

LIBERACIÓN CONTROLADA DE TIOSULFATO SÓDICO EN PARCHES TRANSDÉRMICOS: UNA SOLUCIÓN A LA INTOXICACIÓN POR CIANURO DERIVADA DEL CONSUMO FORRAJERO EN EL GANADO

*Maite Arteche Pujana, Leire Pérez Alvarez, Issa Katime**

Grupo de Nuevos Materiales y Espectroscopia Supramolecular, Facultad de Ciencia y Tecnología,
Lejona, España. Correo electrónico: issa.katime@ehu.es

Recibido: Junio de 2009; Aceptado: Enero de 2009

RESUMEN

Uno de los principales problemas derivados del libre pastoreo y de la elaboración de piensos autóctonos en Latinoamérica es la posible intoxicación con HCN con mortales consecuencias derivada del consumo de multitud de plantas. Actualmente se encuentra muy extendida la aplicación intravenosa de tiosulfato sódico en los pocos casos de intoxicación cianhídrica que consiguen detectarse a tiempo, y está comprobada la eficacia de su acción bloqueante. En este trabajo se propone el empleo de matrices poliméricas entrecruzadas de polímero como soporte de liberación lenta y controlada de tiosulfato sódico para ser aplicadas en el ganado latinoamericano como medida preventiva a la intoxicación por HCN. Se llevó a cabo la síntesis de hidrogeles acrílicos cargados de tiosulfato sódico y se realizaron ensayos de difusión transdermal “*in vitro*” para el estudio de las cinéticas de liberación del principio activo y del efecto del entrecruzamiento y composición de las redes sintetizadas. Se comprobó el potencial de estas matrices poliméricas para la citada aplicación ya que se consiguen niveles de tiosulfato cercanos a las concentraciones óptimas en sangre de forma sostenida en el tiempo.

Palabras claves: Hidrogel, parche transdérmico, HCN, tiosulfato sódico.

ABSTRACT

The accidental HCN intoxication resulting from the consumption of many plants is one of the main problems derived from free grazing and the native elaboration of feed in Latin America. The application of intravenous sodium thiosulfate is an effective and widespread treatment in the hydrocyanic intoxication. This paper proposes the use of crosslinked polymer matrix as a carrier for slow and controlled release of sodium thiosulfate to be applied in Latin American cattle as a preventive treatment in HCN poisoning. Acrylic hydrogels were synthesized and loaded with sodium thiosulfate. In vitro transdermal diffusion was tested in order to study the kinetics release of the drug. The effect of crosslinking and composition of synthesized networks was studied. The thiosulfate levels achieved in the diffusion measurements resulted near the optimal concentrations in the blood steadily over time. This fact demonstrated the potential of the polymer matrices for the application.

Key words: Hydrogel, Transdermal System, HCN, Sodium thiosulfate.

1. INTRODUCCIÓN

Existe en el reino vegetal un elevado número de sustancias potencialmente venenosas para los animales que pueden causar intoxicación. En la actualidad se han identificado los principios activos causantes de esta toxicidad en numerosas plantas y se han agrupado en las diferentes categorías que se muestran en la Tabla 1 [1].

Hay que destacar que las plantas venenosas causan importantes pérdidas económicas a las empresas pecuarias. La muerte de animales representa la pérdida más impactante y relativamente fácil de estimar económicamente, sin embargo las intoxicaciones no mortales que a menudo no son consideradas dentro del ámbito toxicológico acarrean serias pérdidas como reducción en la

producción de leche, disminución en la tasa de crecimiento, abortos esporádicos, baja fertilidad en la masa o nacimiento de crías débiles [2]. Por otra parte cabe recordar que muchas plantas venenosas son malezas, cuya erradicación o control lleva implícito un incremento en los costos de explotación de las empresas ganaderas.

Tabla 1. Resumen de las diferentes sustancias tóxicas presentes en plantas.

Alcaloides Protoalcaloides Glucósidos Glucosinatos	Saponinas Fitotoxinas Fitoestrógenos Taninos	Alcoholes Antivitaminas Resinas Sustancias fotodinámicas Sustancias misceláneas
---	---	---

La problemática de la producción agropecuaria en Latinoamérica presenta en la actualidad características muy particulares que guardan relación con la situación económica actual. En general se tiende a disminuir sustancialmente el uso de los; alimentos concentrados en los últimos años, debido al incremento sostenido en el costo de los mismos, lo cual constituye un factor limitante en el desarrollo de la ganadería. Tal situación exige brindarle mayor atención a los recursos forrajeros, dada la importancia que tienen en los sistemas de producción animal. De hecho, el aprovechamiento eficiente de los recursos forrajeros disponibles, junto a las estrategias trazadas para su manejo, conforman la base de una explotación ganadera rentable, en la cual los forrajes representan, no el único, pero sí el más importante de los ingredientes de la dieta que reciben los animales [3].



Figura 1. Novillos consumiendo maleza y raíces de yuca.

El cianuro, concretamente, es un tóxico potente y de rápido efecto que se encuentra en el reino vegetal formando parte de numerosos glucósidos capaces de liberar ácido cianhídrico (HCN) al reaccionar con las enzimas hidrolíticas apropiadas [4-5]. Se ha descrito capacidad cianogénica en aproximadamente dos mil especies vegetales [6-8].

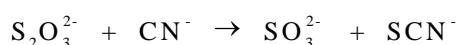
El ácido cianhídrico bloquea la respiración celular al combinarse el ion cianuro (CN^-) con una enzima indispensable para tal proceso. En los tejidos de las plantas cianofóricas el glucósido y la enzima se hallan físicamente separados, encontrándose el primero en la epidermis foliar y la segunda en el mesófilo, lo que restringe su contacto y hace que normalmente no exista HCN preformado en estos vegetales. Sin embargo el contacto glucósido-enzima siempre ocurre cuando los tejidos del vegetal son triturados por la masticación e, igualmente, al ser atacados por la microbiota ruminal. Por tanto el glucósido intacto no es tóxico, pero se vuelve tal después de que el compuesto se ha hidrolizado y se libera el HCN. Según la susceptibilidad de los rumiantes se explica pues los microorganismos del rumen hidrolizan rápidamente este glucósido [9].

La yuca o mandioca (*Manihot esculenta* Cranz) por ejemplo, es una planta tropical que cuando se les suministra a animales sus variedades amargas sin ser procesadas o altos niveles de yuca fresca de variedades dulces puede producir intoxicación cianhídrica. Esta planta originaria de la *Amazonia Americana* es cultivada extensamente por los aborígenes y fue difundida como alimento por los conquistadores. Es una tuberosa de la familia de las amiláceas cuya raíz aporta gran cantidad de almidones alcanzando un consumo de 54 millones de toneladas al año en la alimentación animal. Es un cultivo con altísima tolerancia al estrés biótico (plagas, enfermedades, etc.) que no genera sobrecostos en conservación por lo que está enormemente extendido en *Latinoamérica* [10].

Existen varios métodos para eliminar el HCN que está contenido dentro de las células de la planta de yuca que encarecen el producto pero permiten emplearlo como forraje suministrado [11].

Por otra parte, el diagnóstico de las intoxicaciones por vegetales puede resultar muy difícil ya que la ingestión de plantas venenosas puede producir tanto síntomas en el animal vivo como lesiones en el cadáver inespecíficas, posibles de confundir con los producidos por muchas otras enfermedades. Este hecho junto con la dificultad de control de los diferentes tipos de maleza y la intoxicación por variedades frescas ponen de manifiesto la necesidad de encontrar una solución preventiva al problema [8].

El cianuro absorbido normalmente es eliminado por vía pulmonar y el resto es destoxicado mediante su transformación a tiocianato (SCN^-), el cual es excretado por vía renal. La formación de tiocianato es catalizada por una S-transferasa (rodanasa) de amplia distribución orgánica, según la siguiente reacción:



La intoxicación ocurre cuando es sobre pasada la capacidad del organismo para destoxicar el cianuro. El cianuro forma un complejo estable con la enzima citocromo oxidasa, manteniendo así en

estado oxidado al hierro enzimático (Fe^{3+}) lo que paraliza la cadena respiratoria y origina una hipoxia histotóxica. Dado que las mayores concentraciones de citocromo oxidasa se encuentran en órganos de elevado metabolismo oxidativo, la falla respiratoria celular ocurre prontamente en el corazón y el cerebro; lo que explica la rápida presentación del cuadro clínico (15 minutos a 2 horas) y su veloz desenlace mortal (30 minutos a 4 horas). La intoxicación es por tanto siempre de tipo agudo [12].

El tratamiento clásico postintoxicación persigue dos objetivos: a) restablecer la respiración celular, y b) destoxicar el cianuro. Para cumplir el primer objetivo se inyecta por vía endovenosa nitrito de sodio 1% (22 mg/kg), formándose una cantidad controlada de metahemoglobina cuyo Fe^{3+} desplaza al cianuro de su complejo con la citocromo oxidasa. Se forma entonces cianometahemoglobina. El segundo objetivo se cumple al inyectar tiosulfato de sodio 3% (66 mg/kg) por vía endovenosa formándose tiocianato que se excreta por vía renal. A base de evidencias experimentales, se recomienda utilizar solamente tiosulfato de sodio, aunque en dosis mucho mayor (660 mg/kg) que la previamente mencionada. La terapia puede realizarse también por vía oral, no obstante este tratamiento si bien es práctico, no tiene la eficacia de la infusión endovenosa de las sustancias indicadas. En cualquier caso, la terapia debe repetirse cada 6-8 horas [13].

2. OBJETIVO

Se presenta un tratamiento generalizado preventivo de la intoxicación cianídrica para ganado basado en la administración generalizada y continuada de tiosulfato sódico. Se propone mantener una concentración en sangre de esta sustancia inocua, hasta ahora utilizada en el tratamiento de postintoxicación, constante y suficiente para poder destoxicar cualquier ingesta accidental de cianuro.

La vía de administración epicutánea provee una alternativa de administración muy importante para principios activos para terapias prolongadas y terapias de reemplazo ya que permite obtener niveles constantes de fármaco en la sangre y evita así las reacciones adversas asociadas a fluctuaciones en las concentraciones sanguíneas. Dentro de las diferentes formas de administrar fármacos a través de la piel destacan los sistemas de administración transdermal (parches). Estos sistemas proporcionan un régimen terapéutico simple y práctico que puede ser fácilmente suprimido con la simple eliminación del dispositivo transdermal.

Se distinguen diferentes dispositivos de liberación transdérmica entre los que destacan los sistemas matriciales. Estos sistemas están constituidos por un disco/film de hidrogel polimérico, de grosor y área definida, en el cual está uniformemente dispersado el fármaco cuya liberación

controla el entramado del polímero.

Los hidrogeles son materiales poliméricos entrecruzados de origen natural o sintético que son capaces de hincharse en contacto con el agua y retenerla en su estructura molecular sin disolverse [14]. Desde que los hidrogeles se introdujeron en el campo de la biomedicina ha quedado demostrado que gracias a su biocompatibilidad poseen un gran potencial como biomateriales, destacando en el área de la liberación controlada de principios activos [15,16].

Existen diferentes mecanismos de liberación de controlada de fármacos a partir de hidrogeles poliméricos. El tipo de mecanismo de liberación vía física más extendido es el controlado por hinchamiento. Estos sistemas inicialmente están secos y al ponerse en contacto con los fluidos biológicos, absorben el agua u otros fluidos, hinchándose, aumentando tanto el volumen acuoso dentro del hidrogel como su tamaño tridimensional hasta alcanzar el equilibrio de hinchamiento sin disolverse. La liberación de agentes bioactivos por mecanismos de hinchamiento controlado de un polímero, está relacionada con la difusión de un soluto (fármaco) desde y a través de dicho polímero bajo difusión a contracorriente de agua o fluido biológico hacia el interior del polímero [17].

Existen fundamentalmente dos factores internos que determinan el hinchamiento de los hidrogeles: grado de entrecruzamiento y estructura molecular. El entrecruzamiento supone una dificultad en la movilidad de las cadenas de polímero, disminuyendo así el hinchamiento. De esta forma, un hidrogel muy entrecruzado posee una estructura muy compacta y se hincha menos comparado con el mismo hidrogel con un menor entrecruzamiento. Además, la estructura molecular del hidrogel, afecta también a su hinchamiento. Hidrogeles con grupos hidrófobos en su estructura se hinchan en un menor grado que hidrogeles con grupos hidrófilos. Estos dos factores internos pueden ser variados para controlar y optimizar la cinética de liberación del principio activo cargado en el gel.

En base a esto, se propone sintetizar una red polimérica entrecruzada macroscópica de poliácido acrílico para servir de soporte de almacenaje y dosificación controlada de tiosulfato sódico y evaluar la liberación del mismo a través de métodos “*in vitro*” en el estudio de penetración transepitelial del mismo. Así mismo se estudiará la dependencia del grado de entrecruzamiento y la composición de las redes sintetizadas en la capacidad de liberación de tiosulfato sódico.

Los métodos “*in vitro*” aplicados al estudio de la penetración de drogas representan las técnicas más difundidas. En estos métodos se utilizan tanto piel animal o humana como membranas artificiales (piel artificial) y celdas de difusión de *Franz*. La celda de difusión de *Franz* representa, desde su desarrollo en 1975, el principal método utilizado para evaluar la penetración transepitelial de fármacos [18-20]. La celda de difusión es un sistema compuesto por dos cámaras, una donante y

otra aceptora, separadas por piel o membrana artificial. El estrato córneo es orientado hacia la cámara donante a través de la cual se aplican las drogas a estudiar. Con sus desventajas este modelo “*in vitro*” es un buen indicador cualitativo de la penetración cutánea de fármacos [21,22] y es considerado un sistema confiable para evaluar la bioequivalencia/biodisponibilidad [23].

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales. Ácido acrílico (AA) (*Merck*), agua bidestilada, 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro (V-50), (*Wako*), *N,N'*-metilenbisacrilamida (NMBA) (*Merck*), tiosulfato sódico (*Panreac*), hidrógeno fosfato sódico (*Panreac*), dihidrógeno fosfato de sodio (*Panreac*), *N,N'*-Dimetacrilamida (DMA) (*Merck*), orejas de conejo.

3.2. Síntesis. Se sintetizaron hidrogeles de ácido acrílico y copolímeros de ácido acrílico/*N,N'*-dimetacrilamida empleando *N*-metilenbisacrilamida como entrecruzante y V-50 como iniciador. Para ello se empleo el dispositivo que se muestra en la Figura 2. La relación empleada monómero/agua fue 20/80 y el contenido en entrecruzante e iniciador fue del 2-10 y 0,5% en peso respectivamente. Se introdujo el principio activo, tiosulfato sódico, en la propia síntesis siendo la concentración de tiosulfato cargada del 25% en peso del monómero total en todos los casos. Se empleó esta concentración por resultar la mayor concentración posible de tiosulfato a disolver en la mezcla de polimerización y cuya liberación total lleva a las concentraciones de dosis recomendadas para animales de peso medio de 500 kg sabiendo que el volumen medio de sangre para animales de estos pesos es de 35 litros (10 mg/mL).

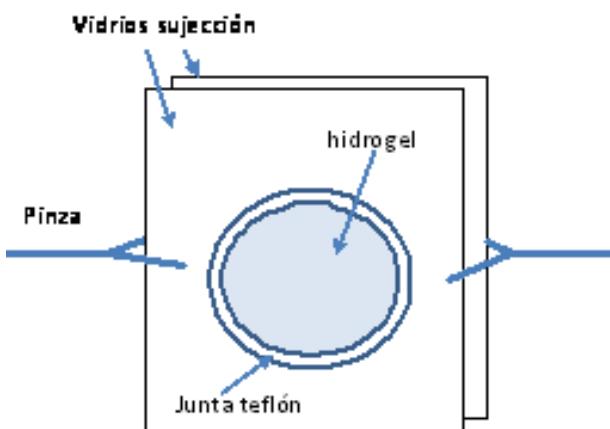


Figura 2. Dispositivo empleado para la síntesis de hidrogeles laminados.

Una vez obtenida la mezcla de reacción fue burbujeada con gas nitrógeno durante 20 minutos e incorporada a moldes laminares de reacción de vidrio que fueron previamente sometidos a tratamiento antiadherente (diclorometilsiloxano, tolueno al 2% (v/v) y secado a 50°C). La

polimerización se llevó a cabo a 50°C durante 24 horas. Como resultado se obtienen hidrogeles transparentes en forma laminar cargados con tiosulfato sódico.

3.3. Liberación transdérmica de tiosulfato sódico. Se llevó a cabo la liberación del tiosulfato sódico cargado en muestras de hidrogeles de 12 mm de diámetro en el estado obtenido tras la síntesis empleando una celda de difusión de *Franz* y manteniendo el volumen de buffer constante en la misma. Se utilizó piel de la parte interna de la oreja de conejos como membrana intermedia entre el hidrogel y la disolución tampón. En la Figura 3 se muestra un esquema del dispositivo empleado en los estudios de liberación transdérmica a temperatura ambiente.

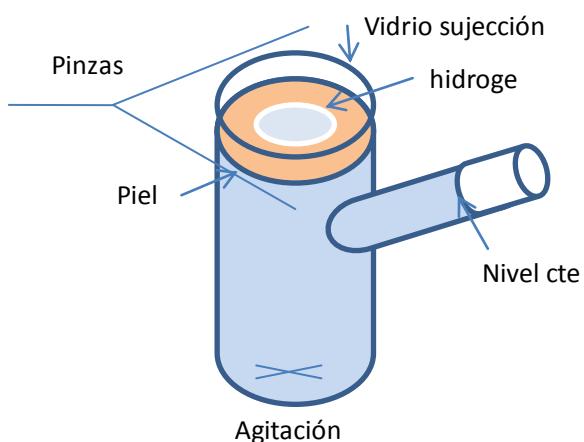


Figura 3. Esquema del sistema empleado para la liberación.

El tiosulfato sódico liberado será cuantificada a partir de la determinación de la absorbancia a 214 nm mediante espectroscopía ultravioleta-visible en una disolución de tampón fosfato a pH 7,4 simuladora del medio fisiológico. La Figura 4 muestra la recta de calibrado obtenida:

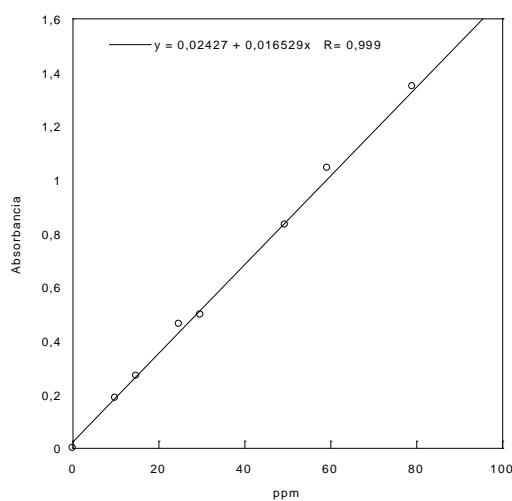


Figura 4. Calibrado de tiosulfato sódico en tampón fosfatos a pH = 7,4 a 214 nm.

RESULTADOS

Se sintetizaron hidrogeles de ácido acrílico y poli(ácido acrílico-*co*-*N,N'*-dimetacrilamida) incluyendo el principio activo tiosulfato sódico en la formulación inicial de polimerización. Se llevó a cabo el estudio de la liberación transdermal del tiosulfato sódico cargado en los hidrogeles sintetizados para muestras con diferente porcentaje de agente entrecruzante y diferente contenido en *N,N'*-dimetacrilamida. La Figura 5 muestra la cinética de liberación obtenida para hidrogeles de ácido acrílico puro entrecruzados al 2, 5 y 10% en peso con NMBA. Se observa el perfil típico de la curva de hinchamiento, en el que tiene lugar un aumento acelerado inicial de la concentración de sal al que le sigue una disminución de la velocidad hasta alcanzar la concentración constante en el tiempo. Tal y como muestra la figura 5, no sólo la velocidad inicial de liberación disminuye con el entrecruzamiento de las redes sino que también lo hace de forma muy notoria el contenido total de tiosulfato liberado. En redes de elevada densidad de nudos parte del tiosulfato sódico inicialmente cargado queda atrapado en el entramado polimérico, al contrario que ocurre para hidrogeles del 2% de NMBA en los que la liberación es total y por tanto el rendimiento de la operación es del 100%.

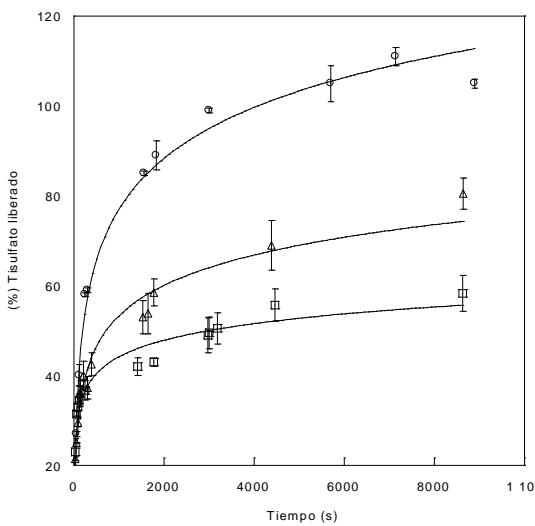


Figura 5. Porcentaje de tiosulfato sódico liberado por hidrogeles de ácido acrílico entrecruzados: o) 2, Δ) 5 y □) 10% de NMBA en peso respecto al monómero total.

Así mismo se estudió la liberación de tiosulfato sódico a partir de matrices copolímeras de ácido acrílico y *N,N'*-dimetacrilamida de diferente composición. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6 donde se observa una clara desaceleración de la liberación y una fuerte disminución en la fracción total liberada de tiosulfato a medida que el ácido acrílico es sustituido por la dimetacrilamida. Este hecho es consecuencia del menor hinchamiento de los copolímeros al disminuir las repulsiones electrostáticas entre los carboxilatos en la red.

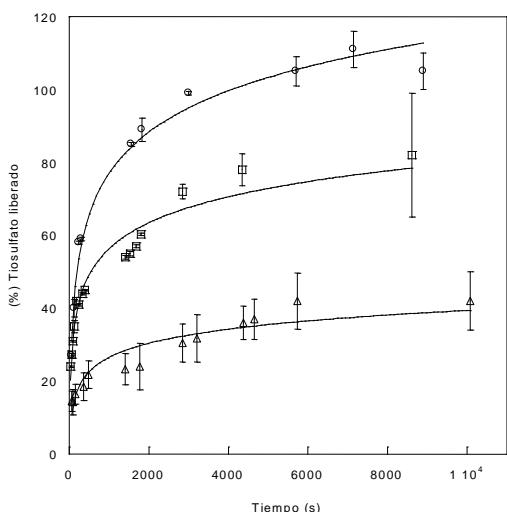


Figura 6. Porcentaje de tiosulfato sódico liberado por hidrogeles copolímeros de ácido acrílico y N,N'-dimetacrilamida de diferente composición: o) 100/0, □) 40/60, Δ) 4/96 y todos ellos con un grado de entrecruzamiento de NMBA del 2% en peso respecto al monómero total.

De las soluciones matemáticas de la segunda ecuación de *Fick* para los procesos de difusión, bajo condiciones límite simples, empleadas generalmente en los experimentos de liberación de fluidos biológicos, y para matrices con formas geométricas sencillas como esferas, cilindros, láminas [24], se obtiene la siguiente ecuación para tiempos cortos [25,26]:

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

dónde el cociente M_t/M_∞ es la fracción de principio activo liberada en el tiempo t , k es una constante característica del sistema y n es un exponente característico del modo de transporte del soluto. En la Tabla 2 se muestran los valores del exponente n obtenidos para las cinéticas de liberación de tiosulfato sódico realizadas.

Tabla 2. Valores del exponente de difusión n y los índices de correlación (R^2) obtenidos para las diferentes cinéticas de liberación de tiosulfato sódico.

AA (%)	DMA (%)	NMBA (%)	n	R^2
100	0	2	0,50	0,99325
100	0	5	0,22	0,98846
100	0	10	0,13	0,99231
40	60	2	0,26	0,99532
4	96	2	0,15	0,99882

Los valores obtenidos de n han presentado un máximo de 0,50 para la liberación a partir de los hidrogeles puros de ácido acrílico de menor entrecruzamiento. Este valor corresponde a un mecanismo de difusión tipo I o *fickiano* en el cuál la velocidad de difusión es mucho menor que la relajación siendo la difusión la que gobierna la liberación del principio activo. En el resto de los casos en los que el porcentaje de retención de tiosulfato sódico es importante, los valores del exponente n obtenidos resultan alejarse del comportamiento *fickiano* a medida que aumenta la retención del fármaco y disminuye el hinchamiento.

CONCLUSIONES

Se ha comprobado mediante ensayos “*in vitro*” que hidrogeles laminares de poliácido acrílico pueden resultar óptimos soportes para la liberación controlada de tiosulfato sódico en concentraciones adecuadas para desarrollar su acción terapéutica bloqueante de HCN para grados de entrecruzamientos inferiores al 5%. Del mismo modo se ha observado cómo la disminución del grado de entrecruzamiento y la copolimerización con N,N'-dimetacrilamida limitan la liberación del principio activo.

Agradecimientos. Los autores agradecen al *MCYT* y al *Gobierno Vasco* las ayudas económicas que hicieron posible la realización de este trabajo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Garland T, Barr AC (editores) “*Toxic Plants and Other Natural Toxicants*”. CABI, New York, (1998)
- [2] McEvoy TG et al. “Feed and forage toxicants affecting embryo survival and fetal development”, *Theriogenology*, **55**, 113 (2001)
- [3] Duthil J “*Producción de Forrajes*”. 3^a edición. Editorial Mundi-Prensa. España, 1990
- [4] Hunt B, Taylor A “Hydrogen cyanide production by field grown sorghums”, *N. Zel. J. Exp. Agr.*, **4** (1), 191 (1976)
- [5] Inuyama S, Kaji M “Transition of the hidrocianic acid content in the different parts of forage sorghum”, *J. Jap. Soc. Grsl. Sci. Herbage Abst.*, **43**(2), (1971)
- [6] Loyd R, Gray E “Amount and distribution of hidrocianic potencial during the life cycle of plants of three sorghum cultivars”, *Agron. J.*, **62** (3), 394 (1970)
- [7] Poulton JE “Cyanogenesis in plants”, *Plant Physiol.*, **94**, 401 (1990)
- [8] Vetter J “Plant cyanogenic glycosides”, *Toxicon*, **38**, 11 (2000)
- [9] Church D “*Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes*”. Volumen 11. Editorial ACRIBIA. España, 1982
- [10] Buitrago J “*La yuca en la alimentación animal*”, CIAT. (1999)
- [11] Tewe OO “*Desintoxicación de los productos de la mandioca y de los efectos de toxinas residuales en animales que consumen*”. Art. FAO, (1985)
- [12] Kingsbury J “*Plant poisons to livestock. A review*”, *Agron. J.*, **41**, 875 (1958)
- [13] Haskell SR et al. “Antidotes in food animal practice”, *JAVMA* **226**, 884 (2005)
- [14] Lee WF, Shieh CH, *J. Appl. Pol. Sci.*, **71**, 221 (1999)
- [15] Ratner B. D., Hoffman A. S., *Hydrogels for Medical and Related Applications*, Andrade JD (editor) ASC Symposium Series vol. 31, Washington DC, 1, (1976)
- [16] Jeyanthi R, Rao K, Panduranga J, *Control. Release*, **13**(1), 91 (1990)
- [17] Korsmeyer RW, Peppas NA “*Controlled Release Delivery Systems*”, Roseman TJ y Mansdorf SZ (editores). Marcel Dekker, Inc, Nueva York 1983
- [18] Higaki K, Nakayama K, Suyama T, Amnuaikit C, Ogawara K, Kimura T “Enhancement of topical delivery of drugs via direct penetration by reducing blood flow rate in skin”, *Inter. J. Pharm.*, **288**, 227

(2005)

- [19] Bonina F, Puglia C, de Caprariis P, Palagiano F, Rimoli M, Saija A “*In vitro* and *in vivo* evaluation of polyoxyethylene esters as dermal prodrugs of ketoprofen, naproxen and diclofenac”, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **14**, 123 (2001)
- [20] Jacobi U, Taube H, Schäfer UF, Sterry W, Lademann J “Comparison of four different *in vitro* systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum”, *J. Control. Rel.*, **103**, 61 (2005)
- [21] Nokhodch A, Nazemiyed H, Ghafourian T, Hassan Zadeh D “The effect of glycyrrhizin on the realese rate and skin penetration of diclofenac sodium from topical formulations”, *Il Farmaco*, **57** (11), 888 (2003)
- [22] Riviere J, Papich M “Potential and problems of developing transdermal patches for veterinary applications”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **50**, 175 (2001)
- [23] Escribano E, Calpena AC, Queralt J, Obachand R, Doménech J “Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula”, *Eur. J. Pharmol Sci.*, **19** (4), 203 (2003)
- [24] Crank J “*The Mathematics of Diffusion*”, Claredon Press, Oxford (1975)
- [25] Yean L, Bunel C, Vairon JP, *Makromol. Chem.*, **191**, 1119 (1990)
- [26] Peppas NA, Bures P, Leobandung WE, Ichikawa H, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 27 (2000)