



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Contribución a la implementación de un ensayo de permeación bucal *in vitro*, empleando cafeína como compuesto modelo

Lina Marcela Sanabria Becerra

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2017

Contribución a la implementación de un ensayo de permeación bucal *in vitro*, empleando cafeína como compuesto modelo

Lina Marcela Sanabria Becerra

Tesis como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacología

Directora:

Ph.D. Yolima Baena Aristizábal

Línea de Investigación:

Farmacocinética y estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia

Grupo de Investigación:

Sistemas para Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas
(SILICOMOBA)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2017

*“El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable.
Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad.”*

Víctor Hugo

Agradecimientos

A Dios y María Auxiliadora por guiarme y protegerme en el camino.

A la Universidad Nacional de Colombia por acogerme y convertirse en mi segundo hogar.

Al Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias y al grupo SILICOMOBA por permitirme lograr el desarrollo de este trabajo.

Agradezco el gran apoyo brindado por el frigorífico Guadalupe, el señor Raúl Beltrán y Jacid Ancizar, quienes permitieron realizar la recolección de todas las muestras de tejido requeridas en esta investigación.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la profesora Yolima Baena por su confianza, por sus enseñanzas, por su calidad humana y por darme la oportunidad de aprender a descubrir un mundo nuevo.

De manera especial quiero agradecer al profesor Jorge Ariel por su valiosa colaboración, paciencia y disposición.

A Laura Martínez por su colaboración, ayuda y amistad.

A los amigos que llegaron a mi vida y a mi corazón: Johanna, Carlos, Nelson, David, JuanJo, Mariana, Sandra, Elizabeth, Sindy, Cristhian, Judith, Jacky, Ivonne, Aldemar, Maria Isabel, Jors quienes hicieron más enriquecedora esta experiencia.

A la señora Patricia y Jorge por su colaboración, las conversaciones amenas y amistad.

A Lina, Zayara y Catalina por su eterna y excepcional amistad.

A la familia Ávila Calderón quienes me acogieron estos años y brindaron todo su afecto.

Agradezco especialmente a Carlos Ávila por su amor, por su apoyo incondicional y por permitirme construir sueños a su lado.

A mi hermano Alejandro y toda mi familia por su voz de aliento, oraciones, ayuda y cariño.

Finalmente, mi eterna gratitud a mis padres Ceci y Emilio, por su amor, apoyo, sacrificio, ejemplo y trabajo inalcanzable diariamente; todo siempre será por y para ustedes.

Resumen

Los estudios de permeación bucal *in vitro* empleando mucosa porcina se consideran útiles en el desarrollo temprano de formulaciones; sin embargo, a nivel mundial se ha reportado una falta de reproducibilidad al emplear tejidos animales atribuida a la "variabilidad biológica", por lo que, al implementar este tipo de ensayos en el Grupo de Investigación, se pretendió ahondar en las diferentes variables que pudieran tener influencia, empleando cafeína como compuesto modelo de moléculas hidrofílicas.

Se validó una metodología analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) para la cuantificación de la cafeína, utilizando una columna de fase reversa C₁₈ con detección UV a 273 nm y una fase móvil constituida exclusivamente por agua-acetonitrilo (80:20 v/v). Las características de desempeño evaluadas permitieron comprobar que existe una adecuada selectividad, una linealidad entre 0.5 y 50 ug/mL, con una precisión expresada como RSD menor a un 2%, un porcentaje de recuperación del 99.9% y unos límites de detección y cuantificación para el método de 0.85 y 2.69 ng/mL, respectivamente; así mismo, se evaluó la estabilidad sometiendo alícuotas tanto de la validación del sistema como del método a diferentes condiciones de tiempo y temperatura de almacenamiento, sin presentar una degradación significativa.

Por medio del análisis de muestras histológicas de la mucosa bucal, la evaluación de esta membrana por el método de pérdida de agua transmucosa y los ensayos de permeación empleando celdas de Franz, se estudió el efecto de la técnica de separación, los medios, la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la morfología celular y la organización del tejido, la integridad de la membrana y parámetros asociados a la permeación (flujo en estado estacionario, constante de permeabilidad y cantidad acumulada a las 4 horas). Se determinó que se pueden realizar cortes con bisturí o dermatomo sin alterar los parámetros de permeabilidad, mientras que la

separación por calor presenta un comportamiento diferente. El almacenamiento de los tejidos en una solución de Krebs-Ringer-Bicarbonato a 4 °C, mantuvo el tejido en óptimas condiciones por 24 horas, mientras los procesos de congelación evidencian cambios a nivel de las células epiteliales superiores, pero en menor proporción cuando se usan criopreservantes con dimetilsulfóxido y suero fetal bovino. La medida de la integridad de la membrana, mediante la técnica de pérdida de agua transmucosa, demostró ser un buen indicador de este parámetro, siendo una alternativa rápida y poco explorada con mucosa bucal que permite seleccionar los tejidos para los ensayos de permeabilidad de manera práctica, pero que idealmente podría ser complementada con otras técnicas.

En conclusión, mediante la realización de este trabajo de investigación se establecieron las condiciones de las variables para la implementación del ensayo de permeación bucal *in vitro*, para compuestos hidrofílicos, empleando cafeína como molécula modelo.

Palabras clave: permeación bucal, cafeína, pérdida de agua transmucosa, *in vitro*, celdas de Franz.

Abstract

In vitro oral permeation studies using porcine mucosa are considered useful in the early development of formulations; however, a lack of reproducibility has been reported worldwide in the use of animal tissues attributed to "biological variability", so, when implementing this type of tests in the Research Group, we intend to delve into the different variables that may have influence, using caffeine as a model compound of hydrophilic molecules.

An analytical methodology was validated by high performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD) for the quantification of caffeine, using a C₁₈ reverse phase column with UV detection at 273 nm and a mobile phase consisting exclusively of water- Acetonitrile (80:20 v/v). The evaluated performance characteristics allowed to verify that there is an adequate selectivity, a linearity between 0.5 and 50 µg/mL, with a precision expressed with a RSD of less than 2%, a recovery rate of 99.9%, and both detection and quantification limits for the method at 0.85 and 2.69 ng/mL, respectively; likewise, the stability was evaluated by subjecting aliquots of both the system and the method validation to different conditions of storage time and temperature, without exhibiting significant degradation.

Through the analysis of histological samples of the buccal mucosa, the evaluation of this membrane by the transmucosal water loss method and the permeation tests using Franz cells, it was studied the effect of the separation technique, media, temperature and storage time on cell morphology and tissue organization, membrane integrity and parameters associated with permeation (flow, permeability constant and the amount permeated at 4 hours). It was determined that cuts with a scalpel or dermatome can be performed without altering the permeability parameters, while the separation by heating

presents a different behavior. The storage of the tissues in a Krebs-Ringer-Bicarbonate solution at 4 ° C, kept the tissue in optimal conditions for 24 hours, while the freezing processes evidenced changes at the level of the superior epithelial cells, but to a lesser extent when using cryopreservants with dimethylsulfoxide and fetal bovine serum.

The measurement of membrane integrity, using the transmucosal water loss technique, proved to be a good indicator of this parameter, being a fast and yet a poorly explored alternative with buccal mucosa that allows to select the tissues for the permeability tests in a practical way, but ideally it could be complemented with other techniques.

In conclusion, through the realization of this research work, we established the conditions of the variables for the implementation of the oral permeation test *in vitro*, for hydrophilic compounds, using caffeine as model molecule.

Key words: oral permeation, caffeine, transmucosal water loss, *in vitro*, Franz cells.

Contenido

Resumen	5
Abstract	7
Lista de figuras	12
Lista de tablas	14
Lista de ecuaciones	16
Lista de Símbolos y abreviaturas	17
Introducción	19
1. Marco teórico	21
1.1 Mucosa oral: características anatómicas e histológicas.....	21
1.2 Mucosa bucal	23
1.2.1 Permeabilidad y barrera de permeabilidad en la mucosa bucal.....	25
1.2.2 Permeación y administración de fármacos a través de la mucosa bucal	27
1.3 Evaluación <i>in vitro</i> de permeabilidad bucal	29
1.4 Cafeína.....	32
1.5 Metodología analítica.....	34
1.6 Algunos estudios previos sobre permeación bucal <i>in vitro</i>	36
2. Objetivos	39
3. Materiales y métodos	40
3.1 Materiales	40
3.1.1 Equipos	40
3.1.2 Reactivos	40
3.1.3 Material biológico	41
3.1.4 Consideraciones éticas	41
3.2 Metodología	42
3.2.1 Desarrollo del método analítico	42
3.2.1.1 Condiciones cromatográficas.....	42

3.2.1.2 Preparación de las muestras.....	42
3.2.1.3 Idoneidad del sistema	43
3.2.2 Validación de la metodología analítica	43
3.2.3 Evaluación de la influencia de algunas condiciones del ensayo sobre el estado de la membrana y el comportamiento de permeación de la cafeína a través de la misma.....	47
3.2.3.1 Condiciones evaluadas	47
3.2.3.2 Variables respuesta empleadas para evidenciar la influencia de las condiciones estudiadas.....	49
3.2.3.3 Análisis de los datos	51
3.2.3.4 Evaluación histológica de los tejidos	52
4. Resultados y discusión	54
4.1 Estandarización de la metodología cromatográfica	54
4.2 Idoneidad del sistema	56
4.3 Validación de la metodología analítica	59
4.3.1 Características de desempeño.....	59
4.3.1.1 Selectividad/Especificidad.....	59
4.3.1.2 Linealidad.....	63
4.3.1.3 Precisión	66
4.3.1.4 Exactitud	69
4.3.1.5 Límite de Detección y Cuantificación.....	69
4.3.1.6 Estabilidad	69
4.4 Evaluación de la influencia de algunas condiciones del ensayo sobre el estado de la membrana y el comportamiento de permeación de la cafeína a través de la misma.....	73
4.4.1 Establecimiento de la metodología para la evaluación de la integridad del tejido por medio de la pérdida de agua transmucosa	74
4.4.2 Establecimiento de la metodología para el estudio de permeación bucal con celdas de Franz	76
4.4.3 Definición de las condiciones de manejo y almacenamiento de la mucosa oral de cerdo.....	79

4.4.3.1 Técnica de separación.....	79
4.4.3.2 Evaluación del empleo de mucosa congelada sin medio de almacenamiento (condiciones del mercado)	83
4.4.3.3 Estudio de medios de almacenamiento de la mucosa a corto plazo	86
4.4.3.4 Evaluación de medios de almacenamiento de la mucosa a largo plazo.....	93
5. Conclusiones y recomendaciones	98
Conclusiones.....	98
Recomendaciones.....	101
Bibliografía	102
Anexo A: Datos asociados a la validación de la metodología analítica.	112
Anexo B: Datos de la determinación de pérdida de agua transmucosa	125

Lista de figuras

Figura 1-1: Tipos de mucosa en cavidad oral.....	23
Figura 1-2: Representación esquemática de la estructura fisiológica de la mucosa bucal.	24
Figura 1-3: Esquema de celda de Franz	30
Figura 1-4: Estructura química de la cafeína.....	33
Figura 3-1: Esquema de muestras analizadas en el control histológico	53
Figura 4-1: Isograma obtenido para cafeína (10 µg/mL).....	55
Figura 4-2: Cromatograma de cafeína (10 µg/mL)	55
Figura 4-3: Cromatogramas de la evaluación de selectividad.	60
Figura 4-4: Espectros UV: (A) LOQ) del sistema, (B) LOQ del método, (C) Fase móvil, (D) KRB, (E) PBS, (F) Muestra blanco matriz.	61
Figura 4-5: Pureza del pico de cafeína en el método.	61
Figura 4-6: Topogramas obtenidos por HPLC-DAD para: A) LOQ método. B) LOQ sistema. C) Muestra blanco matriz. D) PBS. E) KRB.....	62
Figura 4-7: Curvas de calibración para el sistema y para el método	63
Figura 4-8: Comparación de la integridad de la mucosa de cerdo intacta y la mucosa dañada intencionalmente.	75
Figura 4-9: Prueba de agitación en celda de Franz.....	77
Figura 4-10: Perfiles de cafeína a dos niveles de concentración en la cámara donora....	78
Figura 4-11: Comparación histológica de la mucosa bucal con diferentes técnicas de separación: a) Separación por bisturí y b) Separación por dermatomo.	80
Figura 4-12: Perfil de permeación de cafeína a través de mucosa bucal de cerdo, realizando separación por bisturí, dermatomo y calor.	81
Figura 4-13: Mucosa bucal separada con calor comparada con la separación con bisturí.	82
Figura 4-14: Mucosa de cerdo en condiciones de almacenamiento no controladas.....	84
Figura 4-15: Comparación de perfiles de permeación de cafeína a través de mucosa bucal fresca y mucosa congelada sin medio de almacenamiento.	85

Figura 4-16: Mucosa bucal almacenada durante 24 h a 4 °C bajo las siguientes condiciones: a) PBS (bisturí), b) PBS (calor), c) KRB (bisturí), d) KRB (calor).....	87
Figura 4-17: Determinación de TMWL inicial a las 12 horas para los medios de almacenamiento a corto plazo.....	88
Figura 4-18: Perfil de permeación de la cafeína a través de mucosa bucal almacenada en PBS con separación por bisturí.	89
Figura 4-19: Perfil de permeación de la cafeína a través de mucosa bucal almacenada en PBS con separación por calor	91
Figura 4-20: Mucosa congelada a -80°C: a) Criopreservante B durante 30 días, b) Criopreservante A durante 15 días, c) Criopreservante B durante 15 días	94
Figura 4-21: Perfiles de permeación de cafeína en mucosa oral de cerdo con medios de almacenamiento a largo plazo.....	96
Figura A-1: Cromatogramas de cafeína y mucosa obtenido en ensayo preliminar A.	112
Figura A-2: Cromatogramas de cafeína y mucosa obtenidos en ensayo preliminar B ...	113
Figura A-3: Cromatogramas de cafeína y mucosa obtenidos en ensayo preliminar C ...	114
Figura A-4: Curva de calibración para linealidad del sistema a bajas concentraciones...	118
Figura A-5: Curva de calibración para linealidad del método a bajas concentraciones..	118

Lista de tablas

Tabla 1-1: Comparación de diferentes mucosas.	22
Tabla 1-2: Ejemplos de productos disponibles en el mercado para el suministro sistémico de fármacos a través de la mucosa bucal	29
Tabla 1-3: Propiedades fisicoquímicas de la cafeína	33
Tabla 3-1: Niveles altos de concentración de las soluciones de trabajo para la validación de la metodología analítica	43
Tabla 4-1: Condiciones cromatográficas empleadas.	54
Tabla 4-2: Resultados de la idoneidad del sistema	58
Tabla 4-3: Prueba t para evaluar la linealidad del sistema y del método.	64
Tabla 4-4: ANOVA de la regresión lineal para el sistema y el método, prueba de F.	65
Tabla 4-5: Test de Cochran para la evaluación de la precisión del sistema.	66
Tabla 4-6: Test de Cochran para la evaluación de la precisión en el método.	67
Tabla 4-7: Precisión intermedia y análisis de varianza del sistema.	68
Tabla 4-8: Precisión intermedia y análisis de varianza del método.	68
Tabla 4-9: Datos para el cálculo del límite de detección y cuantificación.	69
Tabla 4-10: Estabilidad a corto plazo en el automuestreador	71
Tabla 4-11: Estabilidad de cafeína a largo plazo (ciclos de enfriamiento- temperatura ambiente)	72
Tabla 4-12: Estabilidad durante el proceso de obtención de las muestras en el ensayo de permeación bucal <i>in vitro</i>	73
Tabla 4-13: Valores de Jss, Kp y Q ₄ para cafeína a dos niveles de concentración en la cámara donora.	78
Tabla 4-14: Valores de Jss, Kp, Q ₄ y TMWL según la técnica de separación.	81
Tabla 4-15: Comparación de valores de Jss, Kp, Q ₄ y TMWL de mucosa fresca y mucosa congelada sin medio de almacenamiento	86
Tabla 4-16: Valores de Jss, Kp, Q ₄ y TMWL para almacenamiento en PBS con separación por bisturí.	90

Tabla 4-17: Valores de J_{ss} , K_p , Q_4 y TMWL para almacenamiento en PBS con separación por calor.....	91
Tabla 4-18: Valores de J_{ss} , K_p , Q_4 y TMWL para almacenamiento en KRB con separación por calor.....	92
Tabla 4-19: Valores de J_{ss} , K_p , Q_4 y TMWL para almacenamiento en KRB con separación con bisturí.....	92
Tabla 4-20: Valores de J_{ss} , K_p , Q_4 y TMWL para medios de almacenamiento a largo plazo.....	95
Tabla A-1: Datos para elaborar las curvas de calibración de sistema y del método.....	115
Tabla A-2: Datos para precisión intermedia del sistema.....	116
Tabla A-3: Datos para precisión intermedia del método.....	116
Tabla A-4: Datos para elaborar las curvas de calibración de sistema y del método a bajas concentraciones.....	117
Tabla A-5: Datos para elaborar las curvas de calibración de sistema y del método a bajas concentraciones.....	119
Tabla A-6: Prueba t para evaluar linealidad del método a bajas concentraciones.....	119
Tabla A-7: ANOVA de la regresión lineal para el sistema a bajas concentraciones, prueba de F.....	119
Tabla A-8: ANOVA de la regresión lineal para el método a bajas concentraciones, prueba de F.....	120
Tabla A-9: Test de Cochran para la evaluación de la precisión del sistema a bajas concentraciones.....	120
Tabla A-10: Test de Cochran para la evaluación de la precisión en el método a bajas concentraciones.....	121
Tabla A-11: Datos de estabilidad a corto plazo (Automuestreador).....	122
Tabla A-12: Datos de estabilidad de la cafeína a largo plazo.....	123
Tabla A-13: Datos de la estabilidad durante el ensayo de permeación bucal <i>in vitro</i>	124
Tabla B-1: TMWL en mucosas intactas y dañadas.....	125

Lista de ecuaciones

Ecuación 1-1: Flujo en estado estacionario	32
Ecuación 1-2: Coeficiente de permeación	32
Ecuación 3-1: Límite de detección	45
Ecuación 3-2: Límite de cuantificación	46
Ecuación 4-1: Factor de capacidad (k') (62).	56
Ecuación 4-2: Número de platos teóricos (62).	57
Ecuación 4-3: Altura de plato (H) (74).	57
Ecuación 4-4: Factor de asimetría (T) (62).	58

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura/ Símbolos	Término
ANOVA	Análisis de varianza (por sus siglas en inglés)
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
CV	Coeficiente de variación
DAD	Detector de arreglo de diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Solución salina tamponada con fosfatos de Dulbecco
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> : Agencia de Alimentos y Medicamentos
HPLC	Cromatografía de alta eficiencia (por sus siglas en inglés)
Jss	Flujo en estado estacionario
KRB	<i>Krebs-Ringer-Bicarbonato</i>
Kp	Coeficiente de permeabilidad
LOD	Límite de detección (por sus siglas en inglés)
LOQ	Límite de cuantificación (por sus siglas en inglés)
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
Q ₄	Cantidad acumulada a las 4 horas
rpm	Revoluciones por minuto
S	Desviación estándar
SFB	Suero fetal bovino
TMWL	Pérdida de agua transmucosa (por sus siglas en inglés)
TEWL	Pérdida de agua transepidérmica (por sus siglas en inglés)

°C Grados Celsius o centígrados

® Marca registrada

Introducción

La ruta más utilizada en la administración de fármacos es la vía peroral, dado que es cómoda, económica y por lo general más inocua, sin embargo, presenta varias desventajas significativas incluyendo: la degradación de algunos principios activos por enzimas digestivas o pH gástrico muy ácido, anomalías en la absorción en presencia de alimentos, la necesidad de contar con la colaboración del paciente, así como el efecto de primer paso hepático. A partir de estos inconvenientes, desde hace varios años ha existido un gran interés en el uso de mucosas para la administración de fármacos, por ejemplo: mucosa nasal, rectal, vaginal, de la cavidad oral y ocular (1, 2). La entrega de fármacos en la cavidad oral ha atraído una atención especial debido a sus características fisiológicas y al potencial para el cumplimiento del régimen terapéutico por parte del paciente; esencialmente la mucosa bucal se ha calificado como una ruta de administración atractiva por tener un área de superficie grande, lisa y relativamente inmóvil, con resistencia sustancial a la irritación o daño, además de estar equipada para el suministro sistémico de fármacos, evitando los inconvenientes mencionados (3-9).

El potencial de las moléculas a ser administradas por vía bucal es investigado por metodologías *in vivo* o *in vitro*; considerándose las pruebas de permeabilidad con tejido bucal animal aislado en celdas de difusión, el método *in vitro* más utilizado. Este último permite determinar la cantidad de fármaco que se difunde a través del tejido en el tiempo, siendo posible evaluar la cinética de transporte en la mucosa. Debido a la semejanza reportada de la mucosa bucal porcina en cuanto a estructura y permeabilidad con la mucosa bucal humana, el cerdo se ha convertido en el modelo animal más utilizado en estas investigaciones (10, 11).

Teniendo en cuenta la significativa variación biológica o falta de reproducibilidad reportada en los estudios *in vitro* y el interés del Grupo de Investigación en Sistemas de Liberación Modificada de Moléculas Biológicamente Activas (SILICOMOBA), en el que se ha buscado implementar ensayos biofarmacéuticos para la evaluación de fármacos y

formulaciones que involucran la vía transmucosa, la presente investigación tiene como objetivo contribuir a la implementación de un ensayo de permeación bucal *in vitro* por medio de celdas de Franz, empleando cafeína como compuesto modelo y mucosa bucal porcina como membrana biológica (12, 13). En este contexto, se debe resaltar que no se encontró establecido en la literatura con cuántos compuestos se puede estandarizar esta vía, como sí se presenta en otras, donde la FDA ha reportado se requieren hasta 20 compuestos modelos para tal finalidad; sin embargo, empezando con el proceso de estandarización se considera necesario iniciar con un fármaco como la cafeína que es un compuesto hidrófilo modelo ampliamente utilizado en este tipo de estudios (14). De esta manera, es posible disponer de información bibliográfica de perfiles de permeación transmucosa que orienten sobre las variables del ensayo que podían ser críticas, con el fin de obtener valores fiables que a futuro se puedan reportar y comparar con otras investigaciones de esta naturaleza hechas alrededor del mundo.

Hasta donde se conoce en Colombia no se han realizado estudios de permeación bucal empleando celdas de Franz, puesto que no se encontraron tesis concluidas o publicaciones en revistas científicas al respecto. Se considera que es apropiado el implementar un método de este tipo, pues contribuiría a la comunidad académica y al sector industrial, al ofrecer un servicio que hasta el momento no se encuentra disponible en el país, que permitiría evaluar la seguridad y eficacia de los productos farmacéuticos desarrollados para esta ruta de administración.

1. Marco teórico

1.1 Mucosa oral: características anatómicas e histológicas

La mucosa oral es una compleja serie de tejidos que ostentan una gama de permeabilidades de acuerdo con la región de la boca y presenta un área superficial de aproximadamente 100 cm² (7, 8, 15, 16).

El entorno de la cavidad oral tiene algunos retos importantes para la administración de fármacos sistémicos; en primer lugar, el fármaco debe ser liberado de la formulación en el sitio de entrega (por ejemplo, zona bucal o sublingual) y pasar a través de las capas de la mucosa para entrar en la circulación sistémica. Ciertos aspectos fisiológicos de la cavidad oral juegan un papel importante en este proceso, incluyendo el pH, el volumen de líquido, la actividad enzimática y la permeabilidad de la mucosa oral, la cual puede variar dependiendo de la zona (1). En la Tabla 1-1, se presenta una comparación de las características fisiológicas de la mucosa oral respecto a las mucosas del tracto gastrointestinal.

Tabla 1-1: Comparación de diferentes mucosas.

Sitio de absorción	Área estimada de superficie	Porcentaje de superficie total	pH local	Actividad enzimática relativa	Capacidad relativa de absorción del fármaco
<i>Cavidad oral</i>	100 cm^2 (0.01 m^2)	<i>0.01</i>	<i>5.80 - 7.60</i>	<i>Moderada</i>	<i>Moderada</i>
<i>Estómago</i>	$0.10 - 0.20 \text{ m}^2$	<i>0.20</i>	<i>1.00 - 3.00</i>	<i>Alta</i>	<i>Moderada</i>
<i>Intestino delgado</i>	100 m^2	<i>98.76</i>	<i>5.00 - 7.40</i>	<i>Alta</i>	<i>Alta</i>
<i>Intestino grueso</i>	$0.50 - 1.0 \text{ m}^2$	<i>0.99</i>	<i>6.00 - 7.40</i>	<i>Moderada</i>	<i>Baja</i>
<i>Recto</i>	$200 - 400 \text{ cm}^2$ (0.04 m^2)	<i>0.04</i>	<i>7.00 - 7.40</i>	<i>Baja</i>	<i>Baja</i>

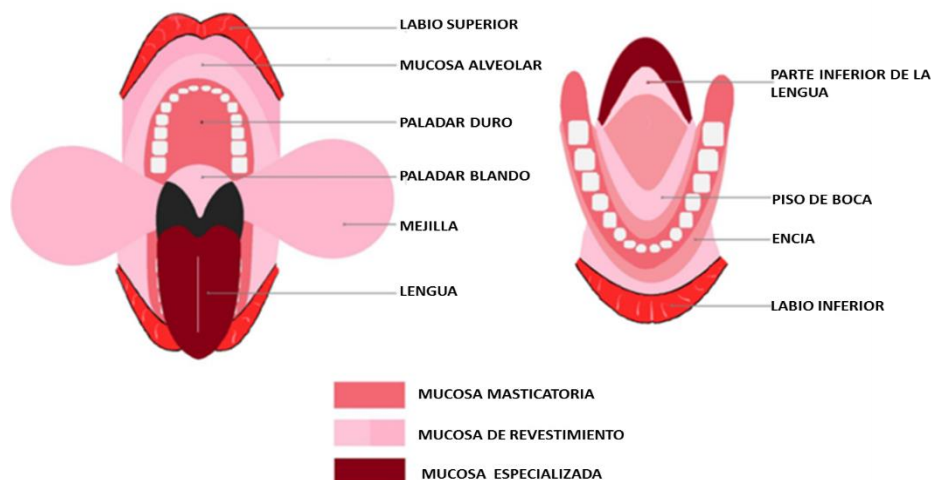
* Adaptado de Patel et al (1).

En la cavidad oral se reconocen tres tipos diferentes de mucosa: la mucosa masticatoria, la mucosa de revestimiento y la mucosa especializada (17, 18), que se puede observar en la Figura 1-1. La mucosa masticatoria, tiene de 100-200 micras de espesor, presenta un epitelio queratinizado que abarca la encía y el paladar duro. La mucosa de revestimiento constituye el 60% de la mucosa oral total, tiene entre 500-800 micras de espesor, presenta un epitelio no queratinizado y se encuentra en la cara interna del labio, paladar blando, cara ventral de la lengua, mejillas y piso de la boca. La mucosa especializada se encuentra en el dorso de la lengua, consiste tanto en mucosa queratinizada como en mucosa no queratinizada y está implicada en la función sensitiva destinada a la recepción de los estímulos gustativos. El término 'bucal', a veces se utiliza erróneamente para hablar de forma generalizada de la mucosa de la cavidad oral, pero debe aclararse que hace alusión específicamente a la mucosa de la mejilla y la cara interna de labios superior e inferior (3, 8, 17, 19).

La mucosa no queratinizada es más permeable que la mucosa queratinizada, constituyendo el principal sitio de administración de fármacos en la cavidad oral; por lo

que, las rutas bucal y sublingual son de interés primario para la administración de fármacos(3).

Figura 1-1: Tipos de mucosa en cavidad oral.



**Adaptado de Patel et al. (1).*

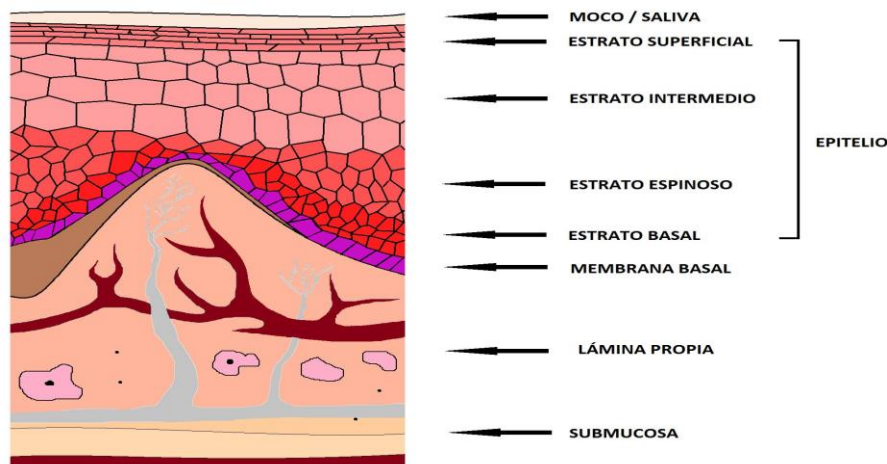
1.2 Mucosa bucal

Estructuralmente la mucosa bucal es un revestimiento multilaminar que consiste en: una capa de moco, un epitelio escamoso estratificado que se separa del tejido conectivo subyacente (lámina propia y submucosa) por una membrana basal ondulada (Figura 1-2) (9, 10, 20, 21) y tiene un espesor estimado en el rango de 500-800 μm (7, 22). A diferencia de los corneocitos del estrato córneo, las células superficiales de la mucosa bucal presentan núcleos, función citoplásmica y están rodeadas por proteína reticulada (14).

El epitelio bucal es no queratinizado y está compuesto por múltiples capas de queratinocitos (40-50 capas de células) que muestran diferentes patrones de maduración entre la superficie y las células más profundas; siendo las células basales capaces de

dividirse y mantener una población epitelial constante a medida que las células se mueven hacia la superficie (7, 8). Se presentan cuatro capas morfológicas: estrato basal, estrato espinoso, estrato intermedio y estrato superficial (17, 23).

Figura 1-2: Representación esquemática de la estructura fisiológica de la mucosa bucal.



**Modificado de Sattar M et al (23).*

En el estrato espinoso se observan los gránulos de revestimiento de membrana (MCGs); estos se fusionan con la membrana plasmática de las células y extruyen el contenido de lípidos al espacio intercelular del tercio superior del epitelio con grandes cantidades de fosfolípidos y cantidades relativamente pequeñas de ceramidas, proporcionando la principal función de barrera (21, 23, 24).

La membrana basal ondulada que separa el epitelio del tejido conectivo, es una capa continua de material extracelular, con aproximadamente 1-2 micras de espesor; mientras que la lámina propia es un tejido conectivo laxo, hidratado que proporciona soporte mecánico y lleva los vasos sanguíneos y los nervios, que suministran la nutrición e inervación del epitelio, respectivamente(15, 23, 25).

Por otra parte, la submucosa está formada por tejido conectivo y podemos encontrar uno o más de los siguientes elementos: glándulas salivares menores, tejido adiposo o fibras

musculares estriadas. El flujo de sangre en la mucosa bucal es del orden de $2.4 \text{ mL min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$; destacando que esta vía se encuentra más vascularizada que la oral, debido a que casi todo el retorno venoso procedente de la zona se incorpora a la vena yugular interna, lo cual tiene trascendencia para la absorción sistémica (20, 23, 26).

1.2.1 Permeabilidad y barrera de permeabilidad en la mucosa bucal

La principal barrera de permeación se encuentra en el tercio más externo del epitelio, resultado del material intercelular derivado de los llamados "gránulos de revestimiento de membrana" (MCGs), cuya presencia no parece depender de la existencia o el grado de queratinización y afecta la ruta paracelular en particular (10, 15, 27); estos MCGs son orgánulos esféricos u ovals, con un diámetro de 100 y 300 nm aproximadamente (1, 12). Los gránulos de revestimiento están compuestos por mayores cantidades de fosfolípidos polares respecto al mostrado en epitelios queratinizados, ésteres de colesterol, glicosilceramidas y cantidades mínimas de ceramidas (4, 10, 15, 28). Estos lípidos dificultan el paso de fármacos hidrófilos, pero el alto grado de hidratación del tejido conectivo obstaculiza el paso de fármacos lipófilos (5, 29).

Algunas pruebas sugieren que la membrana basal puede ser importante en la limitación del transporte de algunos agentes del epitelio al tejido conectivo subyacente, sin embargo, el epitelio exterior todavía se considera que es la etapa limitante de la velocidad de permeación y algunos autores consideran que la estructura de la membrana basal no es lo suficientemente densa como para excluir moléculas incluso si son relativamente grandes (4, 10, 28).

Por otro lado, las células epiteliales de la mucosa bucal están rodeadas por una sustancia fundamental llamada moco, con un espesor que varía de 40 a 300 micras; secretado por las glándulas salivares mayores y menores como parte de la saliva, cuya función es lubricar y proteger las células epiteliales de agresiones mecánicas o químicas (1, 29, 30). Aunque la mayor parte de la mucosidad es agua ($\approx 95-99\%$ en peso), el

componente macromolecular clave es una clase de glicoproteínas conocida como mucinas (1-5%), cuyas masas moleculares van desde 0.5 a más de 20 MDa; adicionalmente, contienen grandes cantidades de hidratos de carbono, siendo capaces de unirse entre sí para formar una red tridimensional extendida que actúa como lubricante, permitiendo que las células se muevan y contribuyan a la adhesión célula-célula (1, 23). El papel del moco en la permeabilidad de la mucosa bucal no se conoce con precisión, sin embargo, se ha insinuado que cualquier obstáculo proporcionado por esta capa parece ser insignificante al compararse con la acción de barrera del epitelio (10).

Debido a la presencia de tres glándulas salivares principales (submandibular, parótida, sublingual) y las glándulas salivales menores, la mucosa bucal se mantiene constantemente húmeda. Sin embargo, tanto la composición como la cantidad de saliva producida puede variar entre los individuos, con la hora del día, alimentos, estados de enfermedad y la terapia con diversos medicamentos, esto debe tenerse en cuenta al considerar la mucosa bucal como un sitio para la administración de fármacos ya que puede ser un factor biológico que influya en el proceso de absorción (10, 19, 23). El volumen total de la secreción salival diaria se encuentra entre 0.5 y 2.0 L, proporcionando así un volumen de líquido relativamente bajo disponible para la liberación del fármaco en comparación con el tracto gastrointestinal (1, 23). La presencia de saliva es importante para la absorción, ya que proporciona un ambiente relativamente acuoso para facilitar la liberación del fármaco, sin embargo, puede conducir a que este se trague de forma prematura antes de que se produzca la absorción efectiva a través de la mucosa, reduciendo la biodisponibilidad y eficacia del mismo (1, 19).

La presencia de enzimas digestivas puede conducir a la degradación de algunos fármacos, mientras que la permeabilidad puede verse incrementada en mucosas enfermas (29, 31, 32). En caso de una baja permeabilidad del fármaco a través del epitelio bucal, ciertos agentes conocidos como facilitadores de la permeación o *enhancers*, incrementan la magnitud del flujo del componente de interés; entre estos podemos mencionar: etanol, quitosano, ácidos grasos, tensioactivos y sales biliares. Según lo reportado en la literatura estos promotores químicos actúan por uno o más de

los siguientes mecanismos: (a) aumentar el coeficiente de reparto del fármaco, (b) extraer lípidos intercelulares, (c) interactuar con los dominios de proteínas epiteliales y (d) aumentar la retención de fármacos en la superficie de la mucosa bucal (12, 24, 33-38).

1.2.2 Permeación y administración de fármacos a través de la mucosa bucal

La barrera epitelial debe ser atravesada por el fármaco con el fin de alcanzar los sitios de acción deseados; de tal forma, la difusión de este a través del epitelio bucal se puede realizar mediante tres mecanismos: (I) Difusión pasiva incluyendo una vía transcelular o intracelular y una vía paracelular o intercelular, (II) Transporte mediado por portadores y (III) Endocitosis/exocitosis (1, 30, 39). La mayoría de los fármacos disueltos en los líquidos biológicos presentes en la zona de absorción, atraviesan las membranas por difusión pasiva de acuerdo con la ley de Fick (4, 20), presentándose en muy pocos casos la absorción por el proceso de endocitosis, donde las moléculas de fármaco son envueltas por las células y del mismo modo, es poco probable que los procesos de transporte activo operen dentro de la mucosa oral (27, 31, 39).

Considerando que la membrana de las células epiteliales tiene un carácter lipófilo esta puede suponer una barrera para permeantes hidrófilos polares, los cuales probablemente impregnan la mucosa bucal a través de la ruta paracelular, mientras que los compuestos hidrofóbicos lo hacen por la ruta transcelular (3, 11, 40, 41). Casi todos los compuestos pueden penetrar el epitelio, pero la magnitud, velocidad y la ruta por la que atraviesan la barrera dependerán de una serie de factores, entre los más destacados pueden citarse:

- Factores que dependen del fármaco: solubilidad, coeficiente de reparto, el pKa, siendo la forma no ionizada del fármaco más soluble en lípidos, velocidad de absorción, potencial de irritación, coeficiente de difusión a través del epitelio, estabilidad del fármaco, tamaño de la molécula (42-43).
- Factores biológicos: área de exposición, espesor del tejido, estructura de la mucosa oral, pH del entorno, transporte activo, la saliva, enfermedades asociadas, medicamentos consumidos (42-43).

- Factores que dependen del sistema de liberación: Características de los excipientes, características del proceso de liberación, tamaño, forma textura, potencial irritación y/o respuesta alérgica (42, 43).

La administración de fármacos a través de la vía bucal presenta ventajas potenciales respecto a otras vías de administración, entre ellas: reparación rápida del tejido, los medicamentos son auto-administrables, menor riesgo de una respuesta alérgica, lavado con saliva inferior al presentado por la vía sublingual, buena irrigación, evita el efecto de primer paso hepático, evita la acción del pH gástrico para moléculas que no son ácido resistentes, evita el efecto de la acción enzimática y microflora bacteriana presente en el tracto intestinal, la tasa de absorción del fármaco no está influenciada por los alimentos o velocidad de vaciado gástrico, posibilita la interrupción brusca del tratamiento o controlar el período de administración, útil como alternativa en la administración de fármacos cuando la vía oral es impracticable (dificultad de deglución, náuseas, etc.) y es una ruta atractiva de administración para pacientes pediátricos. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes como la limitada zona de absorción y las propiedades de barrera de la mucosa, por lo cual a veces se considera el uso de un promotor de absorción (4, 9, 29, 44).

Puesto que esta mucosa es ancha, plana y permanece relativamente inmóvil es adecuada para formulaciones planas esencialmente de liberación controlada, en la Tabla 1-2 se pueden observar algunos productos disponibles comercialmente destinados a la absorción transmucosa a través de la vía bucal. Las preparaciones mucoadhesivas bucales incluyen películas, tabletas, parches, y semisólidos (geles y pomadas); de tal manera que se ha observado cómo por medio de los excipientes y la tecnología empleada se han adaptado de manera eficiente formas de dosificación convencionales para la administración de fármacos por la mucosa bucal (43, 45).

Tabla 1-2: Ejemplos de productos disponibles en el mercado para el suministro sistémico de fármacos a través de la mucosa bucal (43).

Fármaco	Nombre del producto	Forma de dosificación
<i>Nicotina</i>	<i>Nicorette</i>	<i>Tableta, goma de mascar</i>
	<i>Nicotinell</i>	<i>Comprimido</i>
<i>Proclorperazina</i>	<i>Buccastem</i>	<i>Tableta</i>
<i>Andrógeno (testosterona)</i>	<i>Striant</i>	<i>Parche bucal</i>
<i>Miconazol</i>	<i>Tibozole</i>	<i>Tableta mucoadhesiva</i>
<i>Citrato de fentanilo</i>	<i>Actiq</i>	<i>Comprimido</i>

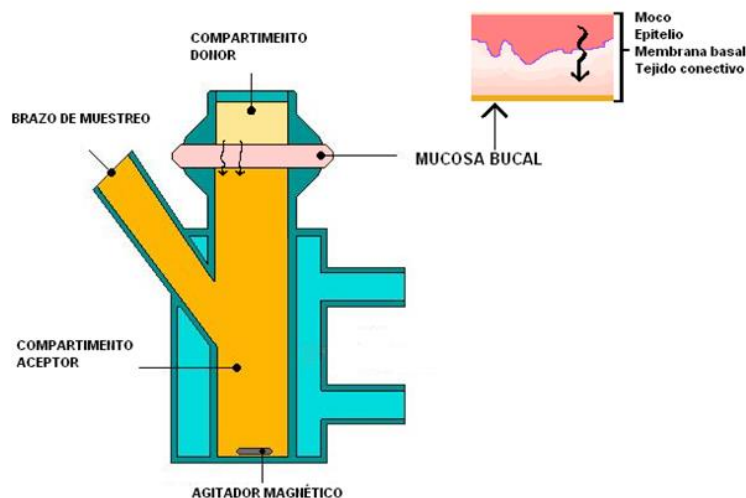
1.3 Evaluación *in vitro* de permeabilidad bucal

Ha existido una gran variedad de modelos utilizados en la fase preclínica para evaluar la permeabilidad de compuestos a través de la mucosa bucal; se ha considerado que los métodos *in vitro* e *in situ* son útiles como herramientas para el *screening* de nuevos fármacos, la elucidación de los mecanismos de transporte a través de la mucosa bucal y la evaluación de promotores de la penetración; mientras que se contempla que los métodos *in vivo* son más adecuados en la evaluación de la biodisponibilidad (10).

Debido a que se puede inspeccionar el proceso de difusión del compuesto de interés en un ambiente donde variables como: la temperatura, pH, integridad del tejido, entre otros, se pueden controlar fácilmente; los métodos *in vitro* se utilizan frecuentemente para evaluar la permeación de fármacos a través de la mucosa bucal (23, 46). Actualmente, se utilizan diferentes tipos de celdas de difusión que hacen posible determinar la cantidad real de fármaco que se difunde a través de la barrera de la mucosa, así como la velocidad de difusión del fármaco; entre las celdas utilizadas se encuentran las celdas de Franz, empleadas por primera vez para la determinación de la permeación bucal en 1987 por Kurosaki (10, 11, 47, 48).

En este sistema, la mucosa bucal se encuentra separando dos cámaras: una cámara donora donde se dispone el fármaco que entra en contacto con la cara exterior de la mucosa, y una cámara receptora, que simula el medio biológico con el que está en contacto la mucosa (Figura 1-3). Esta última es muestreada periódicamente para evaluar la cantidad de compuesto que ha penetrado el tejido en el tiempo y presenta una barra de agitación que mantiene en condiciones homogéneas la solución en el compartimiento. La temperatura del sistema se conserva a 37 °C mediante la colocación de la celda de difusión en un baño de agua caliente o debido a la presencia de una chaqueta de calentamiento en el compartimento receptor, a través de la cual recircula agua con la temperatura controlada (11, 30, 46).

Figura 1-3: Esquema de celda de Franz



*Adaptado de Obradovic T (11).

La elección de la membrana para la experimentación es fundamental debido a las diferencias en términos de permeabilidad, bioquímica y morfología que se ha presentado con el uso de tejido de diferentes animales en estudios similares. La mucosa bucal humana es un tejido altamente diferenciado, que presenta un epitelio no queratinizado, al

igual que el evidenciado en monos, perros y cerdos (10, 49). Debido a las similitudes histológicas de la mucosa bucal porcina con la humana y el bajo costo asociado con la adquisición del tejido; el cerdo se ha convertido en el modelo animal más utilizado en estas investigaciones (10, 11).

El medio receptor es importante porque pretende simular las condiciones del fluido biológico al que permearía la muestra en condiciones reales, sin interferir con la metodología analítica seleccionada para cuantificar o afectar la integridad de la membrana. Además, se debe garantizar que el proceso difusivo en la celda no esté limitado por las condiciones del ensayo (volumen de medio receptor y solubilidad en el medio), dado que, en la situación fisiológica real, el volumen del compartimento receptor que sería la sangre, es muy grande y no existe esta limitación. En otras palabras, se deben cumplir las condiciones *sink* en el ensayo, asegurándose que la cantidad máxima de analito que permea, no exceda el 10 o 20% del valor de solubilidad total de ese analito en ese medio (29, 42, 46, 50).

Tanto el volumen de la cámara receptora como la superficie expuesta deben ser medidos y registrados con precisión de manera individual, para poder determinar la cantidad de activo que permea a lo largo del tiempo (50). Se debe escoger un volumen adecuado para el compartimento receptor, de tal forma, que permita la cuantificación en todos los momentos del ensayo, y procurar la mayor precisión posible en los tiempos y volúmenes de muestreo. Existe una variación significativa en los resultados de los experimentos de permeación *in vitro* por el uso de membranas biológicas, por lo cual deben tomarse suficientes puntos de muestreo a lo largo del tiempo, para trazar una curva precisa, y que los parámetros cinéticos derivados de la misma sean lógicos (13, 22).

En este tipo de estudios es fundamental el desarrollo de procedimientos analíticos adecuadamente validados, con el fin de medir la cantidad de fármaco que ha atravesado el tejido, considerando que debe ser posible la detección de pequeñas cantidades. Por esta razón, la cuantificación mediante una técnica analítica como el HPLC resulta adecuada (47, 51).

Posterior a los ensayos de permeación, el tratamiento de datos involucra graficar la cantidad acumulada de fármaco permeado frente al tiempo y a partir esta información, determinar el flujo en el estado estacionario (J_{ss}) utilizando la Ecuación 1-1:

Ecuación 1-1: Flujo en estado estacionario (52, 53).

$$J_{ss} = \frac{dQ_r}{A dt}$$

Donde, dQ_r es la cantidad de fármaco transportado a través de la membrana dentro del compartimento receptor (μg), A es el área de difusión activa (cm^2) y dt es el tiempo de exposición (h) (53).

Conociendo el flujo en el estado estacionario, se calcula el coeficiente de permeabilidad de la siguiente manera (Ecuación 1-2):

Ecuación 1-2: Coeficiente de permeación (54, 55).

$$K_p = \frac{J_{ss}}{C_d}$$

Donde, J_{ss} es el flujo calculado en el estado estacionario ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) y C_d es la concentración de fármaco en el compartimento donador ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$) (54).

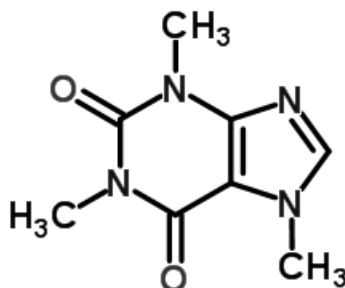
1.4 Cafeína

Se considera útil realizar estudios sobre la absorción bucal para identificar el perfil de absorción de los productos químicos cuyos perfiles de absorción transmucosa ya se encuentran bien establecidos; esto es sustancialmente importante si se están obteniendo los datos utilizando equipos nuevos o métodos diferentes a los manejados para generar datos que se puedan comparar o reportar a futuro. En el caso de absorción en piel,

directrices de la OCDE también estipulan que, con el fin de demostrar rendimiento y la fiabilidad de un sistema para predecir la absorción dérmica, se debe partir por realizar un ensayo con una sustancia de referencia, por lo cual, se asume para vías similares como el caso pertinente es prudente empezar por trabajar con una sustancia modelo como es la cafeína (56).

Químicamente, la cafeína es 1,3,7-trimetilxantina, un alcaloide del grupo de las xantinas y en estado puro es un polvo blanco muy amargo.

Figura 1-4: Estructura química de la cafeína.



Adaptada de Ashihara (57).

Solubilidad: Un gramo de cafeína anhidra se disuelve en alrededor de 50 mL de agua, 6mL de agua a 80°C, 75 mL de alcohol, 25 mL de alcohol a 60°C, cerca de 6 mL de cloroformo o 600 mL de éter; en la Tabla 1-3 se pueden ver sus propiedades fisicoquímicas. La cafeína es una base débil y su solubilidad en agua se incrementa por la presencia de ácidos orgánicos o sus sales alcalinas, como benzoatos, salicilatos, cinamatos o citratos (58).

Tabla 1-3: Propiedades fisicoquímicas de la cafeína (22).

<i>Solubilidad acuosa</i>	<i>21 mg/mL</i>
<i>pKa</i>	<i>14.0 a 25°C</i>
<i>Peso molecular</i>	<i>194.19 g/mol</i>
<i>logP</i>	<i>- 0.07</i>
<i>logD (pH 6.8)</i>	<i>- 0.07</i>

La cafeína es un estimulante leve y la sustancia psicoactiva más consumida en el mundo. Se encuentra en bebidas no alcohólicas, café, té, cocoa, chocolate y gran variedad de medicamentos de prescripción y de venta directa. Aumenta ligeramente la secreción de noradrenalina y estimula la actividad neural en múltiples regiones del encéfalo. La cafeína se absorbe bien por vía oral; la concentración máxima se alcanza a los 30-45 min de la ingestión y atraviesa con facilidad la barrera placentaria. Su semivida es de 3h y es metabolizada en un 90%. Se asume que muchos de los efectos de la cafeína se deben a antagonismo competitivo al nivel de los receptores de adenosina (59).

1.5 Metodología analítica

Siendo la cafeína el fármaco modelo a emplear en este estudio, el cual debe ser cuantificado a diferentes tiempos junto con diferentes condiciones, y resaltando que para el ensayo de permeación se requiere del empleo de una membrana biológica, es necesario contar con una metodología bioanalítica validada, acorde a planteado por la guía de la FDA (60), y otras guías (61, 62). En este caso particular fue usada como técnica analítica la cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Cualquier método analítico antes de ser utilizado debe ser validado, es decir, establecer la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados confiables y adecuados, a las especificaciones y los atributos de calidad requeridos. Las características de desempeño que pueden ser evaluadas durante el desarrollo de un método bioanalítico son: selectividad, linealidad, rango, reproducibilidad, precisión intermedia, exactitud, límites de detección (LD), límite de cuantificación (LC) y estabilidad (60, 61).

A continuación, se presenta la definición de cada uno de los parámetros mencionados, aclarando que la forma como estos se evalúan, el tratamiento de datos y las

especificaciones que se deben cumplir se explican detalladamente en el capítulo de *Materiales y métodos*.

- Selectividad

La selectividad, se define como la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en la presencia de otros componentes en la muestra (60).

- Linealidad y rango

El rango de un método analítico es el intervalo entre los límites de cuantificación superior e inferior para los cuales se ha demostrado que presenta un adecuado nivel de precisión, exactitud y linealidad. La linealidad de un procedimiento analítico es la habilidad, dentro de un rango dado, de obtener unos resultados directamente proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en la muestra (60, 61).

- Precisión

La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de un muestreo múltiple, de la misma muestra homogénea en determinadas condiciones.

Es la capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre sí. Se puede estudiar a tres niveles:

- ✓ Repetibilidad: Evalúa la precisión del método (precisión intraensayo).
- ✓ Precisión intermedia: Evalúa la precisión frente a variaciones de analista equipo y día (precisión intralaboratorio o precisión interensayo).
- ✓ Reproducibilidad: Evalúa la precisión entre laboratorios (precisión interlaboratorios) (61).

- Exactitud

Expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero, valor nominal, teórico o un valor de referencia y el valor encontrado experimentalmente (61).

- Límite de cuantificación y límite de detección

El límite de cuantificación (LOQ), es la concentración más baja de un analito que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas y el límite de detección (LOD) es la cantidad más baja de analito en una muestra que se puede detectar, pero no necesariamente como una cuantificación exacta (61).

- Estabilidad

La estabilidad de un fármaco en un fluido biológico es una función de las condiciones de almacenamiento, propiedades químicas del fármaco, de la matriz y del recipiente. Entendiéndose como la verificación de que la integridad química del analito en la matriz se mantiene bajo condiciones específicas por un tiempo determinado (60).

1.6 Algunos estudios previos sobre permeación bucal *in vitro*

Nicolazzo et al.(10), fueron uno los primeros en estudiar el efecto de varias condiciones *in vitro* en las características de permeabilidad de la mucosa bucal, utilizando la cafeína (CAF) como un modelo de permeación hidrófilo y estradiol (E2) como un modelo de permeación lipofílico. Estudios de permeación comparativos se realizaron con cámaras

Ussing en diferentes condiciones: mucosa de espesor total vs tejido epitelial, tejido fresco vs congelado, tejidos intactos vs tejidos dañados. La integridad del tejido se monitorizó mediante la absorción de isotiocianato de fluoresceína (FITC) marcado con dextrano 20 kDa (FD20) y la viabilidad del tejido se evaluó con MTT [3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio Bromuro] y examen histológico. Concluyeron: (I) la presencia de tejido conectivo redujo significativamente la permeación de CAF y E2, (II) la evaluación histológica demostró signos de muerte celular en el tejido congelado, afectando a componentes estructurales de los mismos, (III) FD20 impregnó el tejido dañado y esto se asoció con un aumento en el transporte de CAF, (IV) el tejido parecía permanecer viable durante un máximo de 12 h post mortem; sin embargo, en el estudio emplearon otro tipo de celdas, por lo que los resultados no son totalmente comparables con la presente investigación.

De manera similar, Kulkarni et al. (22), investigaron las contribuciones relativas del epitelio y tejido conectivo con las propiedades de barrera del tejido bucal porcino en estudios de permeación *in vitro*, utilizando antipirina, bupiriona, bupivacaína y cafeína como fármacos modelos y determinando la difusión de estos a través de la mucosa bucal con diferentes espesores. En este estudio no recomiendan el uso de dermatomo para separar los tejidos ya que requiere congelación previa, la cual puede comprometer las propiedades de barrera del epitelio. *In vivo*, los fármacos están disponibles para la absorción sistémica una vez se ha cruzado el epitelio, ya que los capilares se encuentran justo por debajo de él, para imitar estas condiciones y con fines prácticos, recomiendan se recorten los tejidos a 500 micras. Los mismos autores, estudiaron el efecto de la región de la mucosa, las condiciones de almacenamiento y la separación del tejido, en los estudios de permeación bucal *in vitro*. Concluyen que la permeabilidad de los fármacos era similar entre las mucosas bucales frescas y las mucosas almacenadas en *buffer* fosfato salino (PBS) a 4°C durante 6h o en Krebs-Ringer-Bicarbonato (KBR) a 4°C durante 24h; con evidencia de un aumento en la permeación cuando se utiliza la región detrás del labio respecto a la región de la mejilla. Por último, determinaron que la separación del epitelio del tejido conectivo subyacente por tratamiento térmico no afectó negativamente sus características de permeabilidad y de integridad (13) .

En 2011, Kulkarni et al.(63) , estudiaron el efecto de la temperatura en los experimentos *in vitro* de permeación bucal porcina, concluyendo que tanto la cámara donante como la cámara receptora deben ser mantenidas a una temperatura constante de 37°C para imitar las condiciones fisiológicas. Los resultados sugirieron que la mucosa bucal actúa como una barrera más fuerte frente a la difusión de fármacos hidrófilos.

El reciente estudio de Amores et al (64) ,evalúa el uso de DMSO y albúmina como agentes crioprotectores, comparándose parámetros de permeabilidad de clorhidrato de propranolol a través de la mucosa bucal porcina utilizando un sistema de celdas Franz. Se valoraron los efectos de la congelación sobre la permeabilidad del fármaco e igualmente se realizaron estudios histológicos. Además, se evaluó el uso de la determinación de la pérdida de agua transmucosa (TMWL) como un indicador de la integridad de la mucosa bucal, concluyendo que se requieren más investigaciones sobre la medición de TMWL como un método evaluador de este parámetro. Los resultados no mostraron diferencias entre el flujo de la mucosa fresca y congelada, sin embargo, se observó una diferencia estadísticamente significativa en la medida de TMWL entre estas. Es importante mencionar que hasta la fecha, no existen métodos estándar para evaluar la viabilidad o la integridad del tejido diseccionado (11).

De acuerdo a los aspectos teóricos explicados, cuando se investiga la mucosa bucal como ruta para el suministro de fármacos, es claro que los ensayos *in vitro* con celdas de Franz son empleados en el *screening* preclínico y la mucosa bucal porcina es la mejor membrana de estudio debido a sus características morfológicas similares a la mucosa bucal humana. Para la realización de dichos ensayos es necesario validar el método analítico correspondiente e implementar las condiciones que involucren tanto el manejo del tejido, como aquellas relacionadas con el sistema de las celdas de difusión ya que los resultados obtenidos influyen directamente en las decisiones del diseño y desarrollo de nuevas formulaciones, así como en la evaluación de la seguridad y eficacia de las mismas.

2. Objetivos

Objetivo general

- Contribuir a la implementación de un ensayo de permeación bucal *in vitro*, empleando cafeína como compuesto modelo.

Objetivos específicos

- Validar la metodología analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de cafeína en las condiciones del ensayo.
- Estudiar la influencia de algunas condiciones del ensayo sobre la evaluación de la permeación bucal de cafeína.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Equipos

Se empleó un cromatógrafo Shimadzu® (Kyoto, Japón), serie Prominence, equipado con una bomba binaria LC-6AD, detector de arreglo de diodos (DAD) SPD-M20A, horno CTO-20A, desgasificador DGU-20As y automuestreador SIL20-A. La columna cromatográfica empleada fue una, Kromasil® C₁₈, de 4.6 x 150 mm y 5 µm de tamaño de partícula, potenciómetro Hanna® referencia HI 2221 (E.U.), ultrasonido Cole-Parmer® modelo 8891 (E.U.), sistema de purificación de agua Direct-Q® (E.U.), equipo de filtración al vacío, balanza analítica (sensibilidad de 0.001 g y 0.0001g) marca Ohaus® serie Pioneer (E.U.), baño termostataado Lauda® (E.U.), micropipetas (10-100 µL y 100-1000 µL) marca Select BioProducts® (E.U.), plancha de agitación multipunto IKA® modelo RO 10 PS1 Werke (Alemania) y congelador de ultra-baja temperatura MDF-C8V1 Panasonic® (E.U.).

En los ensayos de permeación se utilizaron celdas de Franz marca PermeGear® (E.U.), con un área de difusión de 0.64 cm², y 5 mL de volumen en el compartimento receptor. En la separación de algunas mucosas empleadas en este trabajo se utilizó un dermatomo Aesculap-B.Braun modelo ACCULAN® 3Ti. Por medio del tewametro Courage+Khazaka® modelo TM 300 (Alemania) se evaluó la integridad de la membrana y el registro para el control histológico se realizó mediante un microscopio Nikon Eclipse E600 adaptado a una cámara digital Nikon Dxm 1200.

3.1.2 Reactivos

Cafeína estándar (99%) Sigma Aldrich (E.U, lote: SLB0505V), etanol 98% reactivo analítico Merck (Alemania, lote: K46066583-445), acetonitrilo grado HPLC Tedia (E.U., lote: 905154), solución de Krebs-Ringer-Bicarbonato marca Zen-Bio (E.U., lote: 010416),

fosfato de potasio monobásico Merck (Alemania, lote: AM0655773518), cloruro de potasio Chemi (E.U., lote:160331-511), cloruro de sodio J.T Baker (E.U., lote: t10c54), fosfato de sodio dibásico Chemi (E.U., lote: 160331-512), solución salina tamponada con fosfatos de Dulbecco marca Biowest (E.U., lote: S12315X0520), suero fetal bovino (E.U., lote: S12762S181B), agua grado HPLC, filtros 0.45 µm Millipore Corp (E.U.).

3.1.3 Material biológico

El presente trabajo involucró pruebas *in vitro*, en las cuales se utilizó tejido de mucosa bucal porcina, debido a que la revisión bibliográfica evidenció un robusto soporte científico que lo cataloga como el modelo más fiable y similar a la mucosa bucal humana (42, 65). El tejido utilizado en los diferentes ensayos fue procedente del Frigorífico Guadalupe (EFEGE), empleando cerdos con un peso comprendido entre 80 y 100 kg con una edad promedio de 4-6 meses

3.1.4 Consideraciones éticas

Los ensayos fueron llevados a cabo teniendo en cuenta los principios éticos consignados en la Ley 84 de 1989 y en las “Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud” establecidas en la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud (66).

La mucosa bucal porcina utilizada fue obtenida de animales sacrificados con fines comerciales en el frigorífico aprobado por la autoridad sanitaria competente y la disposición de los residuos biológicos se hizo de acuerdo a los protocolos de riesgo biológico establecidos en la Universidad Nacional de Colombia.

El desarrollo de este trabajo fue avalado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Acta N° 03 de 2016).

3.2 Metodología

3.2.1 Desarrollo del método analítico

3.2.1.1 Condiciones cromatográficas

Teniendo en cuenta estudios similares realizados previamente (22, 52, 67), se hicieron análisis preliminares para la determinación de la longitud de onda de máxima absorción para la lectura, la temperatura de la columna y la composición de la fase móvil (Anexo A). Igualmente se aclara la validación de la metodología se realizó posterior a la evaluación de las condiciones operacionales que se explicarán posteriormente en el texto. Se establecieron las siguientes condiciones: columna cromatográfica Kromasil® C₁₈, de 4.6 x 150 mm y 5 µm de tamaño de partícula, temperatura isocrática de 30°C, utilizando como fase móvil agua-acetonitrilo (80:20 v/v), flujo 1 mL/min, volumen de inyección 10 µL y longitud de onda 273 nm. Las soluciones que estuvieron en contacto con la mucosa se centrifugaron a una velocidad de 7000 rpm durante 6 minutos y se filtraron antes de inyectarse a través de filtros Millex (Millipore Corporation, E.U.) de 0.45 µm. Los datos se procesaron mediante el software LCsolution® versión 1.25.

3.2.1.2 Preparación de las muestras

Para evaluar las características de desempeño en la validación del sistema se preparó una solución madre de cafeína (SM-C) por triplicado de la siguiente manera:

50 mg de cafeína /100 mL (agua: etanol 80:20) = 500 µg/mL

A partir de estas soluciones se hicieron las diluciones para trabajar en un rango de 0.5 µg/mL a 50 µg/mL (Tabla 3-1).

En la validación del método se utilizó *buffer* fosfato salino (PBS) de pH 7.4 como medio de disolución; que estuvo en contacto con mucosa durante 4 horas a una temperatura de 37 °C, simulando las condiciones del ensayo. La mucosa empleada involucró epitelio y tejido conectivo, además de estar en un periodo de almacenamiento de 4 días en

condiciones del mercado (sin medio de almacenamiento, con proceso de congelación a -20°C).

Tabla 3-1: Niveles altos de concentración de las soluciones de trabajo para la validación de la metodología analítica

Nivel de concentración	1	2	3	4	5	6
Concentración (µg/mL)	0.5	2.5	5	10	25	50

3.2.1.3 Idoneidad del sistema

Previo al proceso de validación y durante la validación, se confirmó experimentalmente la idoneidad de la metodología analítica. Se realizó la inyección de 10 repeticiones de estándar de cafeína a una concentración de 10 µg/mL, con el fin de determinar los siguientes parámetros: tiempo de retención, factor de capacidad, altura de plato, número de platos teóricos y factor de asimetría.

3.2.2 Validación de la metodología analítica

La validación del método se realizó teniendo en cuenta los lineamientos establecidos por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), las normas de la Asociación Española de Farmacéuticos y el manual —Guidance for Industry – Bioanalytical method validation de la FDA (60-62), analizando las siguientes características de desempeño: selectividad, linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, límite de detección, límite de cuantificación y estabilidad. Cada uno de estos parámetros fue evaluado para confirmar con evidencia documental que el procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad a la cuantificación de cafeína empleando cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos en las condiciones del ensayo previsto.

- **Selectividad/Especificidad**

Para establecer la selectividad del método, se analizaron los diferentes componentes de la fase móvil, los medios de almacenamiento y 10 muestras blanco de matriz de diez mucosas porcinas de procedencia distinta que no estuvieron en contacto con el compuesto modelo obtenidas de diferentes animales. Se espera no observar interferencias respecto a la solución de cafeína correspondiente a la concentración determinada como límite de cuantificación (LOQ) en la validación del sistema y método (2.99 y 2.69 ng/mL respectivamente), teniendo como criterios de evaluación el tiempo de retención (t_r), la similitud de los espectros de absorción molecular (EAM), la pureza de pico, las curvas de similaridad, los isogramas y topogramas, que el equipo suministra.

Las soluciones blanco de las diferentes matrices recolectadas, se montaron por separado en las celdas de Franz a una temperatura de 37 °C, con PBS a pH de 6.8 en la cámara donante y a pH de 7.4 en la cámara aceptora. Dichas mucosas fueron sometidas a procesos de congelación y refrigeración, almacenadas por 4 días posteriores al sacrificio; una vez pasadas las 4 horas de duración del ensayo se tomó una alícuota de 500 μ L de las cámaras aceptora y donora, respectivamente.

- **Linealidad**

La linealidad del sistema y del método se verificaron mediante la realización de la curva de calibración con seis concentraciones diferentes de analito, las cuales fueron preparadas por triplicado a partir de la dilución de las tres SM-C explicadas previamente, en un rango de 0.5 a 50 μ g/mL. La evaluación de la linealidad se hizo a través del análisis de varianza (ANOVA) para la regresión. El estadístico t de Student se usó para evaluar la pendiente y el intercepto, asumiendo una confianza del 95% (61).

- **Precisión**

La precisión fue determinada a través de la evaluación de la repetibilidad (intradía) y de la precisión intermedia (interdías). La repetibilidad se estimó mediante análisis por

triplicado de tres niveles de concentración (0.5, 10 y 50 µg/mL) en el mismo día, con el mismo analista y con el mismo equipo. La precisión intermedia se determinó en tres días y con dos analistas, utilizando tres concentraciones del analito (0.5, 10 y 50µg/mL).

La repetibilidad se evaluó a través del coeficiente de variación promedio ponderado (RSDp), obtenido a partir del test de Cochran, el valor de aceptación para el método en cada nivel debe tener $C.V \leq 15\%$ (61). La precisión intermedia se evaluó mediante un ANOVA empleando una confianza del 95%.

- **Exactitud**

Se calculó mediante comparación de las pendientes de las curvas de calibración del sistema y del método, evaluando de esta manera todo el rango lineal. Como criterio de aceptación para este parámetro se fijó un porcentaje de recuperación (%R) entre 95% a 105%, considerando la complejidad de la matriz de la muestra (62).

- **Límite de detección y cuantificación**

Para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación se prepararon curvas de calibración a bajas concentraciones respecto a las utilizadas en el estudio de linealidad, empleando cuatro niveles de concentración (0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 µg/mL), con seis réplicas a cada nivel.

El límite de detección (Ecuación 3-1) y límite de cuantificación (Ecuación 3-2) se calcularon mediante los resultados obtenidos para la linealidad y los resultados de una curva de calibración a bajas concentraciones.

Ecuación 3-1: Límite de detección (62).

$$LOD = \frac{|a| + 3Sa}{b * \sqrt{n}}$$

Ecuación 3-2: Límite de cuantificación (62)

$$LOQ = \frac{|a| + 10S_a}{b * \sqrt{n}}$$

donde: S_a = desviación estándar del intercepto a bajas concentraciones, a = intercepto a bajas concentraciones, y b = pendiente de la curva de calibración a altas concentraciones.

- **Estabilidad**

La estabilidad del analito fue evaluada por triplicado a dos niveles de concentración (0.5 y 25 µg/mL) de la siguiente manera:

- En un periodo de permanencia en el automuestreador y a la temperatura del mismo (24-25°C), en tres momentos diferentes: recién preparada, luego de 6 horas y finalmente a las 24 h.
- En condiciones de almacenamiento a 4°C, en cuatro ocasiones diferentes (semana 1, 2, 3 y 4); los resultados se compararon con los valores encontrados inicialmente (semana 1); esto permite valorar la estabilidad del analito con base en el tiempo estimado de permanencia a temperatura de refrigeración y tener en cuenta la estabilidad del analito después de diferentes ciclos de enfriamiento – temperatura ambiente (21°C).
- En la matriz luego de someterse a las condiciones empleadas con las celdas de Franz (37 °C durante 4 horas).

Como criterio de aceptación se consideró que los resultados de las muestras de estabilidad debían estar dentro del 15% de las concentraciones nominales (60).

3.2.3 Evaluación de la influencia de algunas condiciones del ensayo sobre el estado de la membrana y el comportamiento de permeación de la cafeína a través de la misma.

Con el fin de implementar el ensayo de permeación bucal, dentro del Grupo de Investigación, empleando la cafeína como compuesto modelo se partió de información bibliográfica disponible que fue evaluada en sus diferentes condiciones, por triplicado.

3.2.3.1 Condiciones evaluadas

- **Asociadas a la técnica de separación del tejido**

Teniendo en cuenta las recomendaciones de diversos estudios (13, 22, 42), se llevó a cabo la evaluación de la separación de los tejidos por tres métodos: bisturí, calor y dermatomo, para las diferentes condiciones de almacenamiento. A partir de cerdos recién sacrificados, se realizó la extracción manual de la mucosa bucal del animal. Posteriormente, se hizo una limpieza y acondicionamiento de la misma, separando la piel, el tejido glandular, entre otros. Para asegurar que las muestras fueran reproducibles, se tomó siempre mucosa bucal no queratinizada de la misma región posterior de la mejilla.

La mayoría del tejido conectivo subyacente se eliminó con la ayuda de un escalpelo y tijeras quirúrgicas, los cortes por medio de bisturí se realizaron a un espesor uniforme de aproximadamente 500 micras. La separación con método de calor se efectuó sumergiendo los tejidos en solución salina (0.9% NaCl) a 60°C durante un (1) minuto.

En la literatura no se recomienda el uso de dermatomo ya que el proceso puede requerir congelación previa del tejido y comprometer las propiedades de barrera del epitelio (13). Sin embargo, se realizaron pruebas con este método de separación con el fin de confrontar las otras técnicas, determinar si se podían realizar el corte sin necesidad de un proceso previo de congelación y observar si era posible establecer una alternativa de separación que no dependiera principalmente de las habilidades del investigador, de tal

forma que se hicieron cortes de 500 micras al igual que las realizadas por medio del bisturí (22). El espesor de los tejidos fue medido con un calibrador digital y registrado, para posteriormente hacer el montaje de la mucosa en las celdas de Franz.

- **Asociadas a los medios empleados, al tiempo y a la temperatura de almacenamiento**

Con el fin de evaluar las condiciones y el tiempo de almacenamiento de la membrana (tejido de mucosa oral de cerdo), a corto plazo, se emplearon dos medios de almacenamiento: *buffer* fosfato salino (PBS) y krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB) a una temperatura de 4°C durante 2, 6, 12 y 24 horas, considerando las condiciones sugeridas en la literatura (13, 68). Además, se utilizaron tejidos obtenidos en condiciones de mercado, es decir sometidos a procesos de congelación, almacenados por 4 días posteriores al sacrificio sin el uso de medio de conservación. El control de referencia en todos los ensayos fue tejido fresco de animales recién sacrificados.

Con el fin de evaluar la conservación de la mucosa bucal porcina a largo plazo y con base en la revisión bibliográfica previa (64, 69, 70), se probaron dos medios de criopreservación que consistieron en: A) una mezcla de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% en combinación con un 50% de suero fetal bovino (SFB) y un 40% de *buffer* fosfato salino (PBS), y B) DMSO al 10%, con un 50% de suero fetal bovino y un 40% de solución salina tamponada con fosfatos de Dulbecco (DPBS). Las soluciones empleadas estaban aproximadamente a 4°C antes de su utilización, luego se sumergieron los tejidos en el medio crioprotector y se almacenaron a -80°C durante 15 días y un mes. La descongelación se realizó con PBS almacenado a 4°C, durante 15 minutos y posteriormente los tejidos se lavaron por inmersión en PBS durante 10 min, con una agitación suave (50 rpm); se repitió este último procedimiento dos veces cambiando el medio.

Finalmente, se llevó a cabo el registro de la pérdida de agua transmucosa (TMWL), el ensayo de permeación con las celdas de Franz y el control histológico para verificar así la funcionalidad y vitalidad del tejido, como se presenta a continuación.

3.2.3.2 Variables respuesta empleadas para evidenciar la influencia de las condiciones estudiadas

- **Evaluación de la integridad de la membrana**

Uno de los métodos empleados para evaluar la función de barrera en la piel es el de la determinación de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL), que permite establecer el gradiente de evaporación del agua indirectamente por dos pares de sensores (temperatura y humedad relativa); de tal forma que cuando se ve afectada la integridad el registro de la evaporación se verá aumentado. De acuerdo con la literatura esta técnica puede ser utilizada para confirmar la función de barrera de la mucosa bucal, denominándose pérdida de agua transmucosa (TMWL). Esta última se estima podría ser más operativa y práctica que métodos alternativos como el isotiocianato de fluoresceína marcado con dextrano con peso molecular de 20 kDa (FD-20) (42, 64).

La evaluación con el método de determinación de la pérdida de agua transmucosa (TMWL), se realizó antes de comenzar cada ensayo de permeación *in vitro*; de esta manera aquellas mucosas que no presentaban una adecuada integridad se descartaban, esto teniendo como referencia un valor de punto de corte expresado en valor absoluto ($TMWL=g/h/m^2$) que se estableció experimentalmente. De igual manera, al finalizar cada ensayo se volvió a tomar la medida de TMWL, para tener un registro de la pérdida de la integridad en el proceso de obtención de las muestras.

El valor de punto de corte se determinó a partir de las medidas obtenidas de las mucosas de quince (15) cerdos recién sacrificados. El proceso consistió en colocar las mucosas en celdas de Franz termostatadas a 37°C, una vez acondicionado el tejido se realizó la media durante 30 segundos, para posteriormente comparar los valores obtenidos

inicialmente con los valores de los tejidos perforados después de manera intencional con una aguja (6 agujeros).

- **Estudio de permeación transbucal *in vitro***

En este trabajo, se emplearon celdas de Franz con un área de difusión de 0.64 cm², y 5 mL de volumen en el compartimento receptor, las cuales se ubicaron sobre una plancha de agitación multipunto. La celda de difusión de tipo Franz consta de un compartimiento superior (donor) y de un compartimiento inferior (receptor), separados por la membrana de difusión, la cual permaneció fijada durante los ensayos mediante unas pinzas, a una temperatura constante de 37 °C para imitar las condiciones *in vivo* (63).

Los tejidos fueron equilibrados con PBS (pH 7.4) durante 15 minutos antes de comenzar cada ensayo. En cuanto a los experimentos de permeabilidad, estos se llevaron a cabo utilizando un *buffer* fosfato salino de pH 7.4 en la cámara de receptora y concentraciones conocidas de solución permeante a pH 6.8 en la cámara donora para imitar las condiciones *in vivo* de pH fisiológicos (63); tales medios se filtraron y desgasificaron antes de cada experimento.

Agitación

La perfecta homogenización de la concentración de fármaco en la solución receptora se consigue mediante la agitación de la misma por una barra magnética cubierta de teflón, introducida en el compartimento receptor y que es movida por medio de una plancha de agitación multipunto, en este caso se utilizó una velocidad de 400 rpm basado en estudios previos realizados en el laboratorio (71).

Para asegurar que la agitación empleada fuera adecuada, se realizaron pruebas por triplicado con celdas de Franz en las condiciones fijas de temperatura (37°C) y muestreo. Para ello, se añadió azul de metileno en dispersión al compartimento donador y se empleó una membrana de acetato de celulosa (12000 D) ubicada entre los compartimentos donador y receptor, previamente hidratada durante 15 minutos. Lo anterior con la finalidad

de verificar que la agitación mantuviera homogéneo el fluido receptor (PBS de pH 7.4) y que no se originaran vórtices o burbujas.

Concentración de la cafeína en la cámara donora

Se trabajó en condiciones de dosis infinita, por un lado, teniendo en cuenta las diferencias entre el volumen y características de las celdas con las que se realizaron investigaciones previas, y por otro, teniendo en cuenta el volumen de las celdas disponibles en el laboratorio en el cual se realizaron los ensayos. Para lograr esto se ejecutaron pruebas por triplicado adicionando 500 μ L de solución en la cámara donora a dos niveles de concentración (15 y 20 mg/mL), elegidas de acuerdo a una revisión de la literatura previa (22, 63) y empleando mucosa fresca separada con bisturí a 500 μ m. Se eligió aquella concentración que respetara las condiciones *sink* y presentara los mejores resultados en términos de flujo en estado estacionario, coeficiente de permeabilidad y cantidad acumulada a las 4 horas.

Tiempo del ensayo y manejo de las muestras

Los ensayos de permeación se realizaron por un periodo de 4 horas, tomando una alícuota de 500 μ L de la cámara receptora a diferentes tiempos fijados con pruebas preliminares (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4 horas); estas muestras se almacenaron posteriormente a 4°C o -80 °C según las condiciones a evaluar y se centrifugaron a una velocidad de 7000 rpm durante 6 minutos para posteriormente ser filtrados. El volumen extraído fue repuesto con igual volumen de solución receptora fresca a 37°C.

3.2.3.3 Análisis de los datos

Una vez realizada la cuantificación de la cafeína a partir de las muestras tomadas a cada tiempo, mediante el método analítico previamente validado, se graficó la cantidad acumulada de fármaco permeado frente al tiempo y se determinó: el flujo en el estado

estacionario, el coeficiente de permeabilidad y la cantidad acumulada a las 4 horas (Q_4). Con los resultados obtenidos derivados de estos cálculos y los determinados de la evaluación de la integridad de la membrana, se realizaron los análisis estadísticos para determinar si se presentaban diferencias estadísticamente significativas entre los controles de referencia con tejidos frescos de animales recién sacrificados y cada una de las condiciones evaluadas.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa R versión 3.2.1 y Excel Microsoft Office 2016®. Las diferencias estadísticas de los parámetros de permeabilidad y pérdida de agua transmucosa para las diferentes variables experimentales se determinaron mediante el análisis de varianza (ANOVA), a un nivel de $p < 0.05$. La comparación de la pérdida de agua transmucosa (TMWL) en tejidos intactos y perforados intencionalmente, se hizo mediante la prueba t con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

3.2.3.4 Evaluación histológica de los tejidos

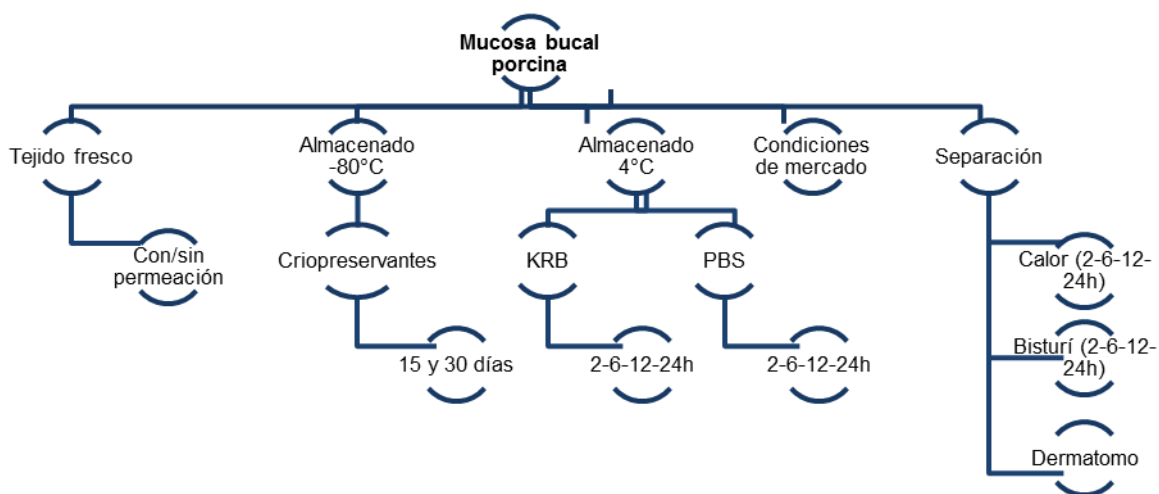
Se realizaron estudios histomorfológicos a los tejidos bucales porcinos para evaluar los cambios patológicos que se pudieran producir en la morfología celular y la organización del tejido después de los experimentos de permeabilidad, empleando microscopía óptica.

Se tomó un fragmento de cada muestra de tejido para sumergirlo, inmediatamente terminado el ensayo de permeación, en formalina neutra estabilizada al 10%. Luego este se llevó a un procesador automático de tejidos en donde ocurre la deshidratación por medio de baños de alcohol a concentraciones crecientes, seguido por la fase de aclaramiento con Xilol e impregnación con parafina. Posteriormente, las muestras fueron embebidas en parafina y con ayuda de un micrótopo se obtuvieron cortes histológicos que se colocaron en láminas portaobjetos y fueron teñidos con hematoxilina y eosina. El procesamiento y análisis de las muestras se realizó con el apoyo del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

A los tejidos se les hizo un registro fotográfico por medio de un microscopio Nikon Eclipse E600 adaptado a una cámara digital Nikon (digital camera Dxm 1200), empleando el software Nikon Act1; las fotos se tomaron con aumentos de 4x y 10x.

En el estudio se incluyeron: controles en blanco, es decir muestras no sometidas a la fase experimental y controles de permeación que hace referencia a tejidos sometidos a los ensayos con celdas de Franz. De igual forma se consideraron muestras con diferentes tipos de técnicas de separación de tejidos, con diferentes condiciones de medio, tiempo y temperatura de almacenamiento, como se observa en la Figura 3-1.

Figura 3-1: Esquema de muestras analizadas en el control histológico



Las observaciones realizadas a partir del estudio histológico, junto con la determinación de la pérdida de agua transmucosa y los resultados de permeación *in vitro* se examinaron para determinar en qué medida los medios de almacenamiento, diferentes tiempos y métodos de separación de tejidos, pueden contribuir a la variación de la permeabilidad del fármaco modelo.

4. Resultados y discusión

4.1 Estandarización de la metodología cromatográfica

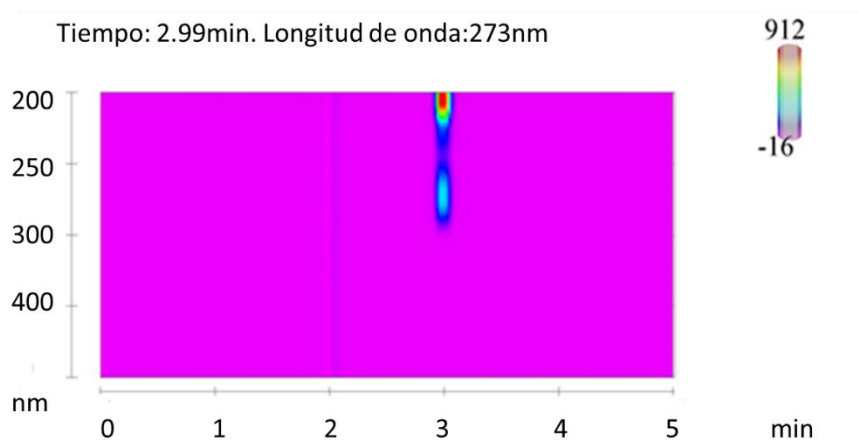
El desarrollo del método cromatográfico se basó en estudios similares reportados en la literatura para la cuantificación de cafeína (67, 72); de tal forma se emplearon las condiciones cromatográficas que se describen en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1: Condiciones cromatográficas empleadas.

Columna: Kromasil® 5 μm, C₁₈ (4.6 x 150 mm)	
Espectro de absorción: 273 nm para una solución de cafeína de 10 μg/mL	
<i>Fase móvil</i>	Agua-Acetonitrilo (80:20 v/v)
<i>Flujo</i>	1 mL/min
<i>Temperatura</i>	30 °C
<i>Tiempo de corrida cromatográfica</i>	8 min
<i>Volumen de inyección</i>	10 μ L

La longitud de onda de máxima absorción (λ max) de la cafeína en las muestras biológicas fue de 273 nm y se determinó empleando el EAM y el isograma (Figura 4-1) de una muestra a una concentración de 10 μ g/mL.

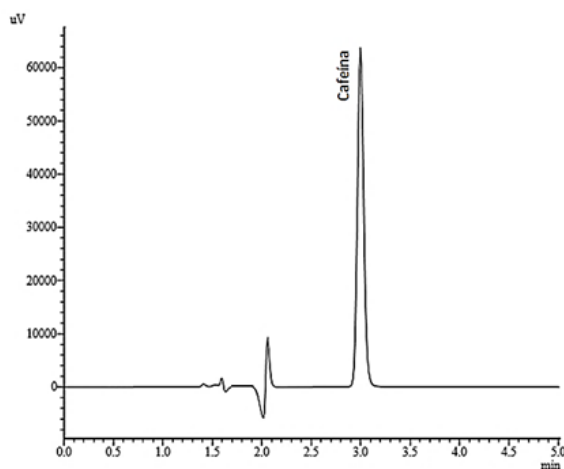
Figura 4-1: Isograma obtenido para cafeína (10 µg/mL).



* Datos procesados con el software LCsolution®

Tal como se observa en la Figura 4-2, con la metodología cromatográfica empleada se logró la elución rápida del analito, evitando problemas de “tailing” en el pico.

Figura 4-2: Cromatograma de cafeína (10 µg/mL)



* Obtenido a una longitud de onda de 273 nm con una columna Kromasil® 5 µm, C18 (4.6 x 150 mm). Datos procesados con el software LCsolution®

4.2 Idoneidad del sistema

Se verificó experimentalmente la idoneidad del sistema analítico, utilizando el sistema cromatográfico mencionado con anterioridad. Como parámetros de idoneidad, se evaluaron: tiempo de retención, el factor de capacidad, altura de plato, el número de platos teóricos y el factor de asimetría.

Los cálculos de la idoneidad del sistema cromatográfico se realizaron por medio del software LCsolution® obteniendo los resultados que se discuten a continuación:

- **Tiempo de retención (t_r):**

Se considera como el tiempo transcurrido desde el momento de la inyección de la muestra, hasta el punto máximo del pico registrado, correspondiente al compuesto separado (73). El tiempo de retención correspondiente a la cafeína fue de 2.99 +/- 0.02 min.

- **Factor de capacidad (k'):**

Hace referencia al tiempo durante el cual cada compuesto es retenido por la columna (Ecuación 4-1).

Ecuación 4-1: Factor de capacidad (k') (62).

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

donde: t_0 es el tiempo muerto, y t_r es el tiempo de retención de la cafeína.

El factor de capacidad fue de 1.18. Se acepta como adecuado un factor de capacidad con valores superiores a 1 (62).

- **Número de platos teóricos (N) y altura de plato (H):**

El número de platos teóricos es una medida de la eficacia del sistema cromatográfico, que expresa el número de picos que pueden aparecer en el cromatograma por unidad de tiempo. Este parámetro se puede calcular (Ecuación 4-2) basándose en la relación entre el tiempo de retención y la anchura del pico cromatográfico, para lo cual se puede emplear la siguiente fórmula:

Ecuación 4-2: Número de platos teóricos (62).

$$N = 16 * \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2$$

Dónde:

t_r = tiempo de retención.

W_b = ancho de la base.

Se calculó un número de platos teóricos de 7725, por lo cual se cumple con las especificaciones considerando se aceptan valores superiores a 2000 (62).

La altura de plato también está relacionada con la eficiencia, ya que un sistema es más eficiente entre menor sea la altura del plato y mayor sea el número de platos teóricos, se calculó mediante la Ecuación 4-3.

Ecuación 4-3: Altura de plato (H) (74).

$$H = L/N$$

Siendo: L la longitud de la columna y N es el número de platos teóricos

La altura de plato calculada fue 0.019 mm; lo que sumado al valor del número de platos teóricos confirmó la adecuada eficiencia del sistema utilizado.

- **Factor de asimetría (T):**

El factor de asimetría es una medida de la asimetría de la señal generada por el analito. Se considera un pico perfectamente simétrico cuando tiene un factor de 1.0 y como norma general se aceptan valores de hasta 2.0 (Ecuación 4-4) (62).

Ecuación 4-4: Factor de asimetría (T) (62).

$$T = \frac{W_{0.05}}{2F}$$

Donde:

$W_{0.05}$ = ancho de pico al 5% de la altura del pico.

F = distancia entre la perpendicular trazada desde el máximo del pico y el frente al 5% de la altura del pico.

El factor de asimetría fue de 1.2, por tanto, se considera como aceptable.

Todos los valores hallados satisfacen los requerimientos establecidos (Tabla 4-2), por lo cual se consideró que el sistema cromatográfico fue idóneo en las condiciones propuestas y se puede utilizar para la validación de la metodología y el análisis del compuesto de interés.

Tabla 4-2: Resultados de la idoneidad del sistema

Parámetro	Valor obtenido	C.V*	Criterio de aceptación
<i>Factor de asimetría</i>	1.2	0.4	< 2
<i>Factor de capacidad</i>	1.2	1.9	> 1
<i>Número de platos teóricos</i>	7725	3.2	> 2000

*C. V: Coeficiente de variación.

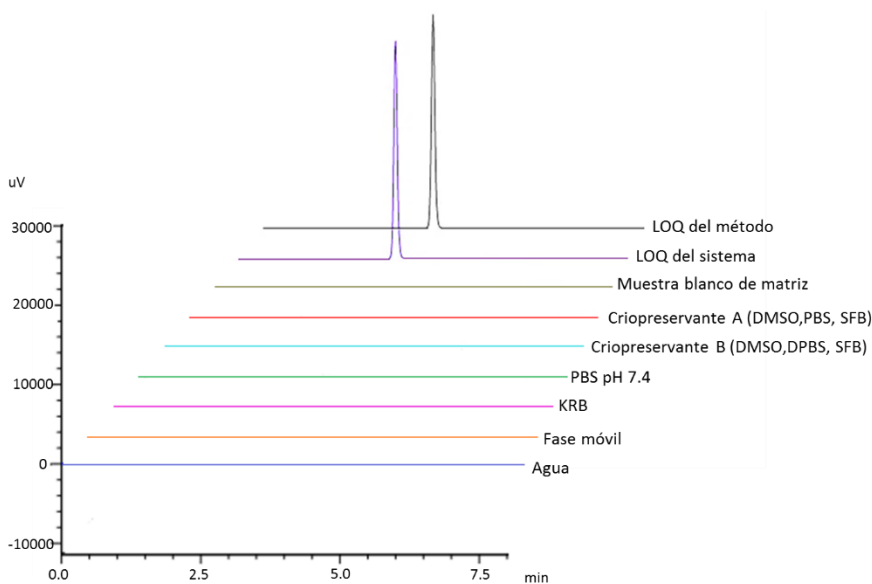
4.3 Validación de la metodología analítica

Todos los datos obtenidos para evaluar las características de desempeño se encuentran consolidados en las tablas debidamente identificadas en el Anexo A. Los resultados de cada parámetro evaluado se describen a continuación.

4.3.1 Características de desempeño

4.3.1.1 Selectividad/Especificidad

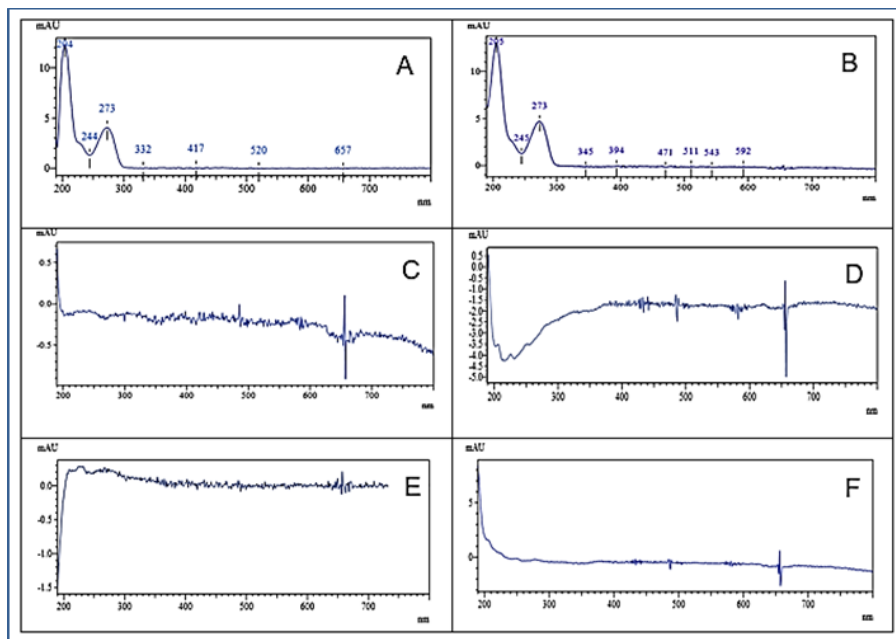
Para evaluar la selectividad del método, se compararon los resultados cromatográficos de las réplicas de las matrices blanco con mucosa oral porcina (sin presencia de cafeína), obtenidas de la cámara donora y receptora, los diferentes componentes de la fase móvil, los medios de almacenamiento y la solución de cafeína perteneciente al límite de cuantificación (2.99 y 2.69 ng/mL) de la validación del sistema y método, respectivamente. Como se observa en la Figura 4-3, los cromatogramas no muestran interferentes en el tiempo de retención de la cafeína, por lo tanto, cumple con este criterio de aceptación.

Figura 4-3: Cromatogramas de la evaluación de selectividad.

*LOQ: Limite de cuantificación, PBS: Buffer fosfato salino, KRB: Krebs-Ringer-Bicarbonato. Datos procesados con el software LCsolution®

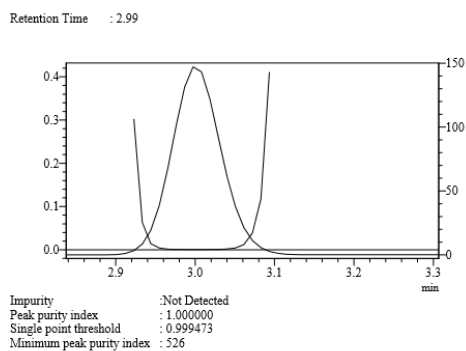
Adicionalmente, se analizó si los solventes, muestras blanco de matriz y medios de almacenamiento absorbían a la λ_{\max} del analito, demostrándose que no tienen incidencia en la cuantificación de la cafeína y verificando la similitud de los EAM y la pureza del pico, entre la lectura del límite de cuantificación (LOQ) correspondiente al sistema y al método (Figura 4-4 y 4-5).

Figura 4-4: Espectros UV: (A) LOQ del sistema, (B) LOQ del método, (C) Fase móvil, (D) KRB, (E) PBS, (F) Muestra blanco matriz.



*LOQ: Limite de cuantificación, PBS: Buffer fosfato salino, KRB: Krebs-Ringer-Bicarbonato. Datos procesados con el software LCsolution®.

Figura 4-5: Pureza del pico de cafeína en el método.

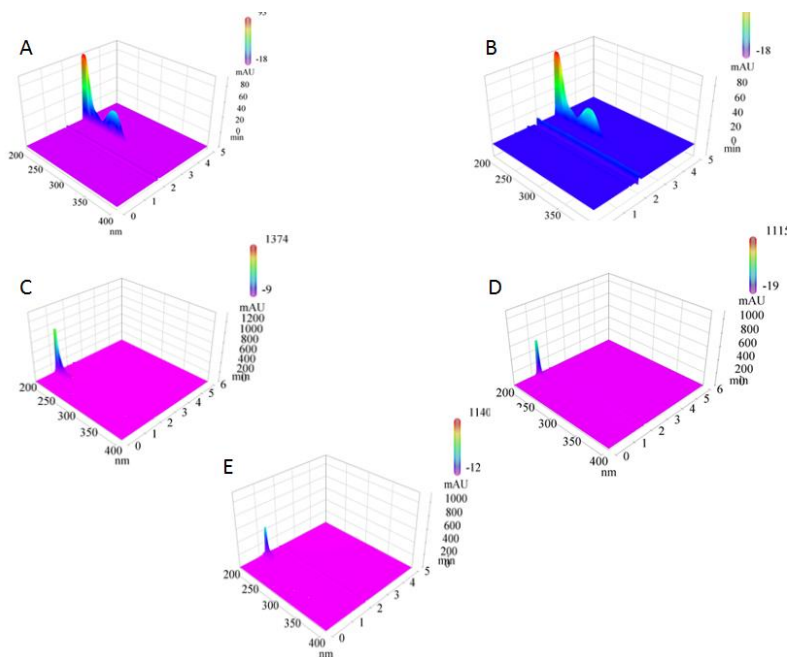


* Datos procesados con el software LCsolution®

A partir de los resultados expuestos (Figura 4-5), se encontró que el pico tiene un índice de pureza ≥ 0.999 y la curva de similitud no se cruzó con la curva umbral (determinación visual), indicando que no se presentan impurezas y, por tanto, a través de la metodología empleada es posible alcanzar una señal que corresponde inequívocamente al analito de interés sin presencia de interferencia por co-elución de otros componentes de la matriz.

La selectividad de la metodología también puede ser complementada con el estudio de los topogramas obtenidos del DAD (Figura 4-6), en donde gracias a su conformación tridimensional se puede comprobar a través de la corrida cromatografía en un rango de longitudes de onda, que en el tiempo de retención de la cafeína únicamente está presente dicha sustancia sin presencia de ningún interferente que coeluya al tiempo de retención del analito de interés.

Figura 4-6: Topogramas obtenidos por HPLC-DAD para: A) LOQ método. B) LOQ sistema. C) Muestra blanco matriz. D) PBS. E) KRB.



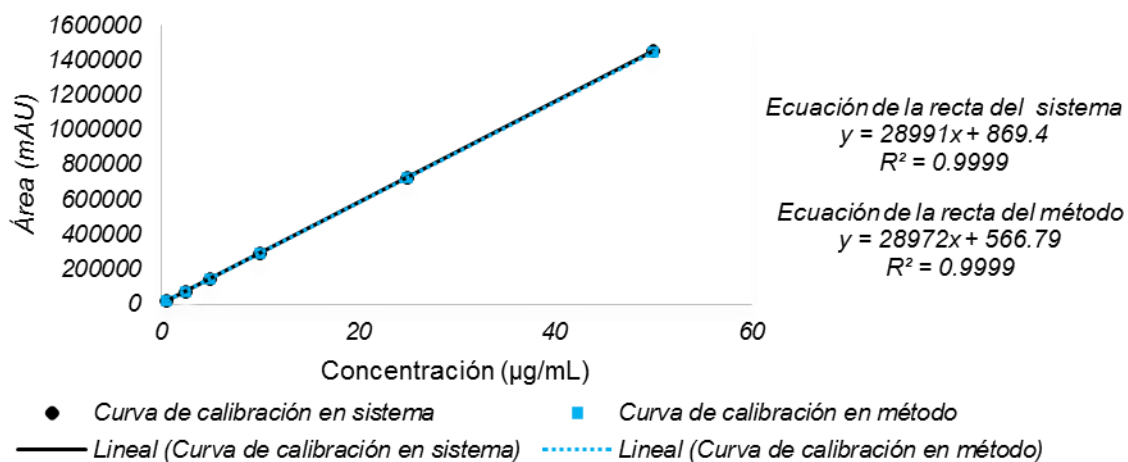
*LOQ: Limite de cuantificación, PBS: Buffer fosfato salino, KRB: Krebs-Ringer-Bicarbonato.

Cumpliendo con los criterios anteriormente descritos, se concluyó que el método es selectivo.

4.3.1.2 Linealidad

La linealidad del sistema y del método, se estudiaron para seis niveles de concentración (entre 0.5 y 50 µg/mL), realizando tres réplicas de cada una, tal como lo establecen los lineamientos de la ICH. En la Figura 4-7, se presentan las curvas de calibración (relación de áreas vs concentración) del sistema y del método, en las cuales se puede observar un coeficiente de correlación de 0.9999 indicando un alto grado de relación entre la variable x (concentración), y la variable y (respuesta).

Figura 4-7: Curvas de calibración para el sistema y para el método



Se realizaron pruebas de hipótesis para el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación de las curvas de calibración mediante el estadístico t de Student, (Tabla 4-3). El test para el intercepto en el sistema y método arrojó un t estimado < t tabulado, por tanto, no se rechazó H_0 , afirmando que la recta presenta un intercepto con el eje Y que

no es significativamente diferente de cero y una convergencia al origen. Con respecto a las pendientes se encontraron valores experimentales de t mayores a los tabulados, por consiguiente, se rechazó H_0 , es decir, las pendientes fueron significativamente diferentes de cero. La prueba de hipótesis para el coeficiente de correlación exhibió un t experimental $>$ t tabulado, lo cual llevó a rechazar H_0 , asumiendo que hay correlación significativa entre las dos variables, concentración (X) y área bajo la curva (Y) con un nivel de confiabilidad del 95%, mostrando que los datos experimentales se ajustan al modelo de regresión lineal.

Tabla 4-3: Prueba t para evaluar la linealidad del sistema y del método.

	Parámetro	H_0	t estimado	t tabla	Criterio
Sistema	Intercepto	$a=0$	0.43	2.1199	No se rechaza H_0
	Pendiente	$b=0$	337.30	2.1199	Se rechaza H_0
	Correlación	No existe correlación entre X-Y	168.65	2.1199	Se rechaza H_0
Método	Intercepto	$a=0$	0.30	2.1199	No se rechaza H_0
	Pendiente	$b=0$	357.45	2.1199	Se rechaza H_0
	Correlación	No existe correlación entre X-Y	178.73	2.1199	Se rechaza H_0

Finalmente, se realizó un análisis de varianza para las curvas de calibración del sistema y del método, cuyos resultados se consignan en la Tabla 4-4.

Tabla 4-4: ANOVA de la regresión lineal para el sistema y el método, prueba de F.

	Parámetro	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F_o	F_t
Sistema	<i>Regresión</i>	1	4.58E+12	4.58E+12	113776.58	4.49
	<i>Error experimental</i>	16	643543530	40221470.60		
	<i>Desvío de linealidad</i>	4	94836755.20	23709188.80	0.52	3.26
	<i>Error puro</i>	12	548706775	45725564.60		
	<i>Total</i>	17	4.58E+12	2.69E+11		
Método	<i>Regresión</i>	1	4.57E+12	4.57E+12	127772.28	4.49
	<i>Error experimental</i>	16	572336540.40	35771033.78		
	<i>Desvío de linealidad</i>	4	89018024.44	22254506.11	0.55	3.26
	<i>Error puro</i>	12	483318516	40276543		
	<i>Total</i>	17	4.57E+12	2.69E+11		

Mediante el ANOVA se encontró en todos los casos para la regresión que F experimental fue mayor al F tabulado lo que demostró una regresión significativa para el sistema y para el método. El mismo test indicó un desvío de la linealidad no significativo (F experimental > F tabulado), ya que estadísticamente no hay dispersión de los resultados entre réplicas para las distintas concentraciones.

Lo anterior permite afirmar que, dentro de los rangos de concentración estudiados, tanto para el sistema como para el método, se obtuvo un comportamiento lineal.

4.3.1.3 Precisión

- **Repetibilidad**

Para evaluar la precisión intradía se tomaron muestras preparadas por triplicado a tres niveles de concentración: bajo de 0.5 $\mu\text{g/mL}$, medio de 10 $\mu\text{g/mL}$ y alto de 50 $\mu\text{g/mL}$, y se empleó el test Cochran, el cual indicó que tanto para el sistema como para el método no se rechaza la hipótesis de varianzas equivalentes, lo que sugiere que la varianza de los resultados es independiente de la concentración analizada. Tal como se evidencia en las Tablas 4-5 y 4-6, para cada uno de los casos se observó un valor de G_{exp} menor al G_{tab} , lo cual indica que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí, es decir, las varianzas de las concentraciones son homogéneas indicando que el factor concentración no influye en la dispersión de los resultados (62). Los RSD_p fueron considerablemente inferiores al valor máximo permitido, que es del 15%, lo que brinda un nivel de precisión confiable sobre las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo.

Tabla 4-5: Test de Cochran para la evaluación de la precisión del sistema.

	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		
	0.5	10	50
X	15954	292034.67	1448355.33
S	312.73	2155.11	3188.17
C.V (%)	1.96	0.74	0.22
		G_{exp}	0.68
		G_{tab}	0.8709
		RSD_p	1.21

* X = Promedio de las áreas, S= Desviación estándar, C.V (%)=porcentaje del coeficiente de variación, RSD_p : coeficiente de variación promedio ponderado.

Tabla 4-6: Test de Cochran para la evaluación de la precisión en el método.

	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		
	0.5	10	50
X	15815	289802	1447201.67
S	409.53	3212.21	6264.54
C.V (%)	2.59	1.11	0.43
		G_{exp}	0.79
		G_{tab}	0.8709
		RSD_p	1.64

*X = Promedio de las áreas, S= Desviación estándar, C.V (%)=porcentaje del coeficiente de variación, RSD_p : coeficiente de variación promedio ponderado

- **Precisión intermedia**

La precisión intermedia se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA) empleando un nivel de confianza del 95%, a partir de los tres niveles de concentración estudiados, para dos analistas, en tres días diferentes (Anexo A). El análisis de varianza, mediante un test F, mostró que los valores de F experimentales son menores a los F tabulados (Tablas 4-7 y 4-8), indicando que los resultados no presentan una diferencia estadísticamente significativa por cambio de analista o al realizar el análisis en diferentes días.

Tabla 4-7: Precisión intermedia y análisis de varianza del sistema.

FUENTE DE VARIACIÓN	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadro medio (CM)	F_o	F_t
Analista	1	4469189.35	4469189.35	1.03E-05	4.04 (1, 48, 0.05)
Días	2	682705646.80	341352823.40	7.86E-04	3.19 (2, 48, 0.05)
Réplicas	2	2688920.11	1344460.06	3.09E-06	3.19 (2, 48, 0.05)
Error	48	2.09E+13	4.35E+11		
Total	53	2.09E+13			

Tabla 4-8: Precisión intermedia y análisis de varianza del método.

FUENTE DE VARIACIÓN	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadro medio (CM)	F_o	F_t
<i>Analista</i>	1	1843396389	1843396389	4.38E-03	4.04 (1, 48, 0.05)
<i>Días</i>	2	119825541.40	59912770.68	1.42E-04	3.19 (2, 48, 0.05)
<i>Réplicas</i>	2	359055209.90	179527605	4.26E-04	3.19 (2, 48, 0.05)
<i>Error</i>	48	2.02E+13	4.21E+11		
<i>Total</i>	53	2.02E+13			

Con base en los lineamientos de la guía de la FDA para validación de Métodos Bioanalíticos, se cumple con la repetibilidad y la precisión intermedia, por lo cual se concluye que el método es preciso (60).

4.3.1.4 Exactitud

Por medio de la comparación de las pendientes de las curvas de calibración del sistema y del método, se evaluó todo el rango lineal, obteniendo un 99.9% de porcentaje de recuperación; por lo cual se estableció que la exactitud del método es correcta.

4.3.1.5 Límite de Detección y Cuantificación

Estos parámetros se calcularon utilizando las curvas de calibración para sistema y método y unas segundas curvas de concentraciones bajas en sistema y método, incluyendo 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 µg/mL (Anexo A).

Para determinar estos parámetros en la validación del sistema y método se procedió a comprobar la linealidad, precisión y exactitud a bajas concentraciones como se observa en las pruebas presentadas en el Anexo A. Los resultados obtenidos se consignaron en la Tabla 4-9, y fueron utilizados para calcular tanto el límite de detección como el límite de cuantificación, cuyos valores fueron de 0.93 y 0.85 ng/mL para el límite de detección en el sistema y método; y de 2.99 y 2.69 ng/mL para el límite de cuantificación del sistema y método, respectivamente.

Tabla 4-9: Datos para el cálculo del límite de detección y cuantificación.

	Curva de calibración a bajas concentraciones	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Sistema	$n=24$ Ecuación: $y = 31476x - 6.6667$ $Sa=41.883$	0.93	2.99
Método	$n=24$ Ecuación: $y = 31442x + 8.8333$ $Sa=37.426$	0.85	2.69

*LOD: Límite de detección, LOQ: Límite de cuantificación

4.3.1.6 Estabilidad

Con el fin de identificar y evaluar cualquier degradación significativa del analito en el desarrollo del ensayo de permeación *in vitro* o durante el almacenamiento al cual serán expuestas las muestras según los requerimientos del estudio, se realizaron pruebas de estabilidad sometiendo alícuotas tanto de la validación del sistema como del método a diferentes condiciones de tiempo y temperatura de almacenamiento; la totalidad de los datos obtenidos se encuentran consolidados en el Anexo A.

- **Estabilidad a corto plazo en el automuestreador (24 h a 24-25°C)**

Tres réplicas de una concentración baja (0.5 µg/mL) y alta (25 µg/mL), se mantuvieron de cero a veinticuatro horas a la temperatura del automuestreador (24-25°C) para posteriormente ser analizadas; este intervalo de tiempo se consideró prudente debido a las recomendaciones de la guía de la FDA (60) y a que con estas condiciones se puede simular el tiempo que las muestras pueden estar en el automuestreador.

En la Tabla 4-10, se observan los resultados obtenidos presentados como porcentaje de pérdida o ganancia, respecto a la lectura de las muestras recién preparadas tomadas como el 100%. En todos los casos se evidencia una degradación del analito (porcentaje de pérdida) inferior al 2%, la cual se puede considerar despreciable teniendo en cuenta que un estudio similar enfocado al seguimiento de la estabilidad de cafeína en una matriz biológica sugiere un límite del 10% (67) y que se tiene como criterio de aceptación que estén dentro del 15 % de las concentraciones nominales. El porcentaje de variación mayor fue a las 24 horas, el cual se considera un intervalo de tiempo alto considerando que el tiempo de corrida del método es de 8 minutos y por lo tanto podrían realizarse hasta 180 inyecciones obteniendo resultados veraces dentro de los límites de desviación permitidos.

Tabla 4-10: Estabilidad a corto plazo en el automuestreador.

	Concentración µg/MI	Pérdida/ganancia (%)	
		6h	24 h
Sistema	0.5	-0.31	-0.93
	25	-0.06	-0.04
Método	0.5	-0.79	-1.51
	25	-0.16	-0.21

- **Estabilidad a largo plazo (ciclos de enfriamiento- temperatura ambiente)**

En este trabajo se considera la estabilidad a largo plazo el tiempo máximo de almacenamiento al cual se contempló la exposición de las muestras y bajo las condiciones de temperatura (4°C) a las cuales se mantuvieron, considerando ciclos de enfriamiento – temperatura ambiente (21°C). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4-11 como porcentaje de pérdida o ganancia, respecto a la lectura de las muestras recién preparadas (Semana 1) tomadas como el 100%. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede apreciar una degradación inferior al 2% en la mayoría de condiciones, excepto a la semana 4 donde se observó una mayor pérdida del analito; sin embargo tal como ocurrió en la estabilidad a corto plazo se encuentran en un rango aceptado para los criterios establecidos en metodologías bioanalíticas (60), por tanto se garantiza la estabilidad del analito durante este periodo de tiempo.

No se evaluó la estabilidad con ciclos de congelación y descongelación, dado que bajo ninguna circunstancia se almacenaron las muestras del ensayo en estas condiciones.

Tabla 4-11: Estabilidad de cafeína a largo plazo (ciclos de enfriamiento- temperatura ambiente)

	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Pérdida /ganancia (%)		
		Semana 2	Semana 3	Semana 4
Sistema	0.5	-1.39	-1.93	-2.10
	25	-0.99	-1.97	-2.94
Método	0.5	-1.36	-2.32	-2.63
	25	-0.21	-0.33	-0.38

- **Estabilidad durante el proceso de obtención de las muestras en el ensayo de permeación bucal *in vitro***

Partiendo de muestras con concentraciones conocidas (0.5 $\mu\text{g/ml}$ y 25 $\mu\text{g/ml}$), se sometieron a las condiciones empleadas en el desarrollo de los ensayos de *permeación in vitro* con celdas de Franz; por lo cual se colocaron a una temperatura de 37°C durante 4 horas, esto con la finalidad de corroborar que el analito no sufriera procesos de degradación durante el estudio de interés.

Al transcurrir las 4 horas, se valoró la estabilidad comparando la respuesta del equipo con la solución inicial, expresando los resultados como porcentaje de pérdida o ganancia del analito en la solución, como se muestra en la Tabla 4-12. A una concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ se observó un porcentaje de ganancia de 0.07% y de 1.17% para una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$, que se puede atribuir a una posible evaporación del solvente; sin embargo, la variación es aceptable y se logra inferir que el analito es estable durante los ensayos de permeación *in vitro*, sin presentar una pérdida significativa del compuesto en cualquiera de las condiciones investigadas.

Tabla 4-12: Estabilidad durante el proceso de obtención de las muestras en el ensayo de permeación bucal *in vitro*.

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Pérdida /ganancia (%) 4 h
0.5	0.07
25	1.17

Todas las características de desempeño evaluadas anteriormente permitieron demostrar que existe una adecuada selectividad, una linealidad entre 0.5 y 50 $\mu\text{g/mL}$, con una precisión expresada como RSD menor a un 2%, un porcentaje de recuperación del 99.9% y unos límites de detección y cuantificación para el método de 2.99 y 2.69 ng/mL respectivamente. Por tanto, se puede determinar la cantidad de cafeína acumulada en el compartimiento receptor, durante los ensayos de permeación, con el correspondiente método validado.

4.4 Evaluación de la influencia de algunas condiciones del ensayo sobre el estado de la membrana y el comportamiento de permeación de la cafeína a través de la misma.

Considerando que no siempre se tiene acceso a mucosa bucal fresca y que para este tipo de ensayos con mucosa bucal no se encuentran unos lineamientos universales establecidos, asegurar la calidad de los resultados es en cierta medida, un desafío. Para esto, según el sistema trabajado en cada laboratorio, deben estudiarse algunas variables en el ensayo y montaje de las celdas, para determinar cuáles son críticas y deben controlarse para poder obtener resultados reproducibles. Con tal finalidad, a continuación, se presentan las pruebas que se realizaron con base en una revisión de la literatura previa y con el propósito de contribuir con la implementación de un estudio de

permeación *in vitro* con celdas de Franz utilizando mucosa bucal porcina como membrana y cafeína como compuesto modelo hidrófilo.

4.4.1 Establecimiento de la metodología para la evaluación de la integridad del tejido por medio de la pérdida de agua transmucosa

La pérdida de agua transmucosa (TMWL) es una técnica poco estudiada para evaluar la integridad de la función de barrera en la mucosa bucal; por lo tanto, se ha recomendado en la literatura explorar esta prueba para obtener una medida representativa de la integridad de la barrera en los experimentos de permeación *in vitro* (64).

En el desarrollo de los ensayos al tomar la medida de TMWL se estableció la importancia de tener en cuenta los siguientes aspectos: Primero, las celdas y el tejido tienen que estar termostatados a 37 °C con el medio receptor libre de burbujas (42). En segundo lugar, la mucosa debe estar seca en la parte que queda en contacto con la sonda y para que los datos sean más reproducibles debe evitarse ejercer presión fuerte sobre el tejido, es decir dejar reposar suavemente la sonda de tal forma que los sensores queden a unos 3 mm por encima de la membrana (75). Por último, es importante realizar antes de cada ensayo la calibración del equipo para tener certeza de la exactitud del resultado.

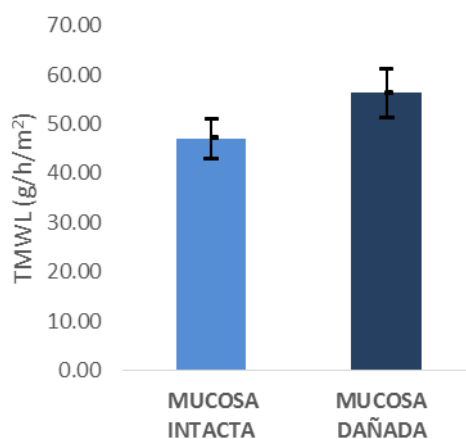
Una vez establecidas estas condiciones, se registró el valor de la TMWL obtenida con 15 mucosas separadas empleando bisturí quirúrgico a un espesor de 500 micras y con apariencia intacta, es decir con aspecto sano y sin perforaciones, para posteriormente tomar la medida de las mismas mucosas con 6 agujeros realizados intencionalmente (Figura 4-8). El resumen de los datos requeridos para este análisis se encuentra en el Anexo B.

Comparando las medidas de las mucosas intactas respecto a las medidas de las mucosas dañadas mediante una prueba t-Student se encontraron diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%. Por lo anterior, se asume que la técnica para medir la integridad del tejido tiene la capacidad de identificar la presencia de daños

y disminución de la función de barrera de la mucosa; aunque algunos autores habían obtenido este resultado en la evaluación de integridad con piel, no se poseía un reporte de este hallazgo con mucosa bucal con esta técnica (76, 77).

Se fijó un punto de corte de 50 g/h/m^2 , debido a que este valor estaba por debajo del promedio obtenido menos una desviación estándar, medido en las mucosas dañadas intencionalmente, además de encontrarse por debajo del mayor valor presente en las mucosas intactas (Figura 4-8).

Figura 4-8: Comparación de la integridad de la mucosa de cerdo intacta y la mucosa dañada intencionalmente.



*Las barras de error representan los valores de desviación estándar, $n=15$.

Es importante mencionar que este punto de corte fue superior al reportado en un estudio empleando la pérdida de agua transmucosa para evaluar la integridad de la membrana, donde el valor estándar fue de 30 g/h/m^2 (64), lo que puede deberse a que las medidas se tomaron de una manera diferente, ya que en el artículo citado se realizó el registro de la TMWL en cerdos anestesiados. Sin embargo, debe destacarse que la forma en que se tomó la medida en este proyecto está igualmente sustentada por una revisión de la literatura previa (75-77). Los contrastes en los resultados también pueden tener su origen en las discrepancias reportadas entre los diferentes instrumentos (76, 78, 79), lo que

conlleva a discutir la necesidad de realizar una adecuada calibración e implementación previa de este tipo de instrumentos en los laboratorios que prevean el uso de los mismos. Esta situación antes mencionada representa una dificultad al momento de establecer medidas universales que permitan evaluar esta condición de integridad a través de este tipo de equipos.

Es pertinente aclarar, que para aquellas mucosas en las que no se cumplió el corte de 50 g/h/m², como sucedió con las mucosas obtenidas en condiciones de mercado (congelación, sin medio de almacenamiento) y mucosas almacenadas en PBS 12 h con separación por método de calor; se decidió realizar las pruebas de permeación para confirmar si el método que detectaba la integridad tenía relación con los parámetros de permeación obtenidos finalmente.

4.4.2 Establecimiento de la metodología para el estudio de permeación bucal con celdas de Franz

A partir de una revisión bibliográfica previa, se seleccionó la temperatura para la operación de las celdas en 37 °C antes y durante el experimento de permeación (63). Así mismo, con pruebas preliminares se fijó un tiempo de duración del ensayo de 4 horas y con los siguientes tiempos de muestreo: 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4 horas; dado que en este tiempo es posible alcanzar el estado estacionario y representa una rutina de muestreo cómoda para el experimentador.

Igualmente, con estas pruebas se logró determinar que el volumen máximo de muestreo recomendado para las celdas empleadas en el laboratorio era de 500 µL, puesto que con un mayor volumen se observaba una mayor probabilidad de introducir burbujas de aire, lo cual produciría resultados inconsistentes. Por otro lado, se tuvo en cuenta que con este volumen se lograba respetar el equilibrio del sistema.

Agitación

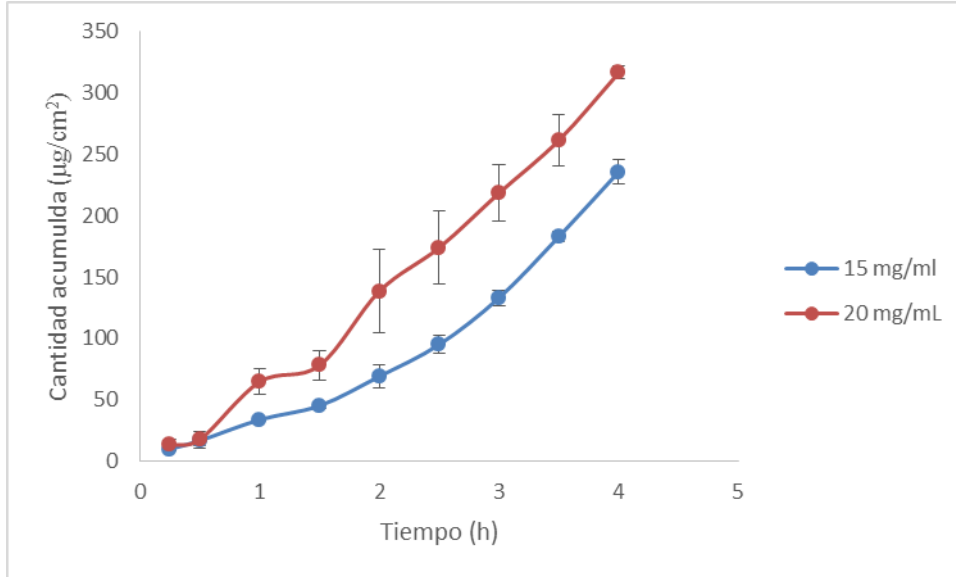
Como se observa en la Figura 4-9, con la agitación empleada (400rpm) se logró una adecuada homogenización del medio, evitando la presencia de burbujas o vórtices que pudiesen alterar los resultados del ensayo; además se determinó que con una agitación por debajo de este valor (300 o 200 rpm), no se alcanza a homogenizar el medio antes del primer muestreo.

Figura 4-9: Prueba de agitación en celda de Franz



Concentración de la cafeína en la cámara donora

Se decidió trabajar en condiciones infinitas, esto significa determinar una concentración adecuada en el compartimento donador que permita asegurar que esta permanezca lo más constante posible durante todo el tiempo del ensayo, que a su vez esté acorde con las dimensiones de las celdas del laboratorio y respete las condiciones *sink* en el compartimento receptor. Al evaluar las dos concentraciones propuestas: 15 y 20 mg/mL (Figura 4-10), se definió que se utilizaría esta última.

Figura 4-10: Perfiles de cafeína a dos niveles de concentración en la cámara donora.

*Cada punto representa el promedio de 3 celdas \pm S. Mucosa fresca utilizando separación por método de bisturí.

Con la concentración de 20 mg/mL, se logró la disolución satisfactoria de la cafeína en el medio (PBS a pH de 6.8), se mantuvieron las condiciones *sink* y se obtuvo el mejor perfil de permeación en términos de J_{ss} , K_p y Q_4 (Tabla 4-13). Esto puede explicarse porque, al aumentar la concentración en el compartimento donador, la magnitud del gradiente de concentración aumenta, y este efecto impacta directamente en la cantidad de cafeína que atraviesa al compartimento receptor.

Tabla 4-13: Valores de J_{ss} , K_p y Q_4 para cafeína a dos niveles de concentración en la cámara donora.

Concentración (mg/mL)	J_{ss} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	K_p (cm/h)	Q_4 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
15	131.6 ± 12.6	0.007 ± 0.001	235.8 ± 9.5
20	138.6 ± 21.6	0.007 ± 0.001	316.5 ± 5.2

*Datos presentados como promedio \pm S, $n=3$. J_{ss} : Flujo en estado estacionario, K_p : Coeficiente de permeabilidad, Q_4 : Cantidad acumulada a las 4 horas.

4.4.3 Definición de las condiciones de manejo y almacenamiento de la mucosa oral de cerdo

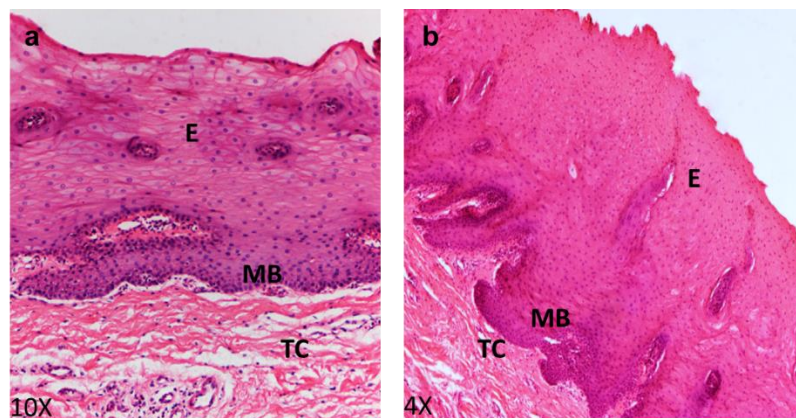
Teniendo en cuenta los resultados del análisis histológico de las muestras, la determinación de la pérdida de agua transmucosa y los estudios de permeación con las celdas se lograron establecer las condiciones asociadas a la separación y almacenamiento del tejido que se deben considerar para la implementación de este tipo de ensayos.

4.4.3.1 Técnica de separación

En la literatura se recomienda recortar los tejidos a 500 μm , debido a que con esta medida el epitelio sigue siendo la barrera principal de permeabilidad (22). Teniendo en cuenta esto se realizó la separación por bisturí de tejidos frescos para tener el control de referencia y posteriormente se comparó con la separación por medio de dermatomo, sin congelación previa. Lo anterior basado en que algunos autores han reportado un daño del tejido cuando se realiza la separación mecánica con un dermatomo, ya que se pueden cortar las papilas, y requiere congelarse previamente (13). Sin embargo, se observó que en estudios recientes se utilizó esta herramienta para la realización de los cortes (20, 64), razón por la cual se decidió hacer pruebas con esta técnica para identificar si es posible obtener resultados reproducibles y que no dependan en su totalidad de la habilidad del operador.

En la evaluación histológica, en la Figura 4-11, se observa la separación del tejido fresco de cerdos recién sacrificados por medio de bisturí a 500 micras, allí se aprecia que se logró obtener la membrana basal integra sin ningún daño estimable en el epitelio y con presencia del tejido conectivo; estas condiciones también se presentaron al realizar la separación del tejido por medio del dermatomo a 500 micras; en ambas condiciones se transportó el tejido en *Krebs-Ringer-Bicarbonato*.

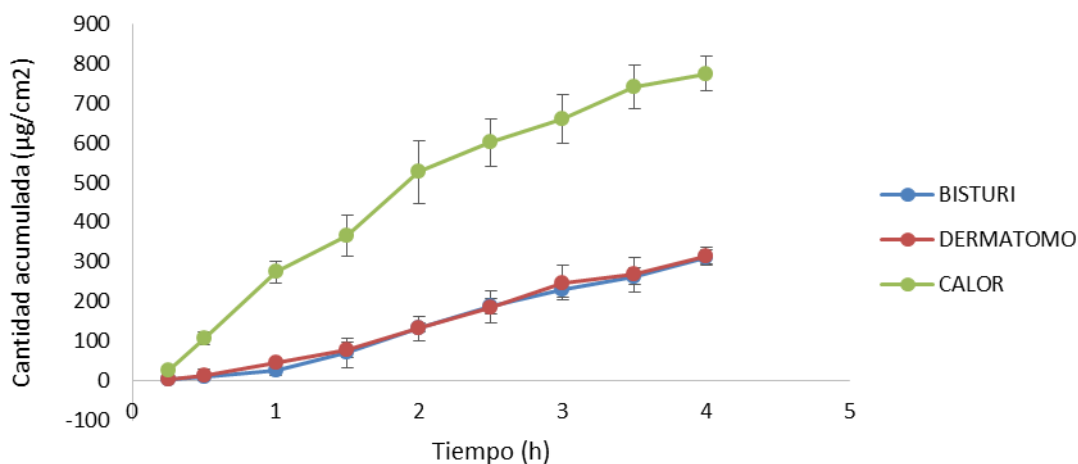
Figura 4-11: Comparación histológica de la mucosa bucal con diferentes técnicas de separación: a) Separación por bisturí y b) Separación por dermatomo.



*E = Epitelio, MB = Membrana basal, TC = Tejido conectivo. Tejido transportado en Krebs-Ringer-Bicarbonato.

Según los resultados obtenidos en los ensayos de permeación (Figura 4-12), se determinó que la separación por medio de bisturí y del dermatomo, presentan perfiles muy similares y que al realizar los cálculos correspondientes no se evidencian diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros evaluados (J_{ss} , K_p , Q_4), con un 95% de confiabilidad. La determinación de la TMWL tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos de separación y por tanto cualquiera de las dos técnicas podría utilizarse indistintamente (Tabla 4-14).

Figura 4-12: Perfil de permeación de cafeína a través de mucosa bucal de cerdo, realizando separación por bisturí, dermatomo y calor.



*Cada punto representa el promedio de 3 celdas \pm S. Tejido transportado en Krebs-Ringer-Bicarbonato.

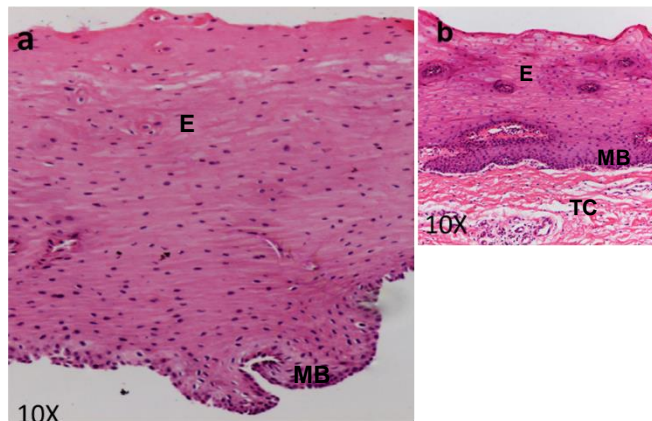
Tabla 4-14: Valores de J_{ss} , K_p , Q_4 y TMWL según la técnica de separación.

Método de separación	J_{ss} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	K_p (cm/h)	Q_4 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	TMWL inicial ($\text{g}/\text{h}/\text{m}^2$)	TMWL final ($\text{g}/\text{h}/\text{m}^2$)
Bisturí	132.2 ± 17.7	0.007 ± 0.001	310.4 ± 18.1	44.3 ± 4.8	51.9 ± 3.8
Dermatomo	140.1 ± 10.8	0.007 ± 0.001	314.1 ± 21.3	43.7 ± 2.7	52.4 ± 4.0
Calor	199.3 ± 40	0.010 ± 0.002	774.4 ± 43.9	42.5 ± 3.2	56.0 ± 9.7

*Datos presentados como promedio \pm S, $n=3$. J_{ss} : Flujo en estado estacionario, K_p : Coeficiente de permeabilidad, Q_4 : Cantidad acumulada a las 4 horas, TMWL: Pérdida de agua transmucosa.

Al evaluar la separación del epitelio por técnica de calor, se logró la eliminación completa del tejido conectivo, con la separación a nivel de la membrana basal y con la estructura del epitelio intacta (Figura 4-13). A partir de los resultados obtenidos en esta etapa también se pudo concluir que el paso de la cafeína y el tiempo que transcurre en el ensayo con las celdas de Franz no afecta al tejido en términos histológicos.

Figura 4-13: Mucosa bucal separada con calor comparada con la separación con bisturí.



*a: Separación con calor, b: Separación con bisturí. E = Epitelio, MB = Membrana basal, TC = Tejido conectivo. Tejido transportado en Krebs-Ringer-Bicarbonato.

Al realizar la comparación entre la separación por bisturí y calor (Figura 4-12 y Tabla 4-14); tal como lo referencian algunos autores (13, 22, 41, 52) , se presentaron diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros de permeación (Anova, $p < 0.05$), lo cual se justifica por la presencia del tejido conectivo al trabajar con un espesor de 500 μm para el caso de la técnica de bisturí a diferencia de la separación por calor, en la que no existe dicho tejido. En la TMWL inicial y final no se presentaron diferencias estadísticamente significativas (Anova, $p > 0.05$), esto debido a que es una medida que evalúa la integridad de la membrana y, por tanto, al considerar que la función de barrera está ubicada en el epitelio, independientemente de la técnica de separación que se utilice, debe conservarse inalterada, confirmándose en este estudio que la medida de la TMWL puede ser útil con tal finalidad.

Es importante mencionar que aunque un gran número de estudios utilizan la separación con bisturí o dermatomo a 500 μm como una herramienta de corte (20, 51, 55, 80), en otros se recomienda la separación por calor (22, 81). En este último método no se afecta la integridad y permeabilidad del tejido, en comparación con lo que sucede al emplear la técnica de separación con bisturí, si lo que se busca es obtener un espesor de 250 μm , que sería lo equivalente a lo obtenido por separación con calor.

No obstante, la inquietud que prevalece al observar las diferencias entre ambas técnicas de separación hace referencia a cuál método emplear en el momento de realizar un estudio para evaluar la vía bucal como ruta alternativa de administración. Al respecto Niccolazzo JA et al. (52) explica que en aquellos casos de evaluación de la permeabilidad con mucosa que incluya el tejido conectivo (Espesor total o *full thickness*), y en los que se quiera evaluar la influencia de promotores de la permeabilidad (*enhancers*) como lo es el dodecilsulfato sódico, podría verse ocultado su efecto sobre esta propiedad. Esto implica que en estas situaciones en las que se busca evaluar la influencia de estos compuestos sobre la permeabilidad, la mejor alternativa podría ser la separación por calor. Situaciones como esta, así como estudios en los que actualmente se emplean espesores de la mucosa de hasta $753 \mu\text{m} \pm 105 \mu\text{m}$ (82) , revelan la necesidad de tener un consenso sobre este tipo de directrices; así como aparece en la guía de la OECD para piel, en la cual se aclara que con un espesor de 200-400 μm se considera aceptable para la preparación de tejidos para este tipo de pruebas (56).

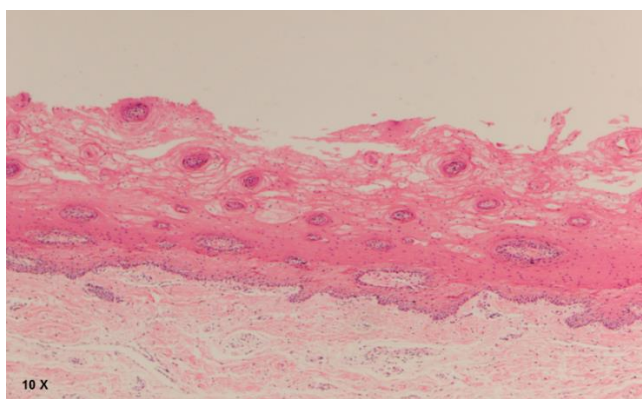
4.4.3.2 Evaluación del empleo de mucosa congelada sin medio de almacenamiento (condiciones del mercado)

En algunas circunstancias los parámetros de permeación pueden no afectarse por el proceso de congelación respecto a los obtenidos con tejidos frescos, como fue el caso de la carbamazepina y el acetónido de triamcinolona, en un estudio realizado (83). Sin embargo, es necesario en cada caso realizar pruebas preliminares, porque los resultados podrían diferir dependiendo del fármaco probado, razón por la cual se evaluó la permeabilidad de cafeína en estas condiciones.

Las muestras recolectadas en condiciones del mercado, es decir sometidas a proceso de congelación (-20°C) durante cuatro días posteriores al sacrificio sin medios de almacenamiento, revelaron en el estudio histológico una descamación superficial en los tejidos, hinchamiento de las células epiteliales superiores y alteraciones morfológicas (Figura 4-14). Lo anterior, posiblemente causado por la formación de cristales de hielo por los procesos de congelación sin criopreservante, a los cambios de temperatura y al

proceso de necrosis de la mucosa. Esto es consistente con lo reportado en la literatura, donde se explica que el tejido expuesto a estos procesos de congelación hace que se formen cristales, que pueden dar lugar a cambios histológicos, como por ejemplo daños en la matriz intracelular y la membrana celular, modificando así las propiedades de barrera del epitelio (83).

Figura 4-14: Mucosa de cerdo en condiciones de almacenamiento no controladas.



**Mucosa separada empleando separación por técnica de bisturí.*

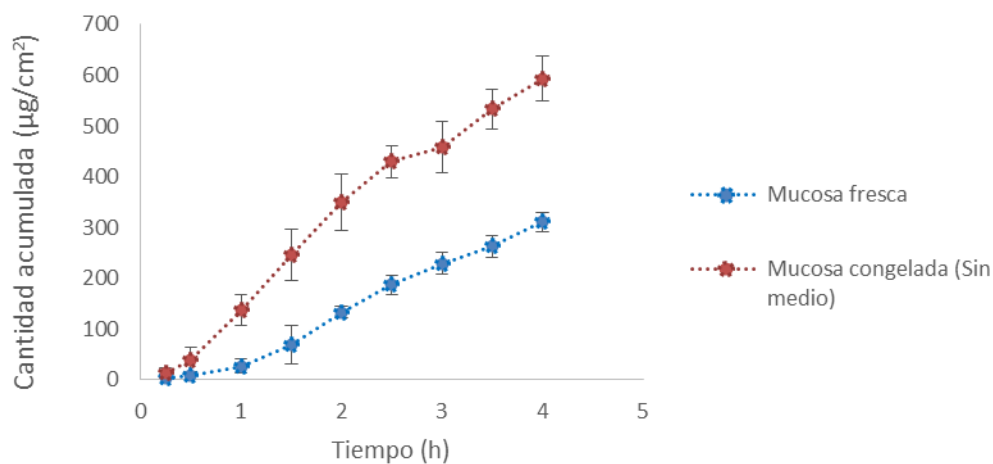
Como se mencionó, algunos estudios han informado que la congelación sin crioprotector no afecta de manera significativa la permeabilidad de ciertos principios activos en su mayoría de baja solubilidad en agua (81, 83, 84). En el caso de ensayos con cafeína como compuesto modelo hidrofílico, Nicolazzo et al.(52) relatan que el flujo de permeabilidad no era significativamente diferente cuando se utilizaba epitelio bucal fresco y congelado, mientras que en la evaluación histológica se presentaban alteraciones notables en el tejido congelado. De tal forma, en el presente estudio se desafiaron los tejidos a los procesos de congelación (-20°C), para ver si era posible trabajar con mucosa obtenida en el comercio sin tener que realizar la toma de muestras en cerdos recién sacrificados.

Al comparar la mucosa previamente congelada y almacenada sin medios de mantenimiento, con la mucosa fresca transportada en Krebs-Ringer- Bicarbonato (Figura 4-15 y Tabla 4-15), se observaron diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros evaluados (ANOVA, $p > 0.05$); por lo cual se concluye que el almacenamiento

del tejido cuando se trabaja con un fármaco hidrófilo como cafeína debe estar totalmente controlado en los primeros días posteriores al sacrificio de los cerdos. Estos datos se explican por los hallazgos reportados en el análisis histológico, mostrado previamente, donde se observaron alteraciones morfológicas y estructurales, generadas por el proceso de congelación, que posiblemente afectaron en mayor medida los espacios intercelulares. Esto conlleva a un aumento en la permeabilidad de la cafeína, que tiene una ruta paracelular, a diferencia de lo que ocurre con los compuestos lipófilos (65).

Además, se pudo corroborar que la determinación de la TMWL es una medida de tamizaje de la integridad de la membrana, ya que como se explicó anteriormente en el análisis estadístico, se encontraron diferencias de esta medida inicial entre los tejidos de animales recién sacrificados y los tejidos obtenidos en condiciones del mercado. Esta diferencia también podría relacionarse con el aumento en la permeabilidad de la cafeína.

Figura 4-15: Comparación de perfiles de permeación de cafeína a través de mucosa bucal fresca y mucosa congelada sin medio de almacenamiento.



*Cada punto representa el promedio de 3 celdas \pm S. Mucosa utilizada empleando separación por técnica de bisturí.

Tabla 4-15: Comparación de valores de Jss, Kp, Q₄ y TMWL de mucosa fresca y mucosa congelada sin medio de almacenamiento

Condición	Jss ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Kp (cm/h)	Q ₄ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	TMWL	TMWL
				Inicial ($\text{g}/\text{h}/\text{m}^2$)	final ($\text{g}/\text{h}/\text{m}^2$)
Mucosa fresca	132.2±17.7	0.007±0.001	310.4 ± 18.1	44.3 ± 4.8	51.9 ± 3.8
Mucosa congelada					
sin medio de almacenamiento	184.6±22	0.009±0.001	593.1 ±136.2	64.1± 8.7	83.5 ± 8.4

*Datos presentados como promedio \pm S, n=3. Jss: Flujo en estado estacionario, Kp: Coeficiente de permeabilidad, Q₄: Cantidad acumulada a las 4 horas, TMWL: Pérdida de agua transmucosa.

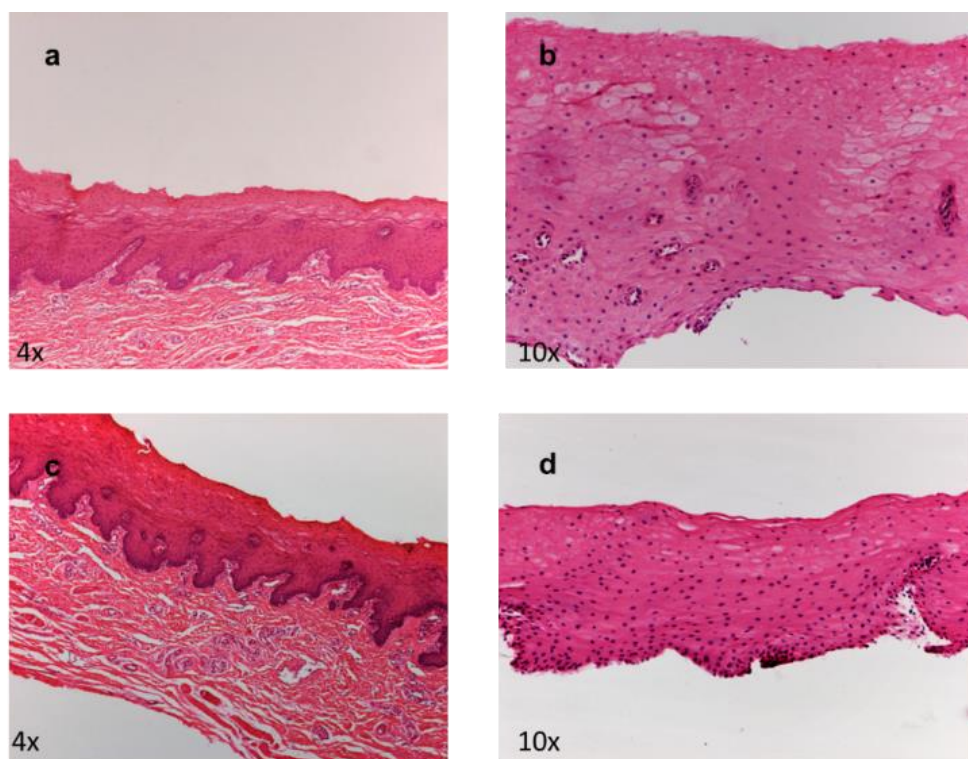
4.4.3.3 Estudio de medios de almacenamiento de la mucosa a corto plazo

En los ensayos de permeación bucal, resulta un factor crítico conservar la integridad del epitelio para obtener resultados confiables; en el caso de esta investigación se consideró fundamental esta condición teniendo en cuenta que el sacrificio de cerdos en los frigoríficos de Colombia se realiza por tradición en horas de la noche, de tal forma que fijar unas condiciones de medio, tiempo y temperaturas de almacenamiento es necesario para hacer el trabajo del laboratorio más cómodo, sin perder en el proceso la reproducibilidad y veracidad de los resultados.

En el análisis histológico, los tejidos correspondientes al almacenamiento con PBS a pH 7.4 y KRB para la separación con bisturí y calor, no mostraron alteraciones significativas en la morfología celular o la estructura epitelio por un periodo de 24 horas de almacenamiento a 4°C (Figura 4-16), dando indicios de que durante este lapso se mantiene la integridad de la barrera superficial en estas condiciones. Los resultados empleando KRB como medio de almacenamiento coinciden con lo reportado por autores como Kulkarni U et al. (13). Sin embargo, los obtenidos con PBS a las 24 horas son

opuestos a lo expresado por los mismos autores, pues en los resultados del presente trabajo no se detectó un daño visible en las capas superficiales del epitelio junto con la disrupción de la lámina basal como sí sucedió en la investigación mencionada. Esto puede deberse a la variabilidad biológica de los porcinos, al manejo y obtención de las muestras en el laboratorio, entre otros factores.

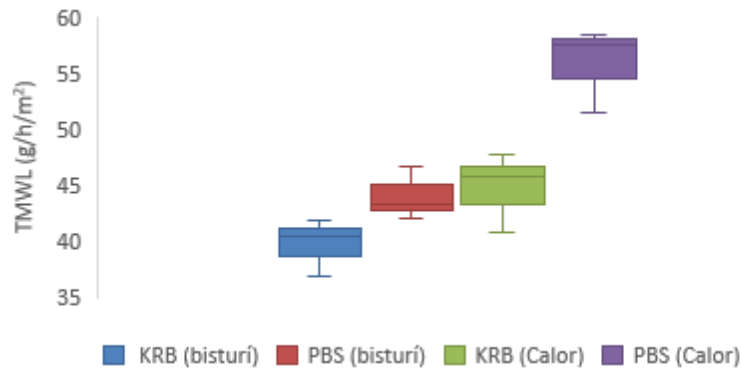
Figura 4-16: Mucosa bucal almacenada durante 24 h a 4 °C bajo las siguientes condiciones: a) PBS (bisturí), b) PBS (calor), c) KRB (bisturí), d) KRB (calor).



Al comparar la pérdida de agua transmucosa tomada al inicio de las pruebas de permeación, se observó que con KRB como medio de almacenamiento para la separación con bisturí y calor, así como para PBS como medio de almacenamiento para la separación con bisturí, todos los valores registrados estaban por debajo del punto de corte durante las 24 horas y no se presentaron diferencias estadísticas significativas (Anova, $p > 0.05$). No obstante, en el caso de los tejidos separados con calor y almacenados con PBS, se observó un aumento significativo (ANOVA, $p < 0.05$) en los

valores registrados de la TMWL inicial, a las 12 horas de almacenamiento (Figura 4-17). Esto concuerda con lo concluido por Kulkarni U et al (13), quienes mencionan que al tomar como medida de pérdida de la integridad la permeación de isotiocianato de fluoresceína marcado con dextrano con peso molecular de 20 kDa, se identificó un incremento en la permeabilidad de este componente después de 6 horas de almacenamiento con PBS. A pesar de no encontrarse evidencia en la bibliografía consultada (13, 65), en el desarrollo de los ensayos también se pudo observar una mayor dificultad en la separación de los tejidos por el método de calor después de las 6 horas de almacenamiento con este medio, requiriendo más muestras y tiempo para lograr una adecuada obtención del epitelio.

Figura 4-17: Determinación de TMWL inicial a las 12 horas para los medios de almacenamiento a corto plazo



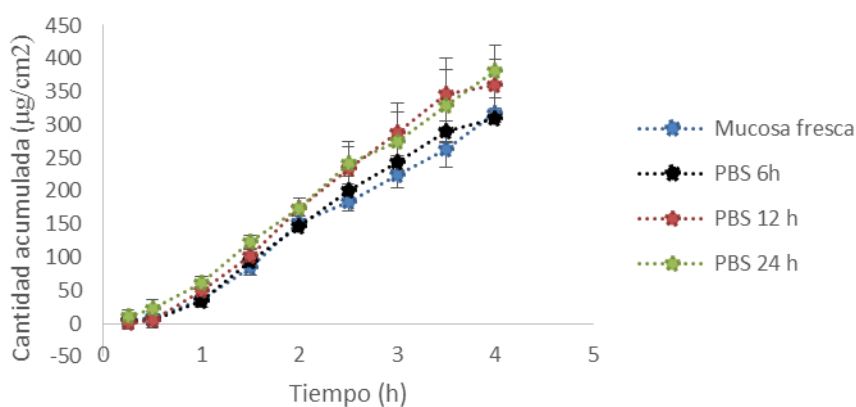
*Número de determinaciones=3. PBS: Buffer fosfato salino, KRB: Krebs-Ringer-Bicarbonato.

Posterior a la determinación de la TMWL, se analizaron los resultados de los ensayos de permeación, para cada una de las mucosas almacenadas en las diferentes condiciones. Inicialmente, se comparó mucosa fresca con el almacenamiento de tejidos en PBS a pH 7.4 durante 6, 12 y 24 h para la separación por medio de bisturí. Mediante el ANOVA se pudo concluir que no se encontraron diferencias significativas entre el flujo en el estado estacionario, el coeficiente de permeabilidad y la pérdida de agua transmucosa con un nivel de confiabilidad del 95% (Figura 4-18 y Tabla 4-16). Por otro lado, al confrontar la cantidad acumulada a las 4 horas se identificaron diferencias estadísticamente

significativas ($p < 0.05$) con un incremento puntual a las 12 y 24 horas. Lo anterior coincide con lo propuesto en la literatura (13), al reportar que hasta las 6 horas es totalmente confiable el almacenamiento de los tejidos en esta solución.

El hecho de que la medida de la TMWL no confirmara los posibles daños del tejido después del almacenamiento con PBS durante 12 horas con separación por bisturí, puede llevar a discutir la idoneidad de este tipo de medidas. Autores como Netzlaff F et al. (75), discuten que es probable que este equipo sólo detecte daños severos, lo cual es a su vez debatido por otros autores como Elmahjoubi E et al (76) y es puesto a consideración en este análisis, dado que se podría argumentar que los cambios presentados en este ensayo fueron sutiles (cambios en Q_4), puesto que los otros parámetros de permeabilidad como el flujo y coeficiente de permeación, no se vieron afectados al igual que el examen histológico donde no se percibió ninguna alteración en la morfología y estructura del tejido.

Figura 4-18: Perfil de permeación de la cafeína a través de mucosa bucal almacenada en PBS con separación por bisturí.



*Cada punto representa el promedio de 3 celdas \pm S. PBS: Buffer fosfato salino.

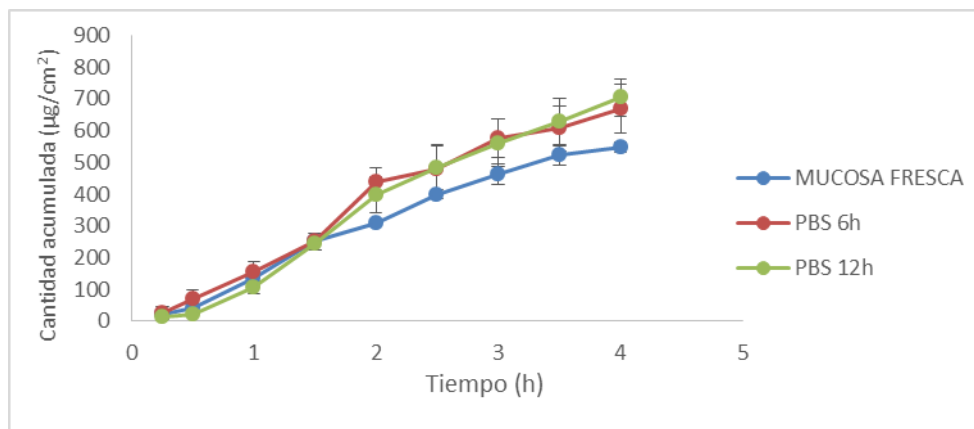
Tabla 4-16: Valores de Jss, Kp, Q₄ y TMWL para almacenamiento en PBS con separación por bisturí.

Tiempo de almacenamiento	Jss ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Kp (cm/h)	Q₄ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	TMWL Inicial (g/h/m²)	TMWL final (g/h/m²)
<i>Mucosa fresca</i>	127.6±8.5	0.006±0.0004	317.3 ± 6.6	43.5 ± 3.4	48.2 ± 5.0
6h	129.2±6.1	0.006±0.0003	308.7 ± 4.5	46.7 ± 2.3	52.2 ± 4.8
12h	152.0±9.8	0.008±0.0005	360.2 ± 10.4	44.0 ± 2.4	57.9 ± 7.9
24 h	156.0±22.6	0.008±0.001	383.7 ± 35.1	44.5 ± 2.3	51.6 ± 3.6

*Datos presentados como promedio \pm S, n=3. Jss: Flujo en estado estacionario, Kp: Coeficiente de permeabilidad, Q₄: Cantidad acumulada a las 4 horas, TMWL: Pérdida de agua transmucosa, PBS: Buffer fosfato salino.

En la evaluación empleando como medio de almacenamiento PBS a pH 7.4 y realizando separación por calor (Figura 4-19 y Tabla 4-17), se evidenció la presencia de diferencias estadísticas en la TMWL inicial como previamente se describió y a nivel de los parámetros de permeabilidad a partir de las 12 horas de almacenamiento (ANOVA, $p < 0.05$). Esto coincide con lo obtenido en otro estudio (13) y se puede asociar con la dificultad antes mencionada para la separación del tejido con técnica de calor después de las 6 horas; de tal forma se puede decir que este medio de almacenamiento se puede utilizar de manera confiable después del sacrificio de los porcinos hasta un máximo de 6 horas.

Figura 4-19: Perfil de permeación de la cafeína a través de mucosa bucal almacenada en PBS con separación por calor.



*Cada punto representa el promedio de 3 celdas \pm S. PBS: Buffer fosfato salino.

Tabla 4-17: Valores de J_{ss} , K_p , Q_4 y TMWL para almacenamiento en PBS con separación por calor

Tiempo de almacenamiento	J_{ss} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	K_p (cm/h)	Q_4 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	TMWL Inicial ($\text{g}/\text{h}/\text{m}^2$)	TMWL Final ($\text{g}/\text{h}/\text{m}^2$)
Mucosa fresca	187.0 ± 21.4	0.009 ± 0.001	546 ± 15.6	43 ± 1.7	56.2 ± 3.8
6h	184.2 ± 29.3	0.009 ± 0.001	669 ± 78.0	45.1 ± 1.6	56.5 ± 4.1
12h	238.2 ± 3.6	0.012 ± 0.0002	704.8 ± 58.2	55.8 ± 3.8	59.1 ± 7.1

*Datos presentados como promedio \pm S, $n=3$. J_{ss} : Flujo en estado estacionario, K_p : Coeficiente de permeabilidad, Q_4 : Cantidad acumulada a las 4 horas, TMWL: Pérdida de agua transmucosa, PBS: Buffer fosfato salino.

De igual forma, se realizó la evaluación del almacenamiento de tejidos con KRB durante 24 horas, determinando que en los parámetros de permeabilidad (J_{ss} , K_p y Q_4) y de integridad no se presentaron diferencias estadísticas significativas (ANOVA, $p>0.05$) con ninguna de las técnicas de separación (Tablas 4-18 y 4-19). Estos resultados demuestran que en estas condiciones se obtienen datos confiables sin que se presenten alteraciones histológicas o de permeación de la cafeína, como modelo de fármaco hidrófilo.

Tabla 4-18: Valores de Jss, Kp, Q₄ y TMWL para almacenamiento en KRB con separación por calor

Tiempo de almacenamiento	Jss (µg/cm ² /h)	Kp (cm/h)	Q ₄ (µg/cm ²)	TMWL Inicial (g/h/m ²)	TMWL final (g/h/m ²)
Mucosa fresca	199.3±40.0	0.010± 0.002	774.4 ± 43.9	42.5 ± 3.2	56.0 ± 9.7
6h	201.4±33.1	0.010 ± 0.002	745.0 ± 26.8	36.7± 6.1	67.8 ± 1.6
12h	187.7±18.7	0.009 ± 0.001	690.1 ± 95.3	44.7 ± 3.6	76.0 ± 10.5
24 h	202.2±5.5	0.003 ±0.0003	780.2 ± 118.0	40.7± 4.4	73.0 ± 5.3

*Datos presentados como promedio ± S, n=3. Jss: Flujo en estado estacionario, Kp: Coeficiente de permeabilidad, Q₄: Cantidad acumulada a las 4 horas, TMWL: Pérdida de agua transmucosa, KRB: Krebs-Ringer-Bicarbonato.

Tabla 4-19: Valores de Jss, Kp, Q₄ y TMWL para almacenamiento en KRB con separación con bisturí

Tiempo de almacenamiento	Jss (µg/cm ² /h)	Kp (cm/h)	Q ₄ (µg/cm ²)	TMWL Inicial (g/h/m ²)	TMWL final (g/h/m ²)
Mucosa fresca	132.2±17.7	0.007±0.0009	310.4 ± 18.1	44.3 ± 4.8	51.9 ± 3.8
6h	124.0±4.6	0.006±0.0002	307.2 ± 10.1	46.1 ± 3.2	61.6 ± 5.8
12h	124.4±3.1	0.006±0.0002	301.1 ± 10.6	39.8 ± 2.6	51.9 ± 3.8
24 h	134.4±6.7	0.007±0.0003	310.0 ± 8.6	38.3 ± 5.9	75.9 ± 10.3

*Datos presentados como promedio ± S, n=3. Jss: Flujo en estado estacionario, Kp: Coeficiente de permeabilidad, Q₄: Cantidad acumulada a las 4 horas, TMWL: Pérdida de agua transmucosa, KRB: Krebs-Ringer-Bicarbonato.

Con relación a la medida de la integridad evaluada en las diferentes condiciones estudiadas, se comparó la medida de la pérdida de agua transmucosa (TMWL) inicial y final de cada ensayo de permeación, presentando diferencias significativas (p <0.05) con

un aumento de la TMWL al culminar cada ensayo, lo que indica que durante la realización del mismo posiblemente existe una pérdida progresiva de la integridad de la mucosa atribuida al proceso de necrosis que va presentando el tejido (58). Este método para medir la integridad de la membrana tiene como ventaja que el tejido dañado puede eliminarse antes de realizar la prueba, diferente a otros como el isotiocianato de fluoresceína marcado con dextrano con peso molecular de 20 kDa (FD-20), que se añade en la cámara donora durante un periodo comprendido entre 1 a 4 horas después de concluido el ensayo de permeación habitual (13, 52), tiempo en el cual se puede acelerar la degradación de la mucosa obteniendo así resultados con poca precisión, sumado al hecho de que se puede llegar a utilizar tejidos que desde el principio tenían comprometida su integridad, involucrando una pérdida de material y tiempo.

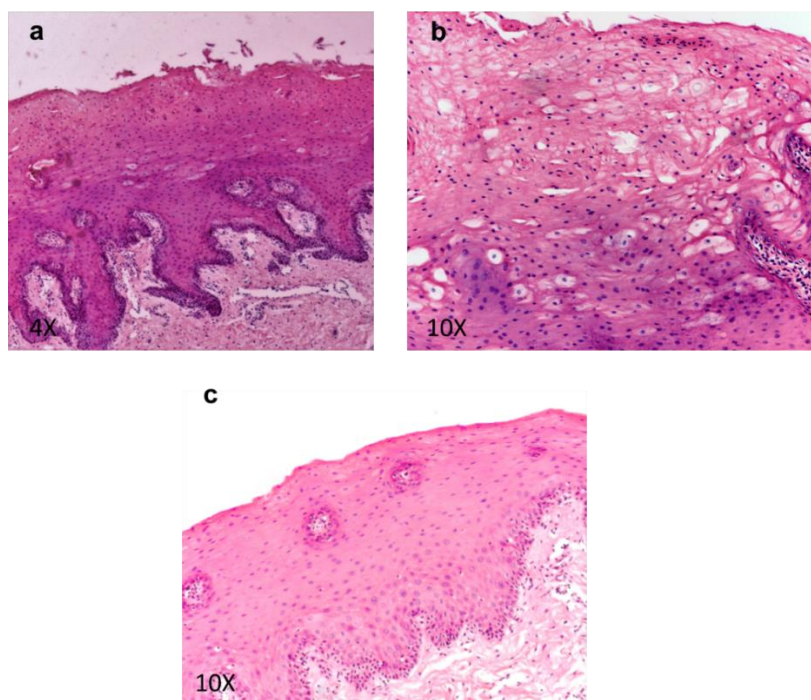
4.4.3.4 Evaluación de medios de almacenamiento de la mucosa a largo plazo

Debido a que no siempre es posible obtener tejido fresco para los ensayos de permeación, es muy importante tener un método para el almacenamiento a largo plazo del tejido extirpado. Con tal finalidad, en otros estudios se han empleado criopreservantes a base de combinaciones con DMSO, glicerol y sacarosa (64, 82). Se ha demostrado que el uso de glicerol es incapaz de mantener las características histológicas y de permeabilidad intactas (13, 65), mientras que Amores S et al (64) no encontraron ninguna diferencia entre el flujo en mucosa fresca y congelada, el coeficiente de permeabilidad o el tiempo de latencia, al emplear propanolol como compuesto modelo y un criopreservante con DMSO. De esta manera, en esta tesis se decidió probar el efecto de dos combinaciones de criopreservantes que contengan DMSO.

En la evaluación histológica, se observaron pequeñas diferencias entre los tejidos frescos transportados en KRB y aquellos congelados con los crioprotectores, aunque en un menor grado que los tejidos congelados sin ningún medio de almacenamiento (-20°C, durante 4 días). Con el crioprotector A (DMSO 10%, SFB 50% Y 40% PBS) a los 15 días y el crioprotector B (DMSO 10%, SFB 50% y DPBS 40%) a los 30 días, se apreciaron

cambios morfológicos discretos en mucosa bucal porcina después de la congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, esto probablemente asociado con la formación de cristales de hielo, presentando una descamación de la superficie epitelial, con ligero edema intersticial e hinchamiento de las células epiteliales superiores (Figura 4-20 a y b). Cambios menos significativos se presentaron con el criopreservante B a los 15 días (Figura 4-20 c), donde de manera general se conservó adecuadamente el tejido manteniendo aparentemente la integridad de su barrera superficial.

Figura 4-20: Mucosa congelada a -80°C : a) Criopreservante B durante 30 días, b) Criopreservante A durante 15 días, c) Criopreservante B durante 15 días



*Mucosa empleada utilizando la técnica de separación por bisturí.

Las muestras con criopreservante B durante un mes y en el criopreservante A durante 15 días, si bien es cierto tenían una TMWL inicial dentro del rango permitido, presentaron diferencias respecto a los controles de mucosas frescas, con un notable aumento en el registro (ANOVA, $p < 0.05$). Por otra parte, la pérdida de agua transmucosa de las muestras con criopreservante B durante 15 días, no presentó diferencias

estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95% respecto a los controles con mucosas frescas (Tabla 4-20).

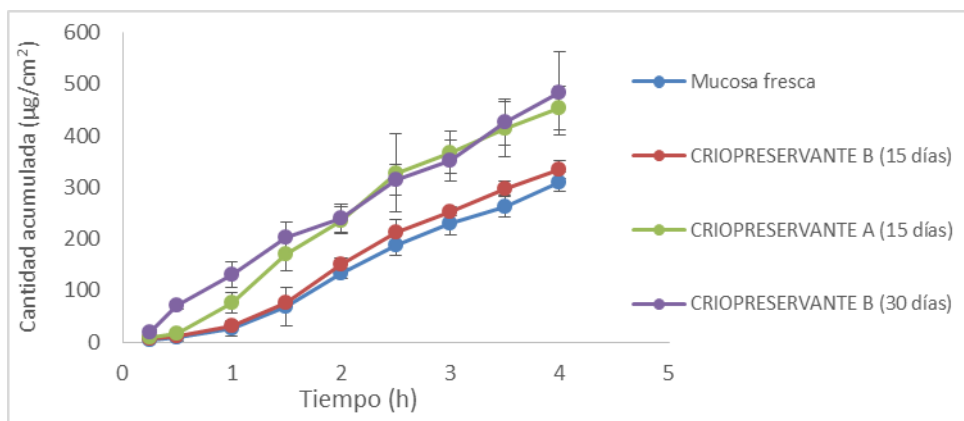
Tabla 4-20: Valores de Jss, Kp, Q₄ y TMWL para medios de almacenamiento a largo plazo.

Condición de almacenamiento	Jss ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Kp (cm/h)	Q₄ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	TMWL Inicial (g/h/m²)	TMWL Final (g/h/m²)
Mucosa fresca	132.2±17.7	0.007±0.0009	310.4 ± 18.1	44.3 ± 4.8	51.9 ± 3.8
Criopreservante A (15 días)	166.6±12.0	0.008 ± 0.0006	454.2 ± 42.9	48.9 ± 1.9	52.4 ± 1.4
Criopreservante B (15 días)	162.9±5.9	0.008 ± 0.0003	334.2 ± 17.9	42.3 ± 3.7	57.5 ± 8.5
Criopreservante B (30 días)	140.9±17.3	0.007 ± 0.0009	482.5 ± 81.5	49.7 ± 1.9	61.3 ± 1.8

*Datos presentados como promedio ± S, n=3. Jss: Flujo en estado estacionario, Kp: Coeficiente de permeabilidad, Q₄: Cantidad acumulada a las 4 horas, TMWL: Pérdida de agua transmucosa.

En las pruebas de permeación cuando se utilizó el criopreservante A durante 15 días y el criopreservante B (DMSO 10%, SFB 50% y DPBS 40%) durante 30 días, se observaron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, p>0.05) en todos los parámetros de permeabilidad al compararse con mucosa fresca (Figura 4-21). Esto concuerda con los hallazgos histológicos donde se observó una descamación y daño en la superficie epitelial y con las diferencias presentadas a nivel de la determinación de pérdida de agua transmucosa. De tal forma, se sugiere no utilizar estas condiciones para trabajar en especial con compuestos hidrófilos.

Figura 4-21: Perfiles de permeación de cafeína en mucosa oral de cerdo con medios de almacenamiento a largo plazo.



*Cada punto representa el promedio de 3 celdas \pm S. Se emplearon mucosas separadas con técnica de bisturí.

Con el criopreservante B durante 15 días, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en el flujo en estado estacionario y coeficiente de permeabilidad (Tabla 4-20); sin embargo, sí se encontraron diferencias en la cantidad acumulada a las 4 horas (ANOVA, $p > 0.05$). En cierta medida, tal como otros autores lo han reportado esto podría atribuirse a las variaciones naturales entre las muestras de mucosa (64); no obstante, es posible que se deba principalmente a lo concluido por Gurtovenko AA y Anwar J (85) que aclaran que el DMSO promueve la permeación de las moléculas, particularmente de naturaleza hidrófila como es el caso de cafeína, debido a una inducción en la formación de poros de agua. Aunque se deben mejorar las características de desempeño del criopreservante, se puede decir que durante un periodo inferior a los 15 días es posible que se conserve en gran medida la integridad de la barrera, dado que el flujo en estado estacionario, el coeficiente de permeabilidad junto con los resultados histológicos y los de TMWL no presentaron diferencias notables frente al control con mucosa bucal. De igual forma, a futuro se sugiere comprobar si con un principio activo de naturaleza lipofílica se obtiene el mismo comportamiento, ya que posiblemente con este se pueda presentar mejores resultados al tener una difusión diferente a través del epitelio bucal.

En la literatura, se encuentran diversos artículos que ofrecen algunas directrices para realizar estudios de permeación bucal, pero cada laboratorio tiene un amplio margen de flexibilidad en términos de diseño del protocolo experimental, en el tratamiento de la membrana, la medida de la integridad de la membrana, temperatura, agitación, el volumen e intervalos de muestreo, entre otros. No obstante, cuando se implementan este tipo de ensayos, como se hizo en la presente investigación, se permite establecer evidencia documentada que proporciona un mayor nivel de reproducibilidad, además de contribuir con información que permite en muchos casos suplir la ausencia de lineamientos a nivel mundial. De tal forma, con los resultados obtenidos se implementó un ensayo de permeación bucal con celdas de Franz para compuestos hidrófilos, es decir con una ruta paracelular igual que la cafeína.

5. Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

Se implementó una metodología analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC- DAD) para evaluar la permeación *in vitro* de cafeína a través de mucosa bucal porcina. Dicha metodología resultó selectiva, precisa, exacta, lineal en el rango de concentraciones de 0.5 a 50.00 µg/mL, con un límite de detección de 0.93 y 0.85 ng/mL en el sistema y método; y un límite de cuantificación de 2.99 y de 2.69 ng/mL en el sistema y método respectivamente, con una estabilidad de las muestras en las condiciones de almacenamiento (4°C) durante un mes, por un periodo de 24 horas en el automuestreador y durante la realización del ensayo con celdas de Franz.

Se definieron las condiciones de operación para la determinación de la TMWL y para el empleo de las celdas de Franz. Para el caso de TMWL, se estableció que el tejido y las celdas deben estar termostatados a la temperatura del ensayo y la mucosa debe estar seca en el sitio de contacto con la sonda; se estableció el valor de 50 g/h/m², como punto de corte para diferenciar aquellas mucosas intactas, aptas para un estudio de permeación de las que no lo están. En las celdas de Franz se fijaron como variables operacionales: temperatura 37 °C, duración del ensayo 4 horas, tiempos de muestreo 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4 horas, volumen máximo de muestreo 500 µL, velocidad de agitación 400 rpm y concentración de cafeína en la cámara donora de 20 mg/mL.

Se evidenció que las técnicas de separación del tejido con bisturí o dermatomo (sin congelación previa) se pueden emplear indistintamente, sin alterar los parámetros de permeabilidad, ni generar daño en el tejido, manteniendo la integridad de la membrana. Sin embargo, el empleo del bisturí queda sujeto a las habilidades del investigador, mientras el dermatomo permite obtener una reproducibilidad en el corte, dependiente del equipo empleado. La separación del epitelio por método de calor, en comparación con el de bisturí presenta diferencias marcadas en la permeabilidad, debido a la diferencia en el

espesor del tejido que se logra por cada método, manteniéndose la morfología del tejido y la integridad del mismo sin afectaciones. Se destaca la necesidad de tener un consenso a nivel mundial sobre el espesor de los tejidos a emplear debido a este tipo de diferencias encontradas.

Se demostró que la mucosa bucal requiere tener un control del medio, de temperatura y de tiempo de almacenamiento para los ensayos de permeación, siendo siempre necesario obtenerla de cerdos recién sacrificados ya que cambios de temperatura como los procesos de congelación pueden afectarla rápidamente.

Se logró conservar la integridad del tejido almacenándolo a 4° C, en KRB por un periodo de hasta 24 horas y en PBS por un tiempo menor a las 6 horas después de la obtención de la mucosa de los cerdos recién sacrificados. Por medio de la evaluación histológica se comprobaron cambios en la morfología y estructura de los tejidos sometidos a procesos de congelación, presentando un menor nivel de afectación en aquellos que se almacenaron con criopreservantes. El almacenamiento a largo plazo se puede realizar por un periodo menor a los 15 días con un criopreservante compuesto por DMSO al 10%, con un 50% de suero fetal bovino y un 40% de solución salina tamponada con fosfatos de Dulbecco.

A partir de los resultados de las variables estudiadas, se pudo demostrar que la determinación de la TMWL permite la detección de daños severos en el tejido, imperceptibles para el investigador; sin embargo, ante cambios sutiles en los parámetros de permeación no se detectó la presencia de diferencias. Se considera una alternativa práctica y rápida de tamizaje y monitoreo de la integridad de la membrana, pero que idealmente podría ser complementada con otra técnica.

A pesar de que existe amplia información en la literatura sobre ensayos de permeación con mucosa bucal, este estudio demuestra que se deben estudiar y establecer las variables asociadas a la implementación de este tipo de ensayos en cada laboratorio de investigación, antes de desafiarlos con formulaciones desarrolladas, ya que aspectos como la variabilidad del tejido biológico, de las condiciones propias del método de

permeación y la implementación de metodologías como las requeridas para evaluar la integridad del tejido, van a incidir en la reproducibilidad de este tipo de estudios.

De acuerdo a los resultados presentados, el desarrollo de esta investigación permitió implementar un ensayo de permeación bucal para el estudio de compuestos hidrófilos, con métodos de transporte a través de la mucosa similares a los que presenta la cafeína, empleada en este estudio como molécula modelo.

Recomendaciones

Evaluar el empleo de estudios complementarios a la técnica de TMWL para monitorear la integridad de la mucosa bucal.

Desafiar el método implementado con otros fármacos de naturaleza hidrófila que permitan concluir sobre la necesidad o no de emplear más compuestos modelo en la estandarización de este tipo de ensayos.

Establecer las condiciones requeridas para desafiar el método implementado en la evaluación de formulaciones farmacéuticas que contengan fármacos de naturaleza hidrofílica, como la cafeína.

Realizar la implementación de los ensayos de permeación bucal *in vitro* con celdas de Franz empleando compuestos modelo de naturaleza lipófila.

Bibliografía

1. Patel VF, Liu F, Brown MB. Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2011;153(2):106-16.
2. Dowty ME KK, Irons BK, Robinson JR. Transport of thyrotropin releasing hormone in rabbit buccal mucosa *in vitro*. *Pharmaceutical research*. 1992;9(9):1113-22.
3. Jinsong Hao KC, Heng PWS. Buccal Delivery Systems. *Drug Development & Industrial Pharmacy*. 2003;29(8):821.
4. Madhav NVS, Shakya AK, Shakya P, Singh K. Orotransmucosal drug delivery systems: A review. *Journal of Controlled Release*. 2009;140(1):2-11.
5. Hearnden V, Sankar V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr AR, et al. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64(1):16-28.
6. Torres-Lugo M, Peppas NA. Transmucosal delivery systems for calcitonin: a review. *Biomaterials*. 2000;21(12):1191-6.
7. Gandhi RB, Robinson JR. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1994;13(1-2):43-74.
8. Rossi S, Sandri G, Caramella CM. Buccal drug delivery: A challenge already won? *Drug Discovery Today: Technologies*. 2005;2(1):59-65.
9. Teubl BJ, Absenger M, Fröhlich E, Leitinger G, Zimmer A, Roblegg E. The oral cavity as a biological barrier system: Design of an advanced buccal *in vitro* permeability model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013;84(2):386-93.

-
10. Nicolazzo J. *In Vivo* and *In Vitro* Models for Assessing Drug Absorption Across the Buccal Mucosa. *Drug Absorption Studies*. 1 ed: Springer US; 2008. p. 89-111.
 11. Obradovic T. *In Vitro* Models for Investigations of Buccal Drug Permeation and Metabolism. In: Ehrhardt C, editor. *Drug Absorption Studies* 1ed: Springer US; 2008. p. 167-81.
 12. Nicolazzo JA, Reed BL, Finnin BC. Buccal penetration enhancers—How do they really work? *Journal of Controlled Release*. 2005;105(1–2):1-15.
 13. Kulkarni U, Mahalingam R, Pather I, Li X, Jasti B. Porcine buccal mucosa as *in vitro* model: Effect of biological and experimental variables. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99(3):1265-77.
 14. Carsten Ehrhardt, Kwang-Jin K. *Drug Absorption Studies: In Situ, In Vitro and In Silico Models*. Springer, 2007.
 15. Harris D, Robinson JR. Drug Delivery via the Mucous Membranes of the Oral Cavity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 81(1):1-10.
 16. Squier CA. The permeability of keratinized and nonkeratinized oral epithelium to horseradish peroxidase. *Journal of Ultrastructure Research*. 1973;43(1–2):160-77.
 17. Gomez M, Muñoz A. *Histologia, Embriología E Ingeniería Tisular Bucodental*, 3ª edición. Ed. Medica Panamericana, 2008.
 18. Rathbone MJ, Hadgraft J. Absorption of drugs from the human oral cavity. *International Journal of Pharmaceutics*. 1991;74(1):9-24.
 19. Lam JKW, Xu Y, Worsley A, Wong ICK. Oral transmucosal drug delivery for pediatric use. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014;73:50-62.

20. Amores S, Lauroba J, Calpena A, Colom H, Gimeno A, Domenech J. A comparative ex vivo drug permeation study of beta-blockers through porcine buccal mucosa. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;468(1–2):50-4.
21. Veuillez F, Kalia YN, Jacques Y, Deshusses J, Buri P. Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2001;51(2):93-109.
22. Kulkarni U, Mahalingam R, Pather SI, Li X, Jasti B. Porcine buccal mucosa as an *in vitro* model: Relative contribution of epithelium and connective tissue as permeability barriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;98(2):471-83.
23. Sattar M, Sayed OM, Lane ME. Oral transmucosal drug delivery – Current status and future prospects. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;471(1–2):498-506.
24. Şenel S, Kremer MJ, Kaş S, Wertz PW, Hincal AA, Squier CA. Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across buccal mucosa. *Biomaterials*. 2000;21(20):2067-71.
25. de Vries ME, Boddé HE, Verhoef JC, Ponc M, Craane WIHM, Junginger HE. Localization of the permeability barrier inside porcine buccal mucosa: a combined *in vitro* study of drug permeability, electrical resistance and tissue morphology. *International Journal of Pharmaceutics*. 1991;76(1–2):25-35.
26. Lamey PJ, Lewis MAO. 2 - Buccal and sublingual delivery of drugs. In: Salole ATFG, editor. *Routes of Drug Administration*: Butterworth-Heinemann; 1990. p. 30-47.
27. Squier CA. The Permeability of Oral Mucosa. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1991;2:13-32.
28. Shojaei AH. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences*. 1998 1(1):15-30.

-
29. Fernandez F. Nanoemulsiones de nistatina para el tratamiento de candidiasis muco-cutáneas. Barcelona, España: Universidad de Barcelona; 2012.
30. Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK. Buccal bioadhesive drug delivery — A promising option for orally less efficient drugs. *Journal of Controlled Release*. 2006;114(1):15-40.
31. V Sankar VH, K Hull, D Vidovic Juras, MS Greenberg, AR Kerr, PB Lockhart, LL Patton, S Porter, M Thornhill. Local drug delivery for oral mucosal diseases: challenges and opportunities. *Oral Diseases*. 2011;17(s1):73-84.
32. Lee J, Kellaway IW. Buccal permeation of [d-Ala2, d-Leu5]enkephalin from liquid crystalline phases of glyceryl monooleate. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;195(1–2):35-8.
33. Artusi M, Santi P, Colombo P, Junginger HE. Buccal delivery of thiocolchicoside: *in vitro* and *in vivo* permeation studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003;250(1):203-13.
34. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004;56(5):603-18.
35. Needleman IG SF, Martin GP. An investigation of bioadhesion for periodontal and oral mucosal drug delivery. *Journal of clinical periodontology*. 1997;24(6):394-400.
36. Şenel S, Çapan Y, Sargon MF, İkinci G, Şolpan D, Güven O, et al. Enhancement of transbuccal permeation of morphine sulfate by sodium glycodeoxycholate *in vitro*. *Journal of Controlled Release*. 1997;45(2):153-62.
37. Veuillez F, Rieg FF, Guy RH, Deshusses J, Buri P. Permeation of a myristoylated dipeptide across the buccal mucosa: topological distribution and evaluation of tissue integrity. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;231(1):1-9.

38. Attia MA, El-Gibaly I, Shaltout SE, Fetih GN. Transbuccal permeation, anti-inflammatory activity and clinical efficacy of piroxicam formulated in different gels. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;276(1–2):11-28.
39. Şenel S, Hincal AA. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. *Journal of Controlled Release*. 2001;72(1–3):133-44.
40. Amit Kokate XL, Bhaskara Jasti. Effect of Drug Lipophilicity and Ionization on Permeability Across the Buccal Mucosa: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(2):501-4.
41. Goswami T, Jasti BR, Li X. Estimation of the theoretical pore sizes of the porcine oral mucosa for permeation of hydrophilic permeants. *Archives of Oral Biology*. 2009;54(6):577-82.
42. Amores S. Estudio de la permeación de una serie de betabloqueantes a través de mucosa de cerdo: Universidad de Barcelona; 2012.
43. Repka MA, Chen L-I, Chan RS. Buccal Drug Delivery. In: Wilson GC, Crowley JP, editors. *Controlled Release in Oral Drug Delivery*. Boston, MA: Springer US; 2011. p. 329-59.
44. Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Third Edition. Ed. Taylor & Francis ,2006.
45. Castro Ruiz JM, Vallejo Díaz BM, Barbosa Barbosa HJ. Diseño de un sistema bioadhesivo de clorhexidina empleando pullulan como matriz para uso en mucosa oral. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*. 2016;45:48-76.
46. Patel VF, Liu F, Brown MB. Modeling the oral cavity: *In vitro* and *in vivo* evaluations of buccal drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 2012;161(3):746-56.

-
47. Janet Hoogstraate A, Boddé HE. Methods for assessing the buccal mucosa as a route of drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1993;12(1–2):99-125.
48. Kurosaki Y HS, Hamada C, Nakayama T, Kimura T. Studies on drug absorption from oral cavity. II. Influence of the unstirred water layer on absorption from hamster cheek pouch *in vitro* and *in vivo*. *Journal of pharmacobio-dynamics*. 1987;10(4):180-7.
49. Hopfensperger MJ, Messenger KM, Papich MG, Sherman BL. The use of oral transmucosal detomidine hydrochloride gel to facilitate handling in dogs. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*. 2013;8(3):114-23.
50. World Health Organization. Dermal Absorption. WHO/IPCS Environmental Health Criteria 235; 2006. URL: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc235.pdf>. Consultado 22 en septiembre de 2016.
51. Kokate A, Li X, Jasti B. HPLC detection of marker compounds during buccal permeation enhancement studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;47(1):190-4.
52. Nicolazzo JA, Reed BL, Finnin BC. The effect of various *in vitro* conditions on the permeability characteristics of the buccal mucosa. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003;92(12):2399-410.
53. Ceschel GC, Maffei P, Moretti MDL, Demontis S, Peana AT. *In vitro* permeation through porcine buccal mucosa of Salvia desoleana Atzei & Picci essential oil from topical formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;195(1–2):171-7.
54. De Caro V, Giandalia G, Siragusa MG, Paderni C, Campisi G, Giannola LI. Evaluation of galantamine transbuccal absorption by reconstituted human oral epithelium and porcine tissue as buccal mucosa models: Part I. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;70(3):869-73.

55. Gimeno A, Calpena AC, Sanz R, Mallandrich M, Peraire C, Clares B. Transbuccal delivery of doxepin: Studies on permeation and histological investigation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014;477(1–2):650-4.
56. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). Guideline for the testing of chemical. Skin absorption: *in vitro* method. Guideline for the testing of chemicals, Abril 2004. URL: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecdtdg428-508.pdf>. Consultado en Febrero de 2017.
57. Ashihara H, Crozier A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *Trends in Plant Science*.6(9):407-13.
58. Gennaro AR. Remington Farmacia, 20ª Edición. Ed.Medica Panamericana, 2003.
59. Flórez J , Armijo J, Mediavilla A. Farmacología humana, 5a edición. Ed. Elsevier Masson ,2008.
60. US Food and Drug Administration, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), September 2013.URL: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm368107.pdf>. Consultado en Febrero de 2017.
61. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and methodology, November 2005. URL: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. Consultado en Febrero de 2017.
62. Aguirre L, García F, Junca T, Fontanet M, Roca M, Carbó M, Sanfeliu A, Pomar M, Pérez P, Ochoa C, Sánchez M, Forn M, Serrat M, Gonfaus M. Validación de Métodos Analíticos. AEFI, 2001.

-
63. Kulkarni UD, Mahalingam R, Li X, Pather I, Jasti B. Effect of Experimental Temperature on the Permeation of Model Diffusants Across Porcine Buccal Mucosa. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(2):579-86.
64. Amores S, Domenech J, Colom H, Calpena AC, Clares B, Gimeno Á, et al. An improved cryopreservation method for porcine buccal mucosa in ex vivo drug permeation studies using Franz diffusion cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;60:49-54.
65. Franz-Montan M, Serpe L, Martinelli CCM, da Silva CB, Santos CPd, Novaes PD, et al. Evaluation of different pig oral mucosa sites as permeability barrier models for drug permeation studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;81:52-9.
66. Ministerio de Salud Republica de Colombia. Resolución N° 8430 de 1993. URL : https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/RESOLUCION%208430%20DE%201993.pdf. Consultado en Febrero de 2017.
67. Ventura R, Jiménez C, Closas N, Segura J, De la Torre R. Stability studies of selected doping agents in urine: caffeine. *Journal of Chromatography B*. 2003;795(2):167-77.
68. Jasti BR, Zhou S-I, Mehta RC, Li X. Permeability of antisense oligonucleotide through porcine buccal mucosa. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000;208(1-2):35-9.
69. Oh JY, Kim MK, Shin KS, Shin MS, Wee WR, Lee JH, et al. Efficient Cryopreservative Conditions for Cultivated Limbal and Conjunctival Epithelial Cells. *Cornea*. 2007;26(7):840-6.
70. Nazarpour R, Zabihi E, Alijanpour E, Abedian Z, Mehdizadeh H, Rahimi F. Optimization of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Cryopreservation. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 2012;1(2):88-93.

71. Baena Y, Dallos LJ, Manzo RH, Ponce D'León LF. Estandarización de celdas de Franz para la realización de ensayos de liberación de fármacos a partir de complejos con polielectrolitos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*. 2011;40:174-88.
72. Naik JP. Improved high-performance liquid chromatography method to determine theobromine and caffeine in cocoa and cocoa products. *J Agric Food Chem*. 2001;49(8):3579-83.
73. Steehler JK. Ewing's Analytical Instrumentation Handbook, 3rd Edition (Cazes, Jack). *Journal of Chemical Education*. 2005;82(9):1315.
74. Valcárcel M, Gómez A. Técnicas analíticas de separación. Ed. Reverte, 1988.
75. Netzlaff F, Kostka K-H, Lehr C-M, Schaefer UF. TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells *in vitro*. Limitations shown by transport data testing. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006;63(1):44-50.
76. Elmahjoubi E, Frum Y, Eccleston GM, Wilkinson SC, Meidan VM. Transepidermal water loss for probing full-thickness skin barrier function: Correlation with tritiated water flux, sensitivity to punctures and diverse surfactant exposures. *Toxicology in Vitro*. 2009;23(7):1429-35.
77. Davies DJ, Heylings JR, McCarthy TJ, Correa CM. Development of an *in vitro* model for studying the penetration of chemicals through compromised skin. *Toxicology in Vitro*. 2015;29(1):176-81.
78. Pinnagoda J, Tupker RA, Coenraads PJ, Nater JP. Comparability and reproducibility of the results of water loss measurements: a study of 4 evaporimeters. *Contact Dermatitis*. 1989;20(4):241-6.

-
79. Miteva M, Richter S, Elsner P, Fluhr JW. Approaches for optimizing the calibration standard of Tewameter TM 300. *Experimental Dermatology*. 2006;15(11):904-12.
80. Figueiras A, Hombach J, Veiga F, Bernkop-Schnürch A. *In vitro* evaluation of natural and methylated cyclodextrins as buccal permeation enhancing system for omeprazole delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009;71(2):339-45.
81. Diaz del Consuelo I, Pizzolato G-P, Falson F, Guy RH, Jacques Y. Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;94(12):2777-88.
82. Marxen E, Axelsen MC, Pedersen AML, Jacobsen J. Effect of cryoprotectants for maintaining drug permeability barriers in porcine buccal mucosa. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;511(1):599-605.
83. Caon T, Simões CMO. Effect of Freezing and Type of Mucosa on Ex Vivo Drug Permeability Parameters. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(2):587-92.
84. Lee J, Lww SK, Choi YW. The effect of storage conditions on the permeability of porcine buccal mucosa. *Archives of Pharmacal Research*. 2002;25(4):546.
85. Gurtovenko AA, Anwar J. Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007;111(35):10453-60.

Anexo A: Datos asociados a la validación de la metodología analítica.

• ENSAYOS PRELIMINARES DE CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

A continuación, se presentan las condiciones preliminares que se evaluaron para elegir el método cromatográfico adecuado para el ensayo de permeación, basándose en una revisión de bibliografía preliminar.

ENSAYO PRELIMINAR A

Fase móvil: *Buffer* de fosfato: metanol (60:40)

Columna cromatográfica: Kromasil® C₁₈, de 4.6 x 150 mm y 5 µm de tamaño de partícula

Temperatura: 30°C

Flujo: 1 mL/min

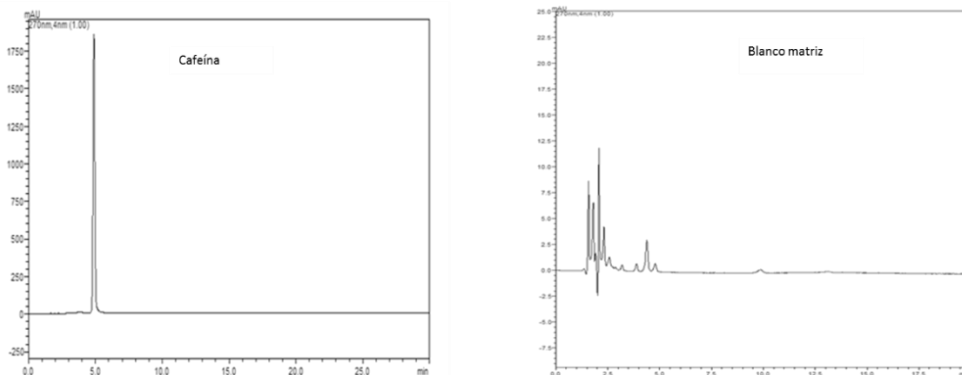
Volumen de inyección: 10 µL

Longitud de onda: 273 nm.

Método Rechazado por no cumplir con selectividad

Referencia bibliográfica: Upendra et al.(22)

Figura A-1: Cromatogramas de cafeína y mucosa obtenido en ensayo preliminar A.



ENSAYO PRELIMINAR B

Fase móvil: Metanol:0.057% H₃PO₄ (22:78)

Columna cromatográfica: Kromasil® C₁₈, de 4.6 x 150 mm y 5 µm de tamaño de partícula

Temperatura: 30°C

Flujo: 1 mL/min

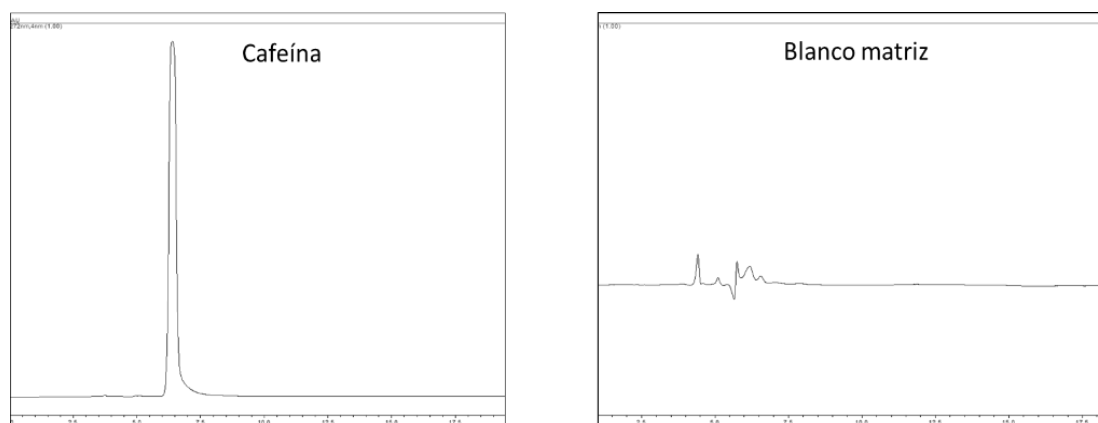
Volumen de inyección: 10 µL

Longitud de onda: 273 nm

Método Rechazado por no cumplir con selectividad

Referencia bibliográfica: Nicolazzo et al. (52)

Figura A-2: Cromatogramas de cafeína y mucosa obtenidos en ensayo preliminar B



ENSAYO PRELIMINAR C

Fase móvil: agua- acetonitrilo (80:20)

Columna cromatográfica: Kromasil® C₁₈, de 4.6 x 150 mm y 5 µm de tamaño de partícula

Temperatura: 30°C

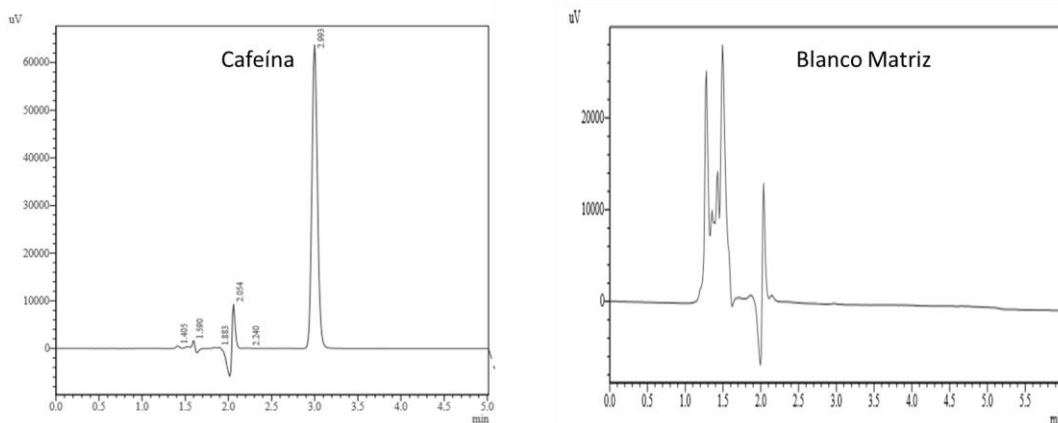
Flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección: 10 µL

Longitud de onda: 273 nm

*Método aceptado por cumplir con idoneidad del sistema y características de desempeño**(Ver Validación de metodología analítica)*

Referencia bibliográfica: Ventura et al.(67)

Figura A-3: Cromatogramas de cafeína y mucosa obtenidos en ensayo preliminar C

Las condiciones cromatográficas seleccionadas correspondieron al ensayo C, debido a que con el ensayo A y B, se presentaban interferencias en el tiempo de retención de la cafeína, además con el método elegido se presentaba un tiempo de corrida corto lo cual era practico para el ensayo considerando que para el estudio de permeación se debían analizar un amplio número de muestras dado que cada perfil tenía nueve puntos de muestreo y se debían hacer por triplicado; además de estar compuesta la fase móvil principalmente por Agua, lo cual era conveniente para tener un uso óptimo de recursos económicos.

Tabla A-1: Datos para elaborar las curvas de calibración de sistema y del método

<i>NIVEL</i>	<i>Concentración (µg/mL)</i>	<i>Áreas sistema</i>	<i>Áreas método</i>
1	0.5	15911	16236
		15665	15418
		16286	15791
2	2.5	72810	73021
		70504	70317
		69777	70414
3	5	143597	143695
		144407	144703
		144227	144634
4	10	294751	293191
		290909	286802
		290969	289413
5	25	714498	742001
		746427	714732
		728209	731541
6	50	1444920	1439968
		1448927	1450824
		1451219	1450813

Tabla A-2: Datos para precisión intermedia del sistema

		ANALISTA A			ANALISTA B			
		0.5 µg/mL	10 µg/mL	50 µg/mL	0.5 µg/mL	10 µg/mL	50 µg/mL	
ÁREA	DIA 1	15911	294751	1444920	16764	292408	1468773	
		15665	290909	1448927	17143	309432	1452056	
		16286	290969	1451219	16162	291246	1445348	
	DIA 2	16295	291444	1448521	14171	291552	1466082	
		15190	290620	1464178	18289	292515	1454845	
		15279	311028	1464045	15694	294558	1457680	
	DIA 3	17146	286733	1421619	15780	289259	1459281	
		15038	286259	1466499	14767	282126	1424046	
		16138	291874	1440157	16263	291848	1435067	
		Promedio	15883.11	292731.89	1450009.44	16114.78	292771.56	1451464.22
		Desv. Estándar	670.80	7331.40	14157.55	1230.55	7170.19	14503.56
		C.V (%)	0.04	0.03	0.01	0.08	0.02	0.01

Tabla A-3: Datos para precisión intermedia del método

		ANALISTA A			ANALISTA B			
		0.5 µg/mL	10 µg/mL	50 µg/mL	0.5 µg/mL	10 µg/mL	50 µg/mL	
ÁREA	DIA 1	16236	293191	1439968	14476	289698	1421677	
		15418	286802	1450824	14551	291019	1391516	
		15791	289413	1450813	14559	288335	1387776	
	DIA 2	15332	286214	1442403	15422	284319	1402528	
		14453	285935	1482228	16473	286571	1396008	
		14219	284647	1437048	15535	284776	1408079	
	DIA 3	15901	289512	1438238	14981	294121	1439506	
		15947	290329	1450037	14838	295201	1434977	
		15892	293883	1413708	14641	283937	1413357	
		Promedio	15465.4	288880.6	1445029.6	15052.8	288664.1	1410602.6
		Desv. Estándar	698.393	3248.361	18025.021	655.268	4182.634	18471.833
		C.V (%)	0.045	0.011	0.012	0.044	0.014	0.013

Tabla A-4: Datos para elaborar las curvas de calibración de sistema y del método a bajas concentraciones

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas sistema	Áreas método
0.1	3126	3017
	3220	3256
	3026	3180
	3288	3195
	3168	3165
	3116	3267
0.2	6325	6316
	6275	6225
	6152	6328
	6311	6291
	6388	6338
	6316	6187
0.3	9325	9399
	9301	9422
	9363	9330
	9473	9483
	9311	9339
	9474	9386
0.4	12665	12694
	12601	12606
	12532	12582
	12596	12527
	12695	12671
	12646	12659

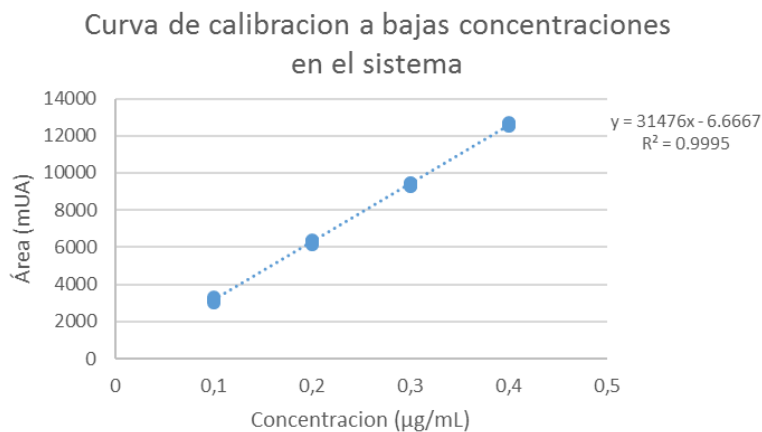
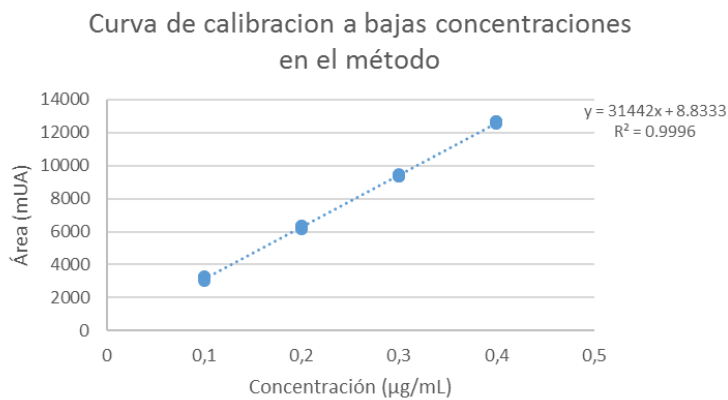
Figura A-4: Curva de calibración para linealidad del sistema a bajas concentraciones**Figura A-5:** Curva de calibración para linealidad del método a bajas concentraciones

Tabla A-5: Datos para elaborar las curvas de calibración de sistema y del método a bajas concentraciones

	Ho	t estimado	t tabla	Criterio
<i>Intercepto</i>	$a=0$	-0.159	2.0739	No se rechaza Ho
<i>Pendiente</i>	$b=0$	205.807	2.0739	Se rechaza Ho
<i>Correlación</i>	No existe correlación entre X-Y	62.053	2.0739	Se rechaza Ho

Tabla A-6: Prueba t para evaluar linealidad del método a bajas concentraciones

	Ho	t estimado	t tabla	Criterio
<i>Intercepto</i>	$a=0$	0.236	2.0739	No se rechaza Ho
<i>Pendiente</i>	$b=0$	230.07	2.0739	Se rechaza Ho
<i>Correlación</i>	No existe correlación entre X-Y	69.369	2.1199	Se rechaza Ho

Tabla A-7: ANOVA de la regresión lineal para el sistema a bajas concentraciones, prueba de F

FUENTE	DF	SC	CM	Fo	Ft
<i>Regresión</i>	1	297212130.1	297212130.1	42356.592	4.3
<i>Error experimental</i>	22	154371.883	7016.904		
<i>Desvió de linealidad</i>	2	33636.05	16818.025	2.786	3.49
<i>Error puro</i>	20	120735.833	6036.791		
<i>Total</i>	23	297366502			

Tabla A-8: ANOVA de la regresión lineal para el método a bajas concentraciones, prueba de F.

FUENTE	DF	SC	CM	Fo	Ft
Regresión	1	296576665	296576665	52932.643	4.3
Error experimental	22	123263.95	5602.906818		
Desvío de linealidad	2	28407.45	14203.725	2.995	3.49
Error puro	20	94856.5	4742.825		
Total	23	296699929			

Tabla A-9: Test de Cochran para la evaluación de la precisión del sistema a bajas concentraciones.

	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)			
	0.1	0.2	0.3	0.4
Áreas	3126	6325	9325	12665
	3220	6275	9301	12601
	3026	6152	9363	12532
	3288	6311	9473	12596
	3168	6388	9311	12695
	3116	6316	9474	12646
Promedio	3157.333	6294.5	9374.5	12622.5
Desv.estandar	90.613	78.859	79.523	58.257
Varianza (S^2)	8210.667	6218.7	6323.9	3393.9
C.V (%)	2.87	1.253	0.848	0.462
	G_{exp}	0.34		
	G_{tab}	0.5895		
	RSD_P	1.681		

Tabla A-10: Test de Cochran para la evaluación de la precisión en el método a bajas concentraciones

	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)			
	0.1	0.2	0.3	0.4
Áreas	3017	6316	9399	12694
	3256	6225	9422	12606
	3180	6328	9330	12582
	3195	6291	9483	12527
	3165	6338	9339	12671
	3267	6187	9386	12659
Promedio		15815	289802	1447201.67
Desv. estandar		409.528	3212.214	6264.541
Varianza (S^2)		167713	10318321	39244480.3
C.V (%)		2.589	1.108	0.4329

G_{exp}	0.426
G_{tab}	0.5895
RSD_p	1.585

Exactitud a bajas concentraciones

Se calculó mediante comparación de las pendientes de las curvas de calibración del sistema y del método, obteniendo un 99.9% de recuperación.

Tabla A-11: Datos de estabilidad a corto plazo (Automuestreador)

SISTEMA	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	N° de réplica	ÁREA CAFEÍNA		
			t1 (0h)	t2 (6h)	t3 (24h)
	25	Réplica 1	708063	707051	707321
		Réplica 2	716418	716344	716543
		Réplica 3	710966	710848	710729
		Promedio	711815.7	711414.3	711531
		% inicial	100	99.94	99.96
		% pérdida/ ganancia	0	-0.06	-0.04
	0.5	Réplica 1	15182	15179	15125
		Réplica 2	15022	14566	14866
		Réplica 3	14619	14936	14417
		Promedio	14941	14893.66	14802.66
		% inicial	100	99.68	99.07
		% pérdida/ ganancia	0	-0.31	-0.92
MÉTODO	25	Réplica 1	733671	731533	732426
		Réplica 2	727288	727785	727792
		Réplica 3	725195	723397	721255
		Promedio	728718	727571.7	727157.7
		% inicial	100	99.84	99.78
		% pérdida/ ganancia	0	-0.16	-0.21
	0.5	Réplica 1	14371	14333	14258
		Réplica 2	15557	15580	15411
		Réplica 3	15500	15153	15069
		Promedio	15142.66	15022	14912.66
		% inicial	100	99.20	98.48
		% pérdida/ ganancia	0	-0.80	-1.52

Tabla A-12: Datos de estabilidad de la cafeína a largo plazo

SISTEMA	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	N° de réplica	ÁREA CAFEÍNA			
			Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
25		Réplica 1	736485	730078	729788	729586
		Réplica 2	727217	724706	723745	723535
		Réplica 3	725097	712370	712281	712763
		Promedio	729599.67	722384.67	721938.00	721961.33
		% inicial	100.00	99.01	98.03	97.06
		% pérdida/ ganancia	0.00	-0.99	-1.97	-2.94
		0.5	Réplica 1	14565	14496	14478
Réplica 2	16399	15991	15858	15786		
Réplica 3	15549	15379	15278	15265		
Promedio	15504.33	15288.67	15204.67	15178.00		
% inicial	100.00	98.61	98.07	97.90		
% pérdida/ ganancia	0.00	-1.39	-1.93	-2.10		
MÉTODO	25	Réplica 1	703070	706310	705250	704971
		Réplica 2	714729	710911	710034	710446
		Réplica 3	713196	709389	708776	707492
		Promedio	710331.67	708870.00	708020.00	707636.33
		% inicial	100.00	99.79	99.67	99.62
		% pérdida/ ganancia	0.00	-0.21	-0.33	-0.38
		0.5	Réplica 1	14561	14481	14226
	Réplica 2	16337	16243	16204	16165	
	Réplica 3	17961	17472	17297	17290	
	Promedio	16286.33	16065.33	15909.00	15858.00	
	% inicial	100.00	98.64	97.68	97.37	
	% pérdida/ ganancia	0.00	-1.36	-2.32	-2.63	

Tabla A-13: Datos de la estabilidad durante el ensayo de permeación bucal *in vitro*.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	N° de réplica	ÁREA CAFEÍNA	
		t1 (0 h)	t2 (4 h)
25	Réplica 1	730867	734402
	Réplica 2	723260	724224
	Réplica 3	721767	718699
	Promedio	725298	725775
	% inicial	100	100.0657661
	% pérdida/ ganancia	0	0.066
0.5	Réplica 1	15997	15097
	Réplica 2	14123	14946
	Réplica 3	14540	15139
	Promedio	14886.66667	15060.66667
	Porcentaje inicial	100	101.17
	Porcentaje de pérdida/ganancia	0	1.17

Anexo B: Datos de la determinación de pérdida de agua transmucosa

Tabla B-1: Pérdida de agua transmucosa (TMWL) en mucosas intactas y dañadas.

MUCOSA	TMWL MUCOSA INTACTA (g/h/m ²)	TMWL MUCOSA DAÑADA (g/h/m ²)
1	47.94	58.40
2	49.07	59.32
3	52.69	56.10
4	48.50	53.80
5	38.76	50.93
6	51.42	51.58
7	48.95	59.96
8	47.90	53.54
9	52.10	52.79
10	40.00	53.16
11	43.53	51.87
12	43.20	51.22
13	47.03	67.90
14	47.07	61.37
15	47.36	63.21
Promedio	47.04	56.30
S	4.10	5.10