149-159 (1983).
- 2.- Paul K. Smith Helen L. Gleason C.G. Stoll Studies on the pharmacology of salicylates. *Pharmacology and Biochemistry*. 5, 237-255.
- 3.- Ernest Beutler M.D. G.L. Dale . Enzyme Replacement with red cells. *The New England Journal of Medicine*. 21, 942-943 (1977).
- 4.- Todd Sanford Davidsohn. Diagnóstico y tratamiento clínico por el 7a. ed. Ed. Salvat. Tomo I. (1984) pp. 912-913.13.
- 5.- Toledano Gasca Adolfo. La clave de la microcirculación : La flexibilidad del glóbulo rojo. Merck. Tomo I (1985) pp. 1-22.
- 6.- D. Danon .Y Marykousky and H. Fisher. Surface charge of old transformed and experimentaly deteriorated erythrocytes. *Annals New York Academy of Sciences*. S/V,149-165 (1982).
- 7.- White Abraham . Principios de bioquímica . 6a. ed. Ed. Mc Graw Hill México. (1982) pp.1031-1041.
- 8.- Williams J. Williams. H. Hematología Tomo I Ed Salvat. Barcelona España (1975) pp. 14,15,134,135,142,143. 43.
- 9.- Lunner, S. J. D. Szlek R. j. *Nature* 260,719-721.

- 10.- Burton lee . Mc Kenna Kathy. Kinetics studies of human erythrocyte membrane resealing . Biochemica et Biophysica Acta. 815, 128-134 (1985).
- 11.- C. Giese Arthur Fisiologia General . 3a. ed. Ed. Interamericana (1988) pp. 239.
- 12.- Claude A. Vile. Biologia. 6a. ed. Ed. Interamericana. México (1974) pp. 40-43.
- 13.- Biological Sciences Curriculum Study . Ciencias Biológicas:De las moléculas al hombre. Compañía Editorial Continental. México (1982) pp. 219-220.
- 14.- L . Lehninger Albert. Bioquímica 2a. ed. Ed. Omega. Barcelona (1982) pp.219-220.
- 15.- Chapman D. Lipid dynamics in cell membranes : Biochemistry, Cell Biology and Pathology. New York Hospital Practice. pp. 13-22 (1975).
- 16.- A.J. Chapman. The dynamics of membrane structure C.R.C. Crit Rev. Biochem. 8, 1-117 (1990).
- 17.- Vincent T. Marchesi, Structure and function of erythrocyte membrane spectrin. Annal New York Academy of Sciences. 75, 159-165 (1983).
- 18.- Roderick a. Capaldi. Membrane proteins and membrane structure. 25, 205-209 (1972).

- 19.- Eva Pitt. Encapsulation of drugs in intact erythrocytes: an intravenous delivery system. *Biochemical Pharmacology*. 32, 3359-3368 (1983).
- 20.- J. Bird. The encapsulation of insulin in erythrocytes. *J Pharm. Pharmacol.* 35, 246-247 (1983).
- 21.- H.O. Alpar. The encapsulation of the anti-sickling agent L-Lysyl-Phenylalanine in intact erythrocytes. Department of Pharmaceutical Sciences. p118.
- 22.- H.O. Alpar. Pharmaceutical possibilities of intact erythrocytes as drug carriers. p77.
- 23.- H.O. Alpar Erythrocytes as a slow release carrier system for propandol and it's prodrug. p17.
- 24.- Jenner, D.J. The effects of intravenous administration of corticosteroides encapsulated in intact erythrocytes on adjuvant arthritis in the rat. *Proceedings of the B.P.S.* 18th-18th December pp. 212.
- 25.- H.O. Alpar The effects of urogastrone encapsulated in intact erythrocytes on gastric secretion in the rat. Department of pharmaceutical Sciences. p119.
- 26.- H.O. Alpar therapeutic efficacy of asparaginase encapsulated in intact erythrocytes *Biochemical Pharmacology*. 34, 257-261 (1985).
- 27.- J.R. De Loach. Interaction of anthracycline drugs with

canine and bovine erythrocytes J. Biochem. 7,332-340 (1985).

28.- J.R. De Loach. An erythrocyte encapsulator dialyzer used in preparing large quantities of erythrocyte ghost and encapsulation of a pesticide in a erythrocyte ghost. Analytical Biochemistry 102, 220-227 (1980).

29.- John R. De Loach Preparation of resealed carrier erythrocytes and in vivo survival in dogs. Am J. Vet. Res. 42, 557-559 (1981).

30.- J.R. De Loach. Circulating carrier erythrocytes:slow-release vehicle for an antileukemic drug cytosine-arabinside. Am.J.Vet.Res. 43, 2210-2212. (1982).

31.- J.R. De Loach Effect of gastrointestinal parasite infection in calves on the preparation of carrier erythrocytes ghosts and on erythrocyte survival. Am. J. Vet. Res. 44, 755-759 (1983).

32.- J.R. De Loach Survival of carrier erythrocytes in splenectomized calves . Am. J. Vet. Res. 44, 751-753 (1983).

33.- J.R. De Loach. Glutaraldehyde treated carrier erythrocytes for organ targeting of methotrexate in dogs. Am.J.Vet.Res. 42, 1971-1974 (1981).

34.- J.R. De Loach Continuous flow fiber dialysis system for preparation of bovine carrier erythrocytes Am.J.Vet.Res. 46, 1089-1091 (1985).

35.- J.R. De Loach Effects of storage condition on bovine carrier

erythrocytes Am. J. Vet. Res. 46, 1092-1094 (1985).

36.- Tlan Yow Tsong. Relaxation phenomena in human erythrocyte suspensions Biophysical Journal. 16, 1091-1104 (1976).

37.- Kasuhiro, Kinoshita. Survival of sucrose loaded erythrocytes in the circulation. Nature. 272, 258-260 (1978).

38.- U.V. Lassen. Direct measurements of membrane potential and membrane resistance of human red cells J. Physiol. 195, 681-696 (1968).

39.- Kazuhiro, Kinoshita. Hemolysis of human erythrocyte by a transient electric field. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 1923-1927 (1977).

40.- Kazuhiro, Kinoshita, Jr. Tlan Yow Tsong. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. Nature. 263, 436-441 (1977).

41.- Takeshi Kitao and Kenichi Hattori Erythrocyte entrapment of Daunomycin by anphotericin B without hemolysis. Cancer Research 40, 1351-1353 (1980).

42.- Mauricio, Minetti. Marina Ceccarini and Anna Maria M. D. Stassi. Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis and hypertonic cryohemolysis of human red blood cells. Journal of Cellular Biochemistry. 23, 61-72 (1984).

43.- Gory V. Richieri and Howard C. Mel. Temperature Effects on osmotic fragility, and the erythrocyte membrane. Biochemical et

Biophysica Acta. 813, 41-50 (1985).

44.- Tlan Yow Tsong and Elisabeth Kingsley. Hemolysis of human erythrocyte induced by a rapid temperature jump. The Journal of Biological Chemistry. 250, 786-789 (1975).

45.- H. Bodemann and H. Passow. Factors controlling the resealing of the membrane of human erythrocyte ghosts after hypotonic hemolysis. J. Membrane Biol. 8, 1-28 (1972).

46.- Ralph Green. Judy Miller and William Crosby. Enhancement of iron chelation by desferrioxamine entrapped in red blood cell ghosts. Blood. 57, 866-872 (1981).

47.- Stuart J. Updike. Richard T. Wakamika, Edwin N. Light Foot, Jr. Asparaginase entrapped in red blood cells: Action and survival. Science. 20, 881-883 (1978).

48.- Karel Adriaenssens, Denisse Karcher, Armand Lowenthal and Heinz G. Terheggen. Use of enzyme loaded erythrocytes in In-vitro correction of arginase deficient erythrocytes in familial hyperarginemia. Clin. Chem. 22, 323-328 (1976).

49.- Michael P. Sheetz and S.J. Singer Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug erythrocyte interactions. Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 4457-4461 (1974).

50.- T. Kitao K. Hattori and M. Tkeshita. Agglutination of leukemic cells and Daunomycin entrapped erythrocytes with lectin in-vivo and in-vitro. Experientia. 34, 94-95 (1978).

- 51.- Garret M. Ihler, Robert H. Glew and Frederick Schnure. Enzyme loading of erythrocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70, 2683-2686 (1973).
- 52.- R. Langer. Polymeric delivery systems for controlled drug release. *Chem. Eng. Commun.* 5, 1-48 (1980).
- 53.- C. Anthony Hunt, M. Bosworth and Cecilia Mofta-Henneesy. University of California. Uso de liposomas como portadores de drogas in vivo. *Revista Mexicana C. Farmacéutica.* 11, 27-31 Rev. 27.
- 54.- Joseph Robinson. Controlled drug delivery fundamentals and applications. Ed. Marcel Dekker Inc. (1987) U.S.A. pp. 459-480.
- 55.- Joseph R. Robinson. Sustained and controlled release drug delivery systems. Marcel Dekker. New York (1983) pp. 138-191.
- 56.- L.S. Rao. Liposomal dosage form development-some practical considerations. *Journal of Parenteral Science and Technology.* 37, 72-74 (1983).
- 57.- Y. Mizushima T. Hamano, K. Yokoyama. Use of a lipid emulsion as a novel carrier for corticosteroids. *J. pharm-pharmacol.* 34, 49-50 (1982).
- 58.- Martin Alfred N. principios de Fisicoquímica para farmacia y biología. Ed. Alhambra. Sociedad anonima. México pp. 358.

- 59.- Joseph R. Robinson. Controlled drug delivery Vol. 29 (1987) pp. 96-127.
- 60.- Nicolas A. Peppas. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. Pharm. Act. Helv. 60, 110-111 (1985).
- 61.- U.S. Pharmacopeia National Formulary. U.S.P. XXII. January 1990 pp. 912 y 397.
- 62.- Patricia E. Grubb. Analytical profiles of drugs substances. Nalidixic Acid. Copyright 1979. Vol. 8 pp. 370-397.
- 63.- Nowal Khalafallah, Mona Darwish and Salid A. Bioavailability in man of nalidixic acid tablets. Drug development and Industrial Pharmacy. 8, 579-589 (1982).
- 64.- Rodolfo Rodriguez Carranza. Vademécum de medicamentos. Facultad de medicina UNAM. Tomo I pp. 25 y 230.
- 65.- PLM Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 33a. ed. 1987 pp. 30, 31, 88, 130, 288, 293 y 378.
- 66.- Edward M. Cohen. Analytical profiles of drug. Substances Dexametasone. (1972) pp. 1964-1967.
- 67.- Colegio Nacional de Q.F.B. México A.C. Requisitos mínimos para la validez de métodos analíticos. Comité de elaboración de guías oficiales de validación.
- 68.- Francisco Hernández. Soportes de vidrio recubiertos con poli-L-lisina para analizar materiales biológicos en partículas



tanto al microscopio electrónico de rastreo como al de transmisión. Rev. Biol. Trop. 34, 105-110 (1986).

69.- Richard G. Kessel. Tissues and organs. A text-atlas of scanning electron microscopy. Ed. N-H Freeman and Company. San Francisco (1979) pp. 35-46.

70.- R. Langer. Present and Future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. Biomaterial. 2, 201-214 (1981).

71.- T. D. Sokoloski. Entrapment of bioactive compounds with in native albumin beads. Journal of Parenteral Science and Technology. 37, 34-37 (1983).

72.-John G. Kelly. Erythrocyte cation transport and age: Effects of digoxin and furosemide. Clin. Pharmacol. Ther. 813, 159-163 (1983).

73.- Gary V. Richieri. Temperature effects on osmotic fragility and the erythrocyte membrane. Biochemica et Biophysica Acta 813, 41-50 (1985).

74.- N. Sultana Janmohamed. Proteolytic cleavage of H Nitrobenzylthioinosine-labelled nucleoside transporter in human erythrocytes. Biochem J. 230, 777-784 (1985).

75.- Reinhart Heinrich. The electric potential profile across the erythrocyte membrane. J. Theor. Biol. 96, 211-213 (1982).

76.- M. Mela and S. Eskelin. Normal and homogeneous red blood cell

populations over a wide range of hyper-iso-hypotonic media. Acta Physiol. Scand. 122, 515-525 (1984).

77.- Fumiyoshi Ishi. Interaction between erythrocytes from various animals and emulsions stabilized with various lecithins. Journal of Pharmaceutical Sciences. 78, 303-308 (1989).

78.- L.W. Wolfe. Transfusion. 25, 185-203 (1985).

79.- U. V. Lassen. Direct Measurements of membrane potential and membrane resistance of human red cells. J. Physiol. 195, 681-696 (1968).

80.- Swee Ha Siah. A rapid mixing system applied to measurements of glucose transport in human erythrocytes. Biochemical Society Transactions. 9, 431-432 (1981).

81.- A. Carwithers. Transport of  $\alpha$  and  $\beta$ -D-glucose by the intact human red cell. American Chemical Society. 24, 4244-4250 (1985).

82.- Avram Goldstein. Lewis Aranow. Farmacologia. Editorial Limusa 1a. ed. México 1979 pp. 252-253.

83.- Robert E. Notari. Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics. Marcel Dekker inc. 3a. ed. Now York 1980 pp. 5-42.