



Impacto de la Remoción del Estrato Córneo sobre la Penetración de Diclofenac a Través de Piel Equina

Marcos FERRANTE ^{1*}, Nicolás F. VILLARINO ¹, Alfredo ANDREETA ² & María F. LANDONI ¹

¹ Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118, CC 296, 1900 La Plata. Argentina

² Cátedra de Farmacotecnia I. Facultad de Ciencias Exactas.
Universidad Nacional de La Plata. Calle 1 y 47 1900 La Plata. Argentina

RESUMEN. El estrato córneo ha sido considerado el principal responsable de la gran variabilidad y escasa penetración transepitelial de drogas tras la administración epicutánea. El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* e *in vivo* el impacto de la remoción del estrato córneo sobre el grado y velocidad de penetración de diclofenac a través de piel equina. Se realizaron ensayos *in vitro* de penetración en celdas de tipo Franz y evaluación *in vivo* del efecto antiedematoso en un modelo de edema inducido por carragenina. El estrato córneo fue removido por un método físico. El flujo de penetración de diclofenac en piel exfoliada fue significativamente superior (12,35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ vs. 0,69 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$) al estimado en ausencia de exfoliación, lo que se reflejó en un menor volumen de lesión edematosa en los sitios tratados previa exfoliación (422 μl vs. 1958 μl). En conclusión, el estrato córneo representan una importante barrera para la penetración de diclofenac a través de piel equina, limitando la efectividad de la formulación evaluada.

SUMMARY. "Impact of the Stratum Corneum Removal on Diclofenac Penetration Through Equine's Skin". The stratum corneum has been regarded as the main responsible for the great variability and scarce transdermal drugs penetration after epicutaneous administration. The objective of the present study was to test the impact of the stratum corneum removal on the rate and degree of diclofenac diethylamine penetration after its epicutaneous administration to horses. Penetration studies were performed *in vitro* with Franz diffusion cells and *in vivo* by evaluating the anti-oedematous effect, on a carrageenan-induced oedema model. The removal of stratum corneum was made by physical methods. The penetration flux of diclofenac on exfoliated skin, was higher ($p < 0.05$) (12.35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$) than on control skin (0.69 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$). The administration of diclofenac on skin without exfoliation did not reduce significantly ($p > 0.05$) the lesion volume. However, the lesion volume on the exfoliated sites was reduced significantly ($p < 0.05$) (422 μl vs 1958 μl). In conclusion, the stratum corneum represents a great barrier for diclofenac penetration through horse skin, thus limiting the effectiveness of the evaluated formulation.

INTRODUCCIÓN

La piel es considerada una barrera eficiente, altamente lipofílica que previene la pérdida excesiva de agua y protege al organismo de las influencias adversas del medioambiente. Desde el punto de vista terapéutico, la piel se comporta como una excelente barrera para la penetración transepitelial de fármacos.

Existe una gran cantidad de factores -dependientes de la droga, de su formulación y de las características estructurales de la piel- que limitan la penetración de fármacos a través de la misma ^{1,2}. Así, solo drogas con adecuadas pro-

piedades fisicoquímicas (bajo peso molecular, adecuada solubilidad en solventes acuosos y no acuosos, etc.) pueden ser consideradas como candidatas para el desarrollo de formulaciones de administración epicutánea en animales domésticos, incluyendo la especie equina ³.

La penetración de fármacos es un proceso especie-específico, extremadamente complejo que involucra una gran cantidad de variables ². El grado y la velocidad de pasaje de un fármaco a través de la piel están determinados por las propiedades fisicoquímicas del mismo, así como de su interacción con la formulación que lo

PALABRAS CLAVE: Administración transdermal, Diclofenac, Equino, Estrato córneo, Exfoliación.
KEY WORDS: Diclofenac, Exfoliation, Horse, Stratum corneum, Transdermal administration.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. Email: marcosferrante@gmail.com

contiene y el estrato córneo que lo recibe. Así, el estrato córneo ha sido considerado el principal responsable de la gran variabilidad y escasa penetración transepitelial de drogas tras la administración epicutánea ⁴⁻⁸. Por este motivo, la mayoría de los métodos físicos y químicos desarrollados para mejorar la penetración transepitelial basan su mecanismo de acción en la eliminación total o parcial y/o modificación estructural del estrato córneo.

El efecto barrera del estrato córneo sobre la penetración transdermal de fármacos ha sido reportado en humanos ⁹. Sin embargo, en equinos esta capacidad del estrato córneo no ha sido cuantitativamente evaluada. El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* e *in vivo* el impacto de la remoción del estrato córneo sobre el grado y velocidad de penetración de diclofenac a través de piel equina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudios in vitro

Muestras de piel

Una muestra de piel (30cm x 15cm) de la región cervical fue extraída inmediatamente luego del sacrificio de un equino sano. La pieza fue acondicionada (limpieza, eliminación del tejido celular subcutáneo y rasurado con máquina eléctrica) y almacenada en freezer a -20 °C por un lapso no mayor a las 72 h hasta su utilización.

A partir de la pieza original (acondicionada) se obtuvieron ocho retazos de 7 x 6 cm los cuales se descongelaron a temperatura ambiente (25 °C). Los 8 retazos fueron divididos en dos grupos; el grupo A (sin exfoliación) fue utilizado sin pre-tratamiento y el grupo B (con exfoliación) fue sometido a la remoción de los estratos más superficiales de la epidermis. La exfoliación fue realizada frotando suavemente, con movimientos circulares, la superficie total de cada uno de los retazos durante 1 min con lija al agua N° AX-51.

Dos submuestras (1cm x 1cm) de piel fueron tomadas de cada grupo y enviadas al Servicio de Histopatología de la Cátedra de Patología Especial, de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, a efectos de someterlas a examen histopatológico.

Preparación de las celdas de difusión

Las muestras de piel fueron montadas en celdas de difusión tipo Franz, con la superficie de aplicación (12.5cm²) hacia el lado de la cámara donante ². La cámara aceptora fue cargada con 24 ml de PBS (pH 7.4) y mantenida a 35 °C.

Aplicación de los tratamientos

Todas las muestras de piel (con exfoliación y sin exfoliación) fueron tratadas aplicando 0,56 g de Átomo Desinflamante® equivalente a 0,52 mg/cm² de diclofenac dietilamina (DFD) mediante suave frotación (1 min).

Toma de muestras

Alícuotas de 1 ml fueron extraídas (con reemplazo) de la cámara aceptora a las 2, 5 y 8 h post-aplicación.

Determinación de diclofenac

Las concentraciones de DFD fueron dosadas por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) ¹⁰. Una alícuota (1 ml) de cada muestra fue acidificada con 1 ml de buffer de McIlvane's (pH 3), y adicionada con 5 ml de éter etílico. La mezcla fue mezclada en vortex durante 1 min y centrifugada 10 min a 6000 rpm. Una alícuota de 4 ml de la fase orgánica fue removida, y evaporada a 45 °C bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, el extracto evaporado fue resuspendido en 200 µl de metanol conteniendo 1 µg de ácido tolfenámico (2-[(3-cloro-2metilfenil) amino] ácido benzoico) (Sigma, St Louis, USA) como estándar interno. El límite de detección del método fue de 0,01 µg/ml y el de cuantificación de 0,025 µg/ml. La variabilidad inter e intraensayo fue menor a 12%.

Análisis de datos

La cinética de penetración de diclofenac fue analizada aplicando un modelo que asume que la concentración de soluto en el vehículo (cv) aplicado a la piel es constante y que la condición sink del receptor permanece constante durante el estudio ¹¹⁻¹⁷.

La penetración de diclofenac fue evaluada aplicando un modelo lineal, aplicando las ecuaciones [1-4].

$$dQ/dt (\mu\text{g}/\text{h}) \quad [1]$$

donde dQ es la cantidad de fármaco que atraviesa la piel en función del tiempo (dt).

$$J_s (\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}) = (dQ/dt) / A \quad [2]$$

donde J_s es el flujo de fármaco en función del tiempo (dt) y el área de aplicación (A). Este parámetro cinético fue determinado por la pendiente de la recta expresando la cantidad de droga por unidad de tiempo (µg/cm²h).

$$K_p = J_s / \text{dosis aplicada} \quad [3]$$

donde K_p es el coeficiente de penetración.

$$\text{Tiempo lag} = 0 + b / a \quad [4]$$

donde tiempo lag (h) fue determinado como el valor correspondiente a la intersección de la recta de regresión (estimada para el cálculo del flujo) con el eje de las abscisas.

Cálculo del porcentaje de penetración

El porcentaje de penetración de diclofenac a las 8 h post-administración fue calculado en función de la dosis total aplicada.

Análisis estadístico

Los parámetros cinéticos de penetración de diclofenac (J_s , K_p , y el T-lag) fueron comparados estadísticamente mediante el test de Mann Whitney, utilizando como test *a posteriori* el de Dunns. El límite de significación fue establecido en 5%.

Estudios in vivo

Modelo experimental

Se utilizaron 3 equinos con un peso promedio de 400 ± 15 kg. Previo al inicio del estudio, ambos lados de la zona del cuello fueron rasurados con máquina eléctrica y posteriormente con máquina de afeitar.

En la superficie derecha del cuello de cada animal experimental se marcaron con lápiz para piel (de craneal a caudal) 4 sitios equidistantes de 12.5 cm^2 (sitios 1, 2, 3 y 4).

La superficie izquierda del cuello de cada animal experimental, fue exfoliada con papel de lija al agua N° AX-51, frotando suavemente con movimientos circulares durante 1 min. Posteriormente cuatro sitios de 12.5 cm^2 fueron claramente señalados e identificados como sitios 5, 6, 7 y 8.

A tiempo 0, en el centro de cada uno de los sitios demarcados, se aplicó una inyección intradérmica (0.1 ml) de carragenina al 0.25 %¹⁸.

Una vez finalizadas las inyecciones se procedió a administrar 0.56 g de Átomo Desinflamante® sobre los sitios 2 a 7. Los sitios 1 y 8 no fueron tratados y representaron los sitios control.

El volumen del edema inducido fue mensurado a 1, 3, 5, 6 y 7 h post administración. Debido a que las lesiones edematosas inducidas por la aplicación intradérmica de carragenina son de forma elipsoidal, su volumen (expresado en μl) fue estimado a través de la ecuación que describe el volumen de una figura semielíptica (Ec. [5]):

$$V = 2/3 \pi r_1 r_2 r_3 \quad [5]$$

donde π es la constante 3.1416, r_1 , r_2 y r_3 son los radios, los cuales fueron calculados en función de los diámetros (D). r_1 y r_2 representan los radios vertical y horizontal de la vesícula y r_3 el grosor de la piel. Todos los diámetros fueron medidos con un calibre de precisión¹⁸.

El porcentaje de inhibición de la formación de edema fue calculado en función de los datos del sitio control mediante la ecuación [6]:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 * (V_c - V_t) / V_c \quad [6]$$

donde V_t corresponde al volumen de lesión del sitio tratado y V_c al volumen de lesión del sitio control.

Análisis estadístico

La comparación estadística del efecto anti-edematoso de Átomo Desinflamante® aplicado sobre piel con y sin exfoliación fue realizada aplicando análisis de varianza de un factor, tomando como parámetros de comparación, las áreas bajo la curva (AUC_{0-7h}) del volumen de lesión en función del tiempo. El nivel de significación fue establecido en 5%.

Las áreas bajo la curva volumen de lesión en función del tiempo fueron calculadas aplicando la ecuación [7]:

$$AUC = 0,5 \sum_{i=0}^{n-1} (t^{i+1} - t^i) (y^i + y^{i+1}) \quad [7]$$

donde "t" es el tiempo de obtención de la muestra e "y" es la medición observada¹⁹.

RESULTADOS

Estudios in vitro

Los resultados del análisis histopatológico de las muestras de piel indicaron que el proceso de exfoliación modificó las características estructurales de la piel. El tratamiento aplicado eliminó, en forma no homogénea, los estratos más superficiales de la piel incluyendo estrato corneo, estrato lúcido, granuloso y en algunas regiones parte del estrato espinoso (Fig. 1, A y B).

Concentraciones de diclofenac, superiores al límite de detección, fueron observadas en la cámara aceptora de todas las celdas difusión tras la aplicación epicutánea de Átomo Desinflamante®.

La eliminación de los estratos superficiales de la epidermis permitió aumentar significativamente la concentración de diclofenac en la cámara aceptora, reflejando un aumento estadísticamente significativo de la penetración del principio activo ($p < 0,05$).

Grupo	Flujo en estado estacionario (µg/cm ² h)	Tiempo Lag (h)	Coefficiente de penetración (cm/s x 10 ⁻³)	Cantidad Total Acumulada (µg)	Porcentaje de penetración
No Exfoliado	0,69 ± 0,12	3,9 ± 0,6	1,37 ± 0,27	30,42 ± 14,88	0,47
Exfoliado	12,35 ± 3,79	1,90 ± 0,02	23,75 ± 7,28	976,62 ± 298,31	15,02

Tabla 1. Parámetros cinéticos de penetración (Media ± DS) de diclofenac dietilamina (Dosis 0,52 mg/cm²) aplicado sobre piel equina no sometida y sometida a pre-tratamiento exfoliativo.

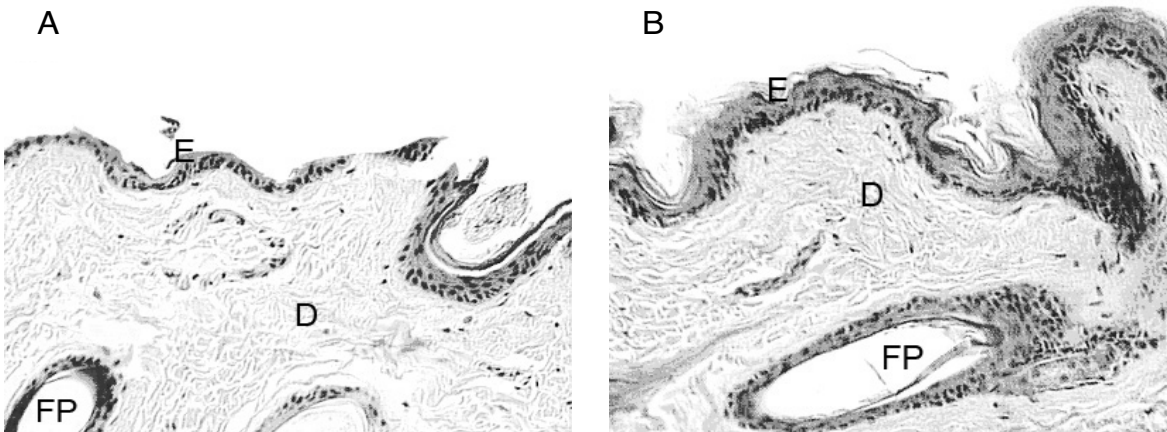


Figura 1. A: corte histológico de piel de la región del cervix equino sometida a tratamiento exfoliativo y teñida con hematoxilina y eosina (x20). B: Idem, sin tratamiento exfoliativo. Es posible observar la dermis (D) epidermis (E) y folículos pilosos (FP).

Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) fueron obtenidas cuando se compararon los parámetros cinéticos de penetración (J_s , K_p , T-lag) de diclofenac tras la aplicación Átomo Desinflamante® sobre piel exfoliada y no exfoliada. Se obtuvieron valores promedios de J_s de $0,69 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ para el grupo sin pre-tratamiento exfoliativo y de $12,35 \pm 3,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ para el grupo con pre-tratamiento. Los valores de T-lag obtenidos fueron de $3,9 \pm 0,6 \text{ h}$ para el grupo sin exfoliación y de $1,9 \pm 0,02 \text{ h}$ para el grupo con exfoliación (Tabla 1). Estos resultados indican claramente que los estratos más superficiales de la epidermis representan un importante paso limitante para la penetración transepitelial de diclofenac.

Estudios in vivo

La inyección intradérmica de carragenina indujo en todos los sitios de inyección, una reacción inflamatoria reproducible, de corta duración, severidad leve y evolución benigna. No observándose efectos adversos asociados a la exfoliación ni a la administración de Átomo Desinflamante®.

La reacción edematosa en los sitios controles fue observada a partir de la primera muestra (1h) con un volumen de 300 µl. El volumen de le-

sión se incrementó marcadamente hasta la h 5 (1732 µl), finalizando el estudio con un valor de 1958 µl a las 7 h (Fig. 2). El área bajo la curva del volumen de lesión en función del tiempo desde el tiempo 0 hasta las 7 h post-administración (AUC_{0-7h}) fue 6776.0 µl/h (Fig. 2).

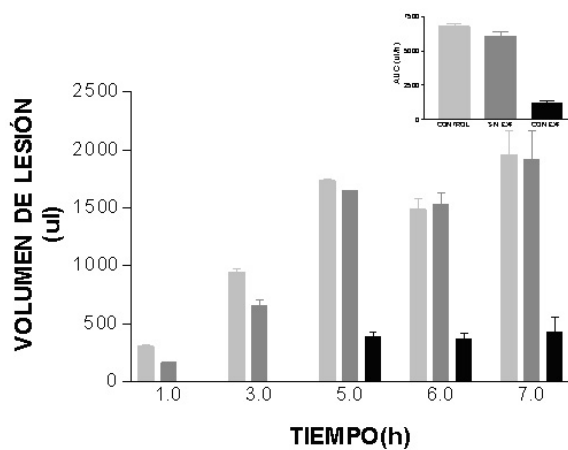


Figura 2. Volumen de lesión (Media ± DS) en función del tiempo en los sitios control (■) y tratados con diclofenac (0,52 mg/cm²) en piel sin exfoliación (■) y con exfoliación (■). Figura interna. Áreas bajo la curva (AUC_{0-7}) volumen de lesión vs tiempo en los tres grupos experimentales.

El perfil temporal del volumen de lesión de los sitios tratados sin exfoliación epidérmica, fue similar al observado en el sitio control. La aplicación de Átomo Desinflamante® en los sitios sin exfoliación inhibió débilmente la formación de edema, siendo los volúmenes de lesión ligeramente inferiores a los observados en el sitio control (1958 μl y 1917 μl a las 7 h, respectivamente). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las $\text{AUC}_{0-7\text{h}}$ de los sitios control y tratado sin exfoliación (6776 y 6085,8 $\mu\text{l/h}$, respectivamente).

Contrariamente, la administración epicutánea de Átomo Desinflamante® sobre piel exfoliada, indujo una inhibición marcada de la formación de edema. El valor de inhibición fue del 100% durante las tres primeras h post-carragenina. El volumen de lesión edematosa fue significativamente menor al calculado para el otro tratamiento durante todo el tiempo de muestreo. Esto se ve reflejado en los volúmenes de lesión observados a las 7h, 422 μl para el tratamiento sobre piel exfoliada y 1958 μl sin exfoliación (Fig. 1).

El mayor efecto antiedematoso de la formulación ($p < 0,05$), como consecuencia de la remoción de los estratos superficiales de la piel, esta reflejado en el $\text{AUC}_{0-7\text{h}}$ (1153.4 $\mu\text{l/h}$) calculada la cual es 5 veces menor a la correspondiente a los otros tratamientos (Fig. 1).

DISCUSIÓN

El método para el estudio de penetración *in vitro* de fármacos a través de la piel utilizando las celdas de Franz fue validado en 1978²⁰. Actualmente, es un método ampliamente utilizado en diversas especies²¹⁻²⁴ e incluso en equinos^{25,26}.

La utilización de celdas de difusión tipo Franz permitió evaluar cuantitativamente la penetración y calcular los parámetros cinéticos de penetración de diclofenac tras aplicación epicutánea de Átomo Desinflamante® sobre piel equina. La eliminación de las capas más superficiales de la piel, confirmado histológicamente, incrementó drásticamente la concentración de fármaco en el fluido de la cámara aceptora y modificó significativamente los parámetros cinéticos de penetración evaluados.

La extrapolación directa de datos experimentales obtenidos en estudios *in vitro* a situaciones *in vivo* es inapropiado^{27,28}. En el presente estudio se aplicaron métodos *in vitro* e *in vivo*, por lo tanto fue posible describir los efectos de la remoción del estrato córneo sobre la velocidad

y el grado de penetración, así como, evaluar los cambios farmacodinámicos reflejo de los cambios en la penetración del principio activo.

Existen reportes sobre el uso de carragenina como irritante para el estudio de la respuesta inflamatoria²⁹, así como, para el estudio del efecto antiedematoso de formulaciones de aplicación epicutánea en ratas^{30,31}, en bovinos³² y en equinos^{33,34}.

Los resultados obtenidos *in vitro* se vieron reflejados claramente en el estudio antiedematoso. Cuando Átomo Desinflamante® fue aplicado sobre la piel sometida al tratamiento exfoliativo, la formulación comercial inhibió significativamente la formación de edema durante todo el ensayo, con un 100% de inhibición durante las tres primeras h post-carragenina. Esto permite inferir que la exfoliación también determinó un aumento de la penetración de diclofenac *in vivo*; demostrando la existencia de una buena correlación entre los parámetros de penetración obtenidos a través de las celdas de tipo Franz y el efecto antiedematoso observado utilizando el modelo de inyección intradérmica de carragenina en equinos. Este hecho concuerda con estudios realizados en ratas que indican una buena correlación entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* al evaluar una formulación de ketoprofeno³⁵ y de diclofenac²².

Los resultados *in vitro* e *in vivo* obtenidos indican claramente que el estrato córneo representa un paso limitante muy importante para la penetración de diclofenac tras la aplicación epicutánea en la especie equina.

Es importante tener en cuenta, que desde el punto de vista clínico no solo sería relevante un aumento en la penetración del fármaco, sino también una disminución del tiempo Lag. La marcada disminución del tiempo Lag permitiría obtener una respuesta clínica más rápida, lo cual sería muy importante en la terapéutica de procesos inflamatorios agudos. Sin embargo, el uso del método de exfoliación utilizado en el presente estudio parecería no ser el apropiado para utilizar en la práctica clínica.

Existen otros métodos (físicos o químicos) que aumentan la penetración de los fármacos aplicados. Entre los métodos físicos se encuentran el uso de iontoforesis y electroporación³⁶. Sin embargo desde el punto de vista de la práctica clínica los métodos químicos serían más aplicables. Dentro de los métodos químicos se incluye la incorporación en las formulaciones de sustancias mejoradoras de la penetración, entre ellas, ácidos grasos¹⁴, terpenos^{12,24,37}, urea^{38,39}

y propilenglicol^{14,40}. Estudios preliminares *in vitro*, realizados en nuestro laboratorio demuestran que la incorporación de algunas de estas sustancias (aunque no todas ellas) en una formulación de diclofenac provoca incrementos significativos en la penetración del fármaco a través de piel equina. Estos incrementos en penetración de diclofenac representarían la solución a la ineficacia de la administración epicutánea de diclofenac en equinos reportada por Villarino⁷.

CONCLUSIONES

Es posible asegurar que las capas mas superficiales de la epidermis representan una importante barrera para la penetración de diclofenac a través de piel equina, limitando la efectividad de la formulación evaluada.

El presente estudio representa el primer trabajo que evalúa el impacto del estrato córneo sobre la penetración de diclofenac a través de piel equina.

La incorporación, en una formulación de aplicación epicutánea, de sustancias capaces de modificar o eliminar las capas más superficiales de la epidermis, podría aumentar considerablemente la penetración de diclofenac a través de piel equina, incrementando de manera paralela le eficacia clínica de la misma.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mills, P. B. Magnusson & S. Cross (2005) *Am. J. Vet. Res.* **66**: 43-7.
- Villarino N, & MF. Landoni (2006) *Vet. J.* **172**: 200-1.
- Riviere, J. & M. Papich (2001) *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **50**: 175-203.
- Benfeldt, E. & J. Serup (1999) *Arch. Dermatol. Res.* **291**: 517-26.
- Moser, K. Kriwet, K. Naik, A. Kalia, Y. & R. Guy (2001) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52**: 103-10.
- Dehghanyar, P. Mayer, B.X. Namiranian, K. Mascher, H. Muller, M. M. Brunner (2004) *J. Clin. Pharm. Ther.* **42**: 353-9.
- Villarino, N. Vispo, T. Ferrante, M. & F. Landoni (2006) *Am. J. Anim. Vet. Sci.* **1**: 8-12.
- Wester, R. & H. Maibach (1983) *Drug. Metab. Rev.* **14**: 169-205.
- Johnson, M. Blankschtein, D. & R. Langer (1997) *J. Pharm. Sci.* **86**: 1162-72.
- Krishna D, & J. Surja Kumar (1991) *Ind. J. Pharm. Sci.* **5**: 212-4.
- Roberts, MS. Anissimov, Y. & R. Gonsalvez (1999) Third ed. New York: Marcel Dekker.
- Nokhodchi, A. Sharabiani, K. Rashidi, MR. & T. Ghafourian(2006) *Int. J. Pharm.* **335**: 97-105.
- Kamal, M.A.H.M. Limura, N. Nabekura, T. & S. Kitagawa (2007) *Cheb. Pharm. Bull.* **55**: 368-71.
- Larrucea, A. Arellano, A. Santoyo S. & P. Ygartua (2001) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52**: 113-9.
- Takahashi, K. Suzuki, T. Sakano, H. & N. Mizuno (1995) *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 571-5.
- Takahashi, K. Sakano, H. Numata, N. Kuroda, S. & N. Mizuno (2002) *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **28**: 1285-94.
- McDougal, J. Pollard, D. Weisman, W. Garrett, C. & T. Miller (2000) *Toxicol. Sci.* **55**:247-55.
- Landoni, M. & P. Lees (1995) *Equine. Vet. J.* **27**: 247-56
- Matteuws, J. Altman, D. Campbell, M. & P. Royston (1990) *B.M.J.* **300**: 230-5.
- Franz, T. (1978) *Curr. Probl. Dermatol.* **7**: 58-68.
- Narishetty, S. & R. Panchagnula (2004) *J. Control. Release.* **95**: 367-79.
- Özgüney, ISg. Karasulu, HYi. Kantarc, G. Sözer, S. Güneri, T. & G. Ertan (2006) *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **7**: Art 88.
- Nokhodchi, A. Shokri, J. Dashbolaghi, A. Hassan-Zadeh, D. Ghafourian, T. & M. Barzegar-Jalali, (2003) *Int. J. Pharm.* **250**: 356-69.
- Fang, J. Tsai, T. Lin, Y. Wong, W. Wang, M. & J. Huang (2007) *Biol. Pharm. Bull.* **30**: 343-49.
- Villarino N. (2006) Tesis Doctoral. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.
- Mills P. (2007) *Vet. Res. Commun.* **31**: 227-33.
- Ponec, M. (2002) *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **54**: 19-30.
- Akomeah, F. Nazirb, T. Martin, G. & M. Brown (2004) *Eur. J. Pharm. Sci.* **21**: 337-45.
- Calixto, J. Medeiros, R. Fernandes, E. Ferreira, J. Cabrini, D. & M. Campos (2004) *Br. J. Pharmacol.* **143**: 803-18.
- Shin, S. Cho, C. & I. Oh (2000) *Int. J. Pharm.* **193**: 213-8.
- Larson, D. & J. Lombardino (1980) *Inflamm. Res.* **10**: 246-51.
- King, J.N. (1993) *Can. J. Vet. Res.* **57**: 215-22.
- Marr, K. Marsh, K. Hernandez, L. Cunningham, F. & P. Lees (1998) *Res. Vet. Sci.* **64**: 111-7.
- Auer, D. & A. Seawright (1990) *J. Vet Pharmacol Ther.* **13**: 67-75.
- Moretti, M., E. Gavini & A.T. Peana (2000) *Boll. Chim. Farm.* **139**: 67-72.
- Benson, H. (2005) *Curr. Drug. Deliv.* **2**: 23-33.
- Hendradi, E. Obata, Y. Isowa, K. Nagai, T. & K. Takayama (2003) *Biol. Pharm. Bull.* **26**: 1739-43.
- Godwin, D. Player, M. Sowell, J. & B. Michniak (1998) *Int. J. Pharm.* **167**: 165-75.
- Gloor; M. Fluhr, J. Wasik, B. & W. Gehring (2001) *Pharmazie* **56**: 810-4.
- Arellano, A. Santoyo, S. Martín, C. & P. Ygartua (1999) *Eur. J. Pharm. Sci.* **7**: 129-35.