

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la permeación de cafeína a partir de productos cosméticos comerciales con acción lipolítica empleando ensayos *in vitro* en celdas de difusión de Franz

Heinny Estefanía León Merchan

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2022

Evaluación de la permeación de cafeína a partir de productos cosméticos comerciales con acción lipolítica empleando ensayos *in vitro* en celdas de difusión de Franz

Heinny Estefanía León Merchan

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Directora:

Q.F. MSc. PhD. Yolima Baena Aristizábal

Codirectora:

Q.F. MSc. Liliana Astrid Martín Reyes

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación Sistemas para Liberación Controlada de Moléculas
Biológicamente Activas (SILICOMOBA)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2022

A mi familia,

'Nunca te arrepientas de un día en tu vida. Los buenos días dan felicidad, los malos días dan experiencias, los peores días dan lecciones y los mejores días dan recuerdos'

Richard Feynman, nobel de física 1955

Agradecimientos

Agradezco a mis padres Wilson y Cristina, su sacrificio y esfuerzo me llevaron a ser la persona que soy, todo siempre será por y para ustedes. A mis hermanos Carol, Cristian y Joel y a mi compañero de vida Anderson Agudelo con quien construí este sueño. Ustedes fueron la fuerza y el temple que necesité para continuar este viaje, agradezco infinitamente su apoyo incondicional, su amor y paciencia. Agradezco a Dios, por ponerme en manos de esta hermosa familia, y por permitirme conocer personas maravillosas que compartieron conmigo un poco de su sabiduría.

Un profundo agradecimiento a la profesora Yolima Baena, por aceptar la dirección del proyecto, por creer siempre en mí, su apoyo y orientación me guiaron en el curso de este trabajo, y sus palabras y confianza me motivaron a continuar hasta el final. Le agradezco sus enseñanzas que enriquecieron mi formación y su trato generoso y cálido que me hicieron sentir parte de su familia.

A la profesora Liliana Martín, quien acepto codirigir la investigación y compartió conmigo su conocimiento y su valiosa experiencia.

De manera especial quiero agradecer a la profesora Ángela Mora, quien me brindó su acompañamiento y orientación, sus enseñanzas fueron fundamentales para el desarrollo del proyecto, agradezco su guía, su disposición y el tiempo que me dedicó.

A mi querida amiga Natalia Linares, la personificación del temple y la fortaleza. Gracias Nata, por estar siempre dispuesta a ayudarme, porque a pesar de toda la complejidad de su propia investigación siempre tuvo tiempo para apoyar la mía. Agradezco sus palabras, su consejo y amistad, la que atesoro y conservaré toda la vida.

A Lau Martínez, Jors Vargas, Alejo Güiza y Lina Sanabria por su amistad y su apoyo, conocerlos fue una de las mejores experiencias de este trayecto. A mi amiga Marce Mesa,

por su disposición para ayudarme y por compartir conmigo tardes de laboratorio olvidadas del pregrado.

Al profesor Álvaro Orjuela del Departamento de Ingeniería Química, por su amable disponibilidad y ayuda, por darme la primera oportunidad para conocer el mundo cosmético del que me enamoré.

A las personas que participaron en la evaluación sensorial, por su disposición para el desarrollo de la prueba.

Al Departamento de Farmacia y su personal Docente, por acogerme como su alumna, por facilitarme el acceso a las instalaciones y equipos, y por permitirme aprender y conocer el mundo que me apasiona.

A la Universidad Nacional De Colombia, mi Alma Máter, quien me brindó la oportunidad de formarme en toda mi educación superior, que poco a poco me fue llevando por el camino que estoy culminando.

A todos mis familiares, amigos y compañeros que compartieron su valioso tiempo y sabiduría para culminar con éxito esta etapa de mi formación.

Resumen

Evaluación de la permeación de cafeína a partir de productos cosméticos comerciales con acción lipolítica empleando ensayos *in vitro* en celdas de difusión de Franz

En el mercado colombiano se comercializan cosméticos con proclamas lipolíticas que presentan en sus ingredientes cafeína, un compuesto ampliamente utilizado por su acción sobre los mecanismos de acumulación de grasa en el adipocito. Para cumplir con el efecto cosmético prometido, el ingrediente debería poder permear a la hipodermis donde se encuentran las células adiposas, no obstante, esto también implicaría que la cafeína presente en estos productos podría alcanzar el fluido sistémico, causando contravención con la definición de cosméticos según la legislación nacional.

En este sentido, se seleccionaron siete productos del mercado colombiano con proclamas lipolíticas que contienen cafeína, con el objetivo de recolectar información sobre la concentración de ésta que podría alcanzar la hipodermis y/o el fluido sistémico al ser aplicados sobre la piel. El desarrollo metodológico incluyó, la realización de ensayos *in vitro* en celdas de difusión de Franz con dos espesores diferentes de membrana, una con tejido hipodérmico y otra sin éste, determinando la concentración permeada bajo una aplicación de dosis en condiciones de uso. Así mismo, se realizó la caracterización fisicoquímica de los productos elegidos en términos de pH, parámetros reológicos, microestructura, percepción sensorial y fórmula cualicuantitativa, para establecer una correlación entre el comportamiento de permeación y las características propias del vehículo.

El estudio de caracterización de la fórmula de los productos evidenció que tres ellos no presentan un contenido de cafeína superior al 0,009 [%w/w] bajo el método de extracción desarrollado. Los demás productos presentaron concentraciones de cafeína superiores al 0,39 [%w/w] y fueron evaluados en ensayos de liberación y permeación, demostrando que

la cafeína efectivamente se libera del producto, pero la que logra alcanzar la capa hipodérmica con respecto a la dosis aplicada es inferior al 1%, excepto para un producto que obtuvo un porcentaje del 10 probablemente a causa de sus propiedades fisicoquímicas. No obstante, la concentración de cafeína que se encontró en la capa hipodérmica es menor a la concentración estudiada en los reportes encontrados en la literatura que puede causar un efecto del tipo lipolítico, por lo que no es seguro que pudiese generar el efecto proclamado. Por otro lado, se determinó que la cafeína de estas formulaciones tópicas podría alcanzar el fluido sistémico. En conjunto, los resultados demuestran la importancia de formular adecuadamente un producto que permita la entrega del ingrediente funcional en la capa objetivo, y el valor de implementar este tipo de herramientas *in vitro* para contribuir con información relacionada con la seguridad y eficacia, con miras a fortalecer los programas de cosmetovigilancia.

Palabras clave: cafeína, cosméticos lipolíticos, celdas de difusión de Franz, caracterización fisicoquímica, gel, emulgel, validación analítica.

Abstract

Evaluation of caffeine permeation from commercial cosmetic products with lipolytic action using *in vitro* assays in Franz diffusion cells

Cosmetics with lipolytic claims that contain caffeine in their ingredients are commercialized in the Colombian market. Caffeine is a compound widely used for its action on the mechanisms of fat accumulation in the adipocyte. To fulfill the promised cosmetic effect, the ingredient should be able to permeate the hypodermis where the adipose cells are, however, this would also imply that the caffeine present in these products could reach the systemic fluid, causing contravention with the definition of cosmetics under national legislation.

In this context, seven products from the Colombian market with lipolytic claims containing caffeine were selected, with the aim of collecting information on the concentration of caffeine that could reach the hypodermis and/or the systemic fluid when the product is applied to the skin. The methodological development includes *in vitro* testing in Franz diffusion cells with two different membrane thicknesses, one with hypodermic tissue and the other without it, determining the permeated concentration under a dose application under conditions of use. It also includes the physicochemical characterization of the products chosen in terms of pH, rheological parameters, microstructure, sensory perception and qualitative-quantitative formula, to establish a correlation between permeation behavior and vehicle characteristics.

The characterization study of the formula of the products evidence that three of them do not present a caffeine content greater than 0,009 [%w/w] under the extraction method developed. The other products had caffeine concentrations higher than 0,39 [%w/w] and were evaluated in release and permeation trials, showing that caffeine is effectively released from the product, but that the caffeine that reaches the hypodermic layer with respect to the applied dose is less than 1%, except for a product which obtained a percentage of 10 because of its physicochemical properties. However, the concentration

of caffeine found in the hypodermic layer is lower than the concentration studied in the reports found in the literature that can cause a lipolytic-type effect, so it is not certain that it could generate the proclaimed effect. On the other hand, it was determined that the caffeine of these topical formulations could reach the systemic fluid. All these results demonstrate the importance of formulating a suitable product that allows the delivery of the functional ingredient in the target layer, and the value of implementing such *in vitro* tools to contribute information related to safety and efficacy to strengthen cosmetovigilance programs.

Keywords: caffeine, lipolytic cosmetics, Franz diffusion cells, physicochemical characterization, gel, emulgel, analytical validation.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVIII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XX
Introducción	1
1. Capítulo 1. Generalidades	5
1.1 La piel	5
1.1.1 Barrera de permeabilidad de la piel	6
1.1.2 Permeación de sustancias a través de la piel	7
1.2 Evaluación <i>in vitro</i> de la permeación cutánea.....	10
1.3 Cafeína	13
1.3.1 Toxicología de la cafeína	14
1.3.2 Cafeína en productos lipolíticos	15
1.3.3 Penetración de la cafeína a través de la barrera de la piel.....	16
2. Capítulo 2. Objetivos	21
2.1 Objetivo General	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3. Capítulo 3. Materiales y métodos	22
3.1 Materiales	22
3.1.1 Equipos	22
3.1.2 Reactivos.....	22
3.1.3 Material biológico.....	23
3.1.4 Consideraciones éticas.....	23
3.2 Métodos	24
3.2.1 Selección y caracterización de los productos.....	25
3.2.2 Ensayos en celdas de difusión.....	35
4. Capítulo 4. Resultados y discusión	43
4.1 Selección y caracterización de los productos	43
4.1.1 pH.....	43
4.1.2 Parámetros reológicos.....	44
4.1.3 Atributos sensoriales	54
4.1.4 Fórmula cualicuantitativa – Cuantificación de la cantidad de cafeína.....	60

4.1.5	Caracterización de microestructura por microscopía electrónica de barrido ..	89
4.2	Ensayos en celdas de difusión	91
4.2.1	Condiciones de ensayo	92
4.2.2	Validación de la metodología de cuantificación	94
4.2.3	Ensayos de liberación	97
4.2.4	Ensayos de permeación	99
4.3	Relación entre el comportamiento de permeación y las propiedades del vehículo	111
5.	Conclusiones y recomendaciones	117
5.1	Conclusiones	117
5.2	Recomendaciones	120
A.	Anexo A: Prueba de percepción sensorial.....	121
B.	Anexo B: Formulaciones de geles fabricados en el laboratorio.....	127
C.	Anexo C: Datos asociados a la extracción de cafeína de los productos	129
D.	Anexo D: Validación del método de cuantificación para los ensayos de difusión.....	133
E.	Anexo E: Datos asociados a los ensayos de difusión	146
	Bibliografía	151

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Estructura de la piel. Adaptada de [16]	6
Figura 1-2: Celda de difusión de Franz. Elaboración propia.....	11
Figura 1-3: Estructura química de la cafeína. adaptada de [34]	14
Figura 3-1: Esquema metodológico	25
Figura 4-1: Valor de pH obtenido para los siete productos seleccionados del mercado colombiano.....	44
Figura 4-2: Perfil de extensibilidad que corresponde al incremento del diámetro en función del peso aplicado para los siete productos evaluados.....	45
Figura 4-3: Adherencia de los productos evaluados.	47
Figura 4-4: Perfil de viscosidad en función del esfuerzo cortante para los siete productos del mercado y un gel de prueba fabricado en el laboratorio (GP) con 0,5 % de carbómero y algunos ingredientes en común de los productos comerciales.	48
Figura 4-5: Curvas de flujo, esfuerzo cortante en función de la velocidad de corte (ambos ejes en escala logarítmica) para los siete productos evaluados y el gel de prueba fabricado en el laboratorio (GP).....	50
Figura 4-6: Módulos de a) viscosidad (G'') y b) elasticidad (G') en función de la frecuencia para los siete productos del mercado y el gel de prueba fabricado en el laboratorio (GP).....	52
Figura 4-7: Módulos de a) viscosidad (G'') y b) elasticidad (G') en función de la velocidad de corte para una frecuencia fija de 1 Hz para los siete productos evaluados y el gel de prueba fabricado en el laboratorio (GP).....	53
Figura 4-8: Distribución de la intensidad de atributo percibida por los encuestados para cada producto evaluado.	55
Figura 4-9: Diagramas box-plot que muestran la existencia de significancia entre dos productos evaluados para los atributos a) Consistencia b) Transparencia c) Pegajosidad d) Viscosidad e) Absorción f) Viscosidad.....	59
Figura 4-10: Curva de calibración preliminar de cafeína en agua: etanol (80:20).....	64
Figura 4-11: Cromatogramas correspondientes a las extracciones a) A, b) B, y c) C para el gel de prueba.....	65
Figura 4-12: Cromatogramas de los ensayos preliminares del contenido de cafeína obtenido por la metodología B para los productos del mercado a) 01AZ, b) 02EB, c) 03NA, d) 04HV, e) 05CA, f) 06AD, y g) 07AR.....	66

Figura 4-13: Cromatogramas de los ensayos preliminares del contenido de cafeína obtenido por la metodología C sin extracción en fase sólida (SPE) para los productos del mercado a) 01AZ, b) 02EB, c) 03NA, d) 04HV, e) 05CA, f) 06AD y g) 07AR.	67
Figura 4-14: Cromatogramas para el gel de prueba: a) extracción C, b) extracción en fase sólida (SPE) fase 3 carga C) extracción SPE fase 4 elución d) pureza cromatográfica de la señal de cafeína extracción C y e) pureza cromatográfica para la señal de cafeína fase 4 de la extracción SPE.	69
Figura 4-15: Cromatogramas del ensayo de extracción para geles comerciales que demostraron un contenido de cafeína superior al 0,009%w/w. Producto 02EB a) extracción B, b) extracción en fase sólida (SPE) fase 3, c) extracción SPE fase 4. Producto 04HV d) extracción C, e) extracción SPE fase 3, f) extracción SPE fase 4. Producto 05CA g) extracción C, h) extracción SPE fase 3, i) extracción SPE fase 4. Producto 06AD j) extracción C, k) extracción SPE fase 3, l) extracción SPE fase 4.	70
Figura 4-16: Método desarrollado para la extracción de cafeína a partir de geles cosméticos.	72
Figura 4-17: Cromatogramas correspondientes a: (A) gel placebo, (B) solución de cafeína en etanol, (C) gel madre, (D) gel bajo condiciones de estrés, (E) 01AZ, (F) 02EB, (G) 03NA, (H) 04HV, (I) 05CA, (J) 06AD y (K) 07AR.	73
Figura 4-18: Gráficas de pureza de señal correspondientes a: a) solución de cafeína en etanol, b) solución extraída del gel madre, c) solución extraída del gel bajo condiciones de estrés, d) solución extraída del producto 01AZ, e) solución extraída del producto 02EB, f) solución extraída del producto 03NA, g) solución extraída del producto 04HV, h) solución extraída del producto 05CA, i) solución extraída del producto 06AD.	75
Figura 4-19: Topogramas correspondientes a: a) gel placebo, b) solución de cafeína en etanol y solución extraída de c) gel madre, d) gel bajo condiciones de estrés, e) producto 01AZ, f) producto 02EB, g) producto 03NA, h) producto 04HV, i) producto 05CA, j) producto 06AD, k) producto 07AR.	77
Figura 4-20: Curvas de regresión para el sistema y método.	79
Figura 4-21: Micrografías a 1000 y 5000 aumentos para los productos a) 02EB, b) 04HV, c) 05CA; d) micrografías a 500 y 1000 aumentos para el gel 06AD.	90
Figura 4-22: Perfil de liberación de cafeína para los geles 02EB, 04HV, 05CA y 06AD. Se representan los valores medios \pm desviación estándar con n=3.	98
Figura 4-23: Celdas de difusión de Franz con dos espesores de membrana a) membrana con tejido hipodérmico (DEH) y b) membrana dermoepidérmica (DE).	100
Figura 4-24: Valores medidos de TEWL para membranas: dermoepidérmica (DE), y dermoepidérmica con tejido hipodérmico (DEH) en estado intacto y no íntegro.	101
Figura 4-25: Valor de la respuesta instrumental para los ensayos preliminares y finales de permeación de cafeína de los productos 02EB y 06AD con los dos tipos de membrana evaluados dermoepidérmica (DE) y con hipodermis (DEH).	102
Figura 4-26: Porcentaje máximo de cafeína respecto a la dosis aplicada encontrado en el fluido receptor durante el ensayo para los cuatro productos con los dos tipos de membrana evaluados dermoepidérmica (DE) y con hipodermis (DEH).	105

Figura 4-27: Perfil de permeación para los productos evaluados, concentración de cafeína encontrada en receptor [%w/w] respecto al tiempo del ensayo para, a) membrana dermoepidérmica (DE), b) membrana con tejido hipodérmico (DEH).	106
Figura 4-28: Perfil de permeación individual para cada producto evaluado en ensayos paralelos con dos espesores de membrana, membrana dermoepidérmica (DE) y membrana con tejido hipodérmico (DEH). a) 02EB, b) 04HV, c) 05CA y d) 06AD.	107
Figura 4-29: Cafeína retenida en la capa hipodérmica para cada tiempo de muestreo de los productos evaluados en %w/w. En el eje secundario se encuentra la concentración de cafeína encontrada para el gel 06AD en la capa hipodérmica.	109

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Propiedades fisicoquímicas de la cafeína [32]	14
Tabla 3-1: Niveles de la curva de calibración para el sistema preparados a partir de una solución madre de cafeína de 500 µg/mL.....	31
Tabla 3-2: Cantidad a pesar de gel para cada nivel de la curva de calibración para el método preparados a partir de gel madre con 0,18 % de cafeína.	31
Tabla 3-3: Criterios de evaluación estadística para los parámetros de linealidad.	32
Tabla 3-4: Criterios de evaluación estadística para determinar la idoneidad de la exactitud.	34
Tabla 3-5: Niveles de la curva de calibración preparados a partir de una solución madre de concentración de 0,025 mg/mL.	38
Tabla 4-1: Parámetros de la regresión lineal para el perfil de extensibilidad de los productos evaluados.....	46
Tabla 4-2: Valor promedio de viscosidad y su desviación (n=3).....	48
Tabla 4-3: Parámetros del modelo de Ostwald para los siete productos del mercado y el gel de prueba fabricado en el laboratorio (GP).....	50
Tabla 4-4: Resultados de la prueba de Friedman para los seis atributos evaluados...	57
Tabla 4-5: Resultados para el efecto Friedman: Kendall de magnitud de coincidencia.	57
Tabla 4-6: Ingredientes presentes en más de dos productos comerciales y su función declarada en la base de datos de referencia COSING.....	61
Tabla 4-7: Características fisicoquímicas de los solventes presentes en los productos comerciales [90]–[94].....	64
Tabla 4-8: Concentración en peso a peso de cafeína encontrada para los geles comerciales para el ensayo preliminar con las metodologías B y C.	68
Tabla 4-9: Prueba de significancia t de Student para evaluar la linealidad del sistema y método.	79
Tabla 4-10: Resultados del análisis de varianza ANOVA para el sistema y el método.	80
Tabla 4-11: Resultados de la respuesta instrumental de inyecciones sucesivas de cafeína.	81
Tabla 4-12: Resultados de la prueba de Cochran para repetibilidad del método.	82
Tabla 4-13: Resultados de la precisión intermedia.	83
Tabla 4-14: Resultados del porcentaje de recuperación de tres niveles de concentración.	84
Tabla 4-15: Resultados de la pruebas de Cochran y t Student.....	84
Tabla 4-16: Porcentaje de pérdida/ganancia de muestras sometidas a condiciones de trabajo.	85

Tabla 4-17:	Porcentaje de pérdida/ganancia de muestras sometidas a condiciones de refrigeración.	85
Tabla 4-18:	Resultados de estabilidad al someter las muestras a condiciones de estrés.	86
Tabla 4-19:	Resultados del sistema de idoneidad.....	87
Tabla 4-20:	Área bajo la curva obtenida para cada muestra evaluada.....	88
Tabla 4-21:	Resultados del contenido de cafeína en los siete productos evaluados.	88
Tabla 4-22:	Resumen de resultados obtenidos para la validación de la metodología de cuantificación para los ensayos en celdas de difusión.....	95
Tabla 4-23:	Resultados para el factor de similitud f_2 comparando por pares los perfiles de liberación de los productos.	99
Tabla 4-24:	Resultados promedio de permeación de cafeína para los cuatro productos evaluados expresados como concentración de cafeína en % w/w y su desviación para n=3	103

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo/ Abreviatura	Término
ANOVA	Análisis de varianza (por sus siglas en inglés)
DAD	Detector de arreglo de diodos
FDA	Food and Drug Administration: Agencia de Alimentos y Medicamentos
HPLC	Cromatografía de alta eficiencia (por sus siglas en inglés)
LOD	Límite de detección (por sus siglas en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
S	Desviación estándar
TEWL	Pérdida de agua transepidérmica (por sus siglas en inglés)
°C	Grados Celsius
SC	estrato córneo
®	Marca registrada
TAG	Triglicéridos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
g	Gramos
kg	Kilogramo
Log P	Coeficiente de reparto
µg	Microgramo
µL	Microlitro
cm ²	Centímetro cuadrado
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
Hz	Hertz
v/v	Relación volumen a volumen
h	Hora
s	Segundo
min	Minuto
[%w/w]	Concentración en porcentaje peso a peso
TEA	Trietanolamina
Pa	Pascales
M	Concentración molar
mAU	Mili unidades de absorbancia

cPs	Centipoise
G'	Módulo de almacenamiento
G''	Módulo de pérdida
SPE	Extracción en fase sólida
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SCCP	Comité Científico de Productos de Consumo (por sus siglas en inglés)
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (por sus siglas en inglés)
COSING	Base de datos de ingredientes cosméticos (por sus siglas en inglés)
ICH	Conferencia internacional de armonización (por sus siglas en inglés)
ORA	Oficina de asuntos regulatorios de la FDA (por sus siglas en inglés)
USP	Farmacopea americana (por sus siglas en inglés)
SMS	Solución madre de cafeína para la validación de la metodología de extracción
GM	Gel fabricado en el laboratorio para la validación de la metodología de extracción
RSD	Coeficiente de variación
SD	Desviación estándar
MC	Muestras control para la validación de la metodología de cuantificación analítica de los ensayos en celdas de difusión
CC	Muestras de curva de calibración para la validación de la metodología de cuantificación analítica de los ensayos en celdas de difusión
GP	Gel de prueba fabricado en el laboratorio
DEH	Membrana con tejido hipodérmico
DE	Membrana dermoepidérmica

Introducción

Los productos cosméticos con proclamas de acción lipolítica son ampliamente empleados. La importancia que las personas le atribuyen a este tipo de productos radica en la necesidad de conseguir una apariencia estética que permita al individuo sentirse bien consigo mismo, sobre todo, teniendo en cuenta que afecciones estéticas relacionadas con la acumulación de grasa como la celulitis son prácticamente inevitables. Alrededor del 90% de las mujeres de todas las etnias llegan a tener celulitis en algún estadio de su vida [1], [2], lo que puede afectar su autoestima recurriendo a este tipo de alternativas que ofrece la industria cosmética, con ingredientes que prometen participar en el proceso de acumulación de grasa que se genera principalmente en la capa hipodérmica de la piel. La cafeína es uno de los ingredientes comúnmente empleados dentro de este tipo de cosméticos puesto que tiene la capacidad de afectar ciertos mecanismos involucrados en la lipólisis del tejido adiposo [1][3][4].

Un cosmético con cafeína como activo que proclama tener efecto liporeductor, debería promover el suministro de la misma hacia la hipodermis para que actúe a nivel local sobre las células adiposas. Esto implica que la cafeína debería atravesar la barrera cutánea y permear hasta la capa más profunda de la piel que es altamente vascularizada. Significando, por un lado, que el producto debería ser capaz de lograr que la cafeína alcance el tejido adiposo, lo que es un reto, considerando la dificultad que supone que un compuesto atraviese el estrato córneo, ya que, por sí mismo, éste constituye una barrera que protege del ingreso de sustancias externas. Y, por otro lado, supone la probabilidad de que el ingrediente pase al torrente sanguíneo al alcanzar la hipodermis. En este último aspecto se debe considerar que la legislación nacional para el sector cosmético expresa que, los productos cosméticos no deberían irrumpir de ninguna manera dentro del organismo porque podrían ocasionar algún efecto sistémico [5], [6]. En este sentido, la cafeína es un compuesto al que además de sus propiedades cosméticas, se le atribuyen cualidades psicoestimulantes y farmacéuticas, y por ser una sustancia de origen natural, está presente en muchas de las preparaciones alimenticias que se consumen a diario, de

manera que constantemente estamos expuestos a ella. También puede causar efectos dentro del organismo que difieren de acuerdo con la dosis y el grado de susceptibilidad de cada individuo. Algunos de estos se manifiestan en temblores, ansiedad, insomnio, cambios de humor, malestar gastrointestinal e inquietud [7], [8], [9], [10], [11], [12].

Los ensayos de permeación en celdas de difusión se proponen como una metodología *in vitro* que podría determinar, tanto la capacidad del producto para que la cafeína alcance la hipodermis, como la cantidad de cafeína que podría encontrarse en el torrente sanguíneo después de una exposición a este tipo de cosméticos. Así mismo, los estudios de permeación *in vitro* se consideran una alternativa a las pruebas *in vivo* en animales para establecer la permeación cutánea de compuestos en productos de aplicación tópica y es importante recordar que a partir del 2020, los acuerdos establecidos en el marco legislativo para el sector cosmético en Colombia prohíben el uso de pruebas en animales, por lo que este tipo de estudios constituyen herramientas valiosas para evaluar un producto cosmético en términos de seguridad y eficacia. En general, los ensayos de permeación se llevan a cabo en celdas de difusión de Franz compuestas por dos cámaras entre las que se posiciona una membrana que semeja la piel, el compartimiento superior alberga la muestra de producto y el inferior recibe el compuesto que atraviesa la membrana, de este modo, bajo condiciones que deben ser establecidas y estandarizadas por el investigador, es posible concluir acerca de la retención en la membrana o la posible absorción sistémica del compuesto.

Conforme con la revisión bibliográfica, en Colombia no se han realizado estudios *in vitro* que involucren la permeación dérmica de cafeína como activo cosmético en productos comerciales y las publicaciones internacionales al respecto también son escasas. No obstante, se considera adecuado implementar este tipo de ensayos como una herramienta, para recolectar información al respecto de la veracidad de las proclamas y la seguridad del producto bajo la concepción de la definición de cosmético, con el fin de proteger la integridad del consumidor.

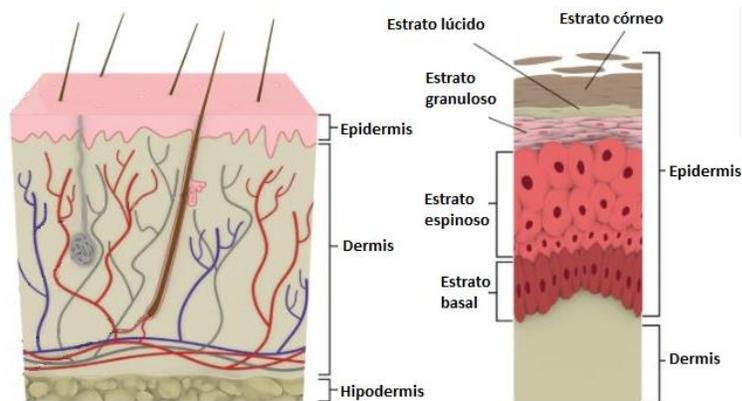
De acuerdo con lo discutido se contemplan dos hechos, en primera instancia, para que el producto sea eficaz el activo debe alcanzar el sitio de acción atravesando la barrera cutánea, lo que, a su vez, puede suponer una inconsistencia en lo que se entiende como producto cosmético, ya que parte de la cafeína que permearía podría absorberse sistémicamente afectando la seguridad del consumidor, poniendo de manifiesto la

necesidad de fortalecer los programas de cosmetovigilancia para este tipo de productos. Es por ello por lo que a partir de la presente investigación se pretende conocer, por un lado, si efectivamente la cafeína incluida en algunas de estas formulaciones comercializadas a nivel nacional tiene la capacidad de llegar a la hipodermis para ejercer su efecto, y por otro, la cafeína que podría potencialmente llegar a la sangre del consumidor, constituyendo este planteamiento en el objetivo principal del presente proyecto.

1. Capítulo 1. Generalidades

1.1 La piel

La piel es el órgano más grande y extenso del cuerpo, cubre toda nuestra superficie en forma de una envoltura que mantiene el agua en el interior, es un sistema dinámico y heterogéneo, compuesto por múltiples tipos de tejidos y es responsable de diversas funciones como la protección e intercomunicación con el medio exterior. Es un órgano complejo que presenta tres capas principales, la epidermis, la dermis y la hipodermis (**Figura 1-1**). La epidermis, es un epitelio no vascularizado que mide entre 0,4 y 1 mm en función de la zona del cuerpo. Está compuesta a su vez por cuatro estratos denominados, del más externo al más interno, córneo, granuloso, espinoso y basal. En algunas zonas del cuerpo como en las palmas, antes del estrato córneo es posible reconocer el estrato lúcido. El estrato córneo (SC) se considera un estrato hidrofóbico con un 13 % de contenido de agua, se compone de lípidos y células muertas o corneocitos, producidos por el proceso de diferenciación que sufren los queratinocitos de las capas restantes denominadas también epidermis viable. Ésta, se compone por un 70 % de agua y además de los queratinocitos, presenta diferentes tipos de células encargadas de recibir estímulos del medio, monitorear y reaccionar ante la presencia de sustancias desconocidas y dar el color a la piel [13], [14], [15].

Figura 1-1: Estructura de la piel. Adaptada de [16]

La dermis, tiene un espesor variable entre 1 y 4 mm y se encuentra altamente vascularizada encargándose de suministrar nutrientes a la epidermis. Es un tejido conectivo que da soporte y firmeza a la piel. Está compuesta por células, fibras y sustancia fundamental amorfa. Ésta última constituida básicamente por mucopolisacáridos como el ácido hialurónico y cerca del 90 % de agua. Las células principales son los fibroblastos encargados de sintetizar colágeno y elastina, fibras que confieren las propiedades de elasticidad, firmeza, flexibilidad y resistencia de la piel. La dermis rodea las invaginaciones de los apéndices epidérmicos, los folículos pilosos y sus glándulas asociadas, y las glándulas sudoríparas y aloja los sistemas linfático, sanguíneo y nervioso [14]. Por su parte, la hipodermis o tejido subcutáneo está compuesto principalmente por células adiposas que constituyen la reserva más importante de energía disponible para suplir procesos metabólicos celulares. Además de ser un reservorio de energía, esta capa se encarga principalmente de la termorregulación, la protección y amortiguación de los órganos internos contra el trauma mecánico, y de dar forma y contorno al cuerpo. Es una capa ampliamente vascularizada razón por la cual algunos fármacos son introducidos por inyección hipodérmica. Su distribución difiere según el sexo, la edad y los hábitos de vida [17], [18].

1.1.1 Barrera de permeabilidad de la piel

La función de barrera de la piel regula el ingreso y salida de sustancias y está conformada principalmente por el estrato córneo que tiene un espesor que varía de 10 a 30 μm . Es comúnmente representado como una estructura de "muro de ladrillos y cemento" puesto

que está compuesto por corneocitos, células muertas planas llenas de filamentos de queratina y agua, que están rodeadas por una monocapa de lípidos que sirve como interfaz entre las células hidrófilas y la matriz lipídica en la que están embebidas. La matriz hidrófoba está compuesta principalmente por colesterol, ácidos grasos libres y ceramidas, estos lípidos se encuentran organizados en bicapas lamelares, presentando dominios polares y no polares [13].

El estrato córneo regula el flujo de sustancias químicas y agua entre el ambiente y el organismo. Debido a su carácter mayoritariamente hidrofóbico, una sustancia hidrofílica no puede penetrarlo fácilmente y de igual forma, el agua proveniente del interior no puede salir lo que evita la pérdida de agua transepidermica (TEWL, por sus siglas en inglés) y la pérdida de minerales esenciales. Por otro lado, aunque una sustancia hidrofóbica puede presentar mayor afinidad por los lípidos de la matriz tiende a quedar retenida ya que la epidermis viable es hidrofílica. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la estructura de bicapa, que se ubica entre los corneocitos presenta zonas tanto lipofílicas como hidrofílicas por lo que se transportan ambos tipos de moléculas, las hidrofílicas podrían llegar a atravesar el estrato córneo gracias a las áreas acuosas rodeadas de lípidos polares que crean las paredes de los canales. En este sentido, se considera que la organización de los lípidos del estrato córneo es uno de los parámetros más importantes en la función de barrera cutánea, puesto que influye en el comportamiento de penetración de las sustancias a lo largo de la vía entre los corneocitos [13],[15], [19], [20].

1.1.2 Permeación de sustancias a través de la piel

Los cosméticos son productos de aplicación sobre la piel, algunos actúan de manera superficial mientras que otros, dadas sus proclamas y las demandas del consumidor deben actuar en las capas más profundas. Por lo anterior, la barrera epitelial debe ser atravesada por el ingrediente al que se le atribuye la funcionalidad con el fin de alcanzar los sitios de acción deseados lo que aumenta la posibilidad de llegar al torrente sanguíneo. Este proceso se conoce como absorción percutánea, definida como el movimiento masivo de sustancias desde la superficie de la piel hasta la circulación general y comprende, la penetración, permeación y resorción [21], [22]. Como se menciona en el apartado precedente, el estrato córneo es la principal barrera de la piel al paso de sustancias, por lo que, en primera instancia, una sustancia que pretenda atravesar la superficie de la piel debe ser capaz de penetrar dicho estrato. Luego, las moléculas penetrantes son

impulsadas por un gradiente de concentración bajo el mecanismo de difusión pasiva permeando hacia las diversas capas de la piel. Para muchos compuestos, el estrato córneo es la barrera limitante de la velocidad de permeación puesto que es la capa con mayor resistencia a la difusión. Sin embargo, para moléculas lipófilas, la epidermis viable y la dermis pueden ser las capas limitantes de la velocidad de difusión. Finalmente, las sustancias pueden ser captadas por la red capilar que se presenta a partir de la dermis, sufriendo el proceso de resorción [22], [23].

En principio, la penetración de sustancias de aplicación tópica puede ocurrir a través de dos rutas diferentes, transepidérmica, a través del estrato córneo y transfolicular, a través de los apéndices cutáneos, es decir, los folículos pilosos, conductos sudoríparos y glándulas secretoras. La afinidad relativa de estas rutas por una sustancia en particular, el área de superficie de cada una de las rutas y la facilidad de difusión a través de las respectivas fases pueden determinar la ruta favorecida de penetración del compuesto. Una sustancia que atraviese la barrera por vía transepidérmica puede a su vez hacerlo a través de los lípidos intercelulares (vía intercelular) o atravesando los corneocitos (vía intracelular) [15], [21], [24], [25].

Casi todos los compuestos pueden penetrar el epitelio, pero la magnitud, velocidad y la ruta por la que atraviesan la barrera dependerán de factores que obedecen tanto a las características de la piel como al tipo de formulación tópica aplicada. En primer lugar, los factores biológicos propios de la piel influyen en la variabilidad de la permeación a través de la misma. Hay significativas diferencias en la permeación en función de la edad. La piel de los bebés presenta características de barrera diferentes a la piel adulta siendo un poco menos madura, de igual forma, la piel envejecida es diversa, presentando más resequedad, reducción de la actividad de las glándulas sebáceas, aplanamiento de las papilas dermoepidérmicas y atrofia en la red capilar. Así mismo, existe una variabilidad considerable respecto a la zona del cuerpo, puesto que el grosor de la piel es diferente según el sitio anatómico. Adicionalmente, la condición de la piel influye de forma importante en la penetración y permeación de sustancias, una piel deteriorada presenta mayor permeación de compuestos. Otros aspectos como la temperatura y el grado de hidratación de la piel pueden contribuir en el aumento de la permeabilidad. Finalmente, teniendo en cuenta que los estudios de permeación se realizan con modelos de piel animal, es importante considerar que existe también variabilidad entre especies; la piel de los

animales difiere en contenido de lípidos, estructura y grosor del estrato córneo; la piel de cerdo se considera el modelo más predictivo de la penetración percutánea humana [9], [22], [11].

Diferentes factores que dependen del ingrediente activo y el vehículo influyen en la penetración dérmica. De acuerdo con el estado físico y el tamaño molecular, los compuestos pueden tener mayor o menor velocidad de absorción. Así mismo, la permeación a través del estrato córneo puede ser más lenta debido a la unión de algunos ingredientes a componentes de la piel y a las interacciones que puedan generarse entre la piel y el vehículo, y entre el ingrediente y el vehículo, ya que, una liberación insuficiente afecta la velocidad de flujo a través del estrato córneo. De igual manera, la permeación es influenciada por el coeficiente de reparto octanol-agua (Log P) que relaciona la capacidad del compuesto para distribuirse en la piel, se considera que valores entre 1 y 3 representan la máxima permeación [23], [24]. Otros factores como la solubilidad y la concentración del compuesto en el vehículo influyen en la permeación. Se establece que las sustancias solubles en lípidos atraviesan la matriz lipídica con mayor facilidad, además, al aumentar la concentración del soluto en el vehículo, el gradiente de concentración entre el vehículo y la superficie cutánea será mayor, lo que implica una mayor cantidad de compuesto transferido por unidad de tiempo. A su vez, el flujo de un compuesto de la misma concentración en diversos vehículos es diferente porque su solubilidad difiere en cada vehículo específico. Así mismo, características fisicoquímicas de la formulación como la viscosidad, el grado de dispersión del soluto y el pH influyen en la liberación, la concentración disponible, el gradiente de difusión, el tiempo de residencia y la exposición del compuesto en la piel [21], [24], [26].

Para garantizar que el compuesto llegará a la capa objetivo de la piel, existen métodos que pueden mejorar su difusividad; la inclusión en la formulación de potenciadores de la permeación, la modificación de la concentración del compuesto en la fórmula o la aplicación de métodos de optimización física. Los potenciadores de la permeación son sustancias que pueden incrementar la permeabilidad de la piel sin causarle daño a largo plazo, tienen la capacidad de aumentar la fluidez de las bicapas lipídicas del estrato córneo, interactuar con proteínas intercelulares, aumentar la retención del compuesto en la superficie de la piel, alterar o extraer los lípidos de la matriz intercelular del estrato córneo o aumentar la hidratación del mismo. Algunos de los potenciadores más comúnmente

usados son alcoholes, propilenglicol, polietilenglicol, ácidos grasos y tensoactivos [21], [24].

1.2 Evaluación *in vitro* de la permeación cutánea

El propósito de los estudios de absorción de ingredientes cosméticos es obtener información sobre las cantidades que pueden ingresar a las diferentes capas de la piel y al compartimiento sistémico del cuerpo humano simulando las condiciones de uso reales de los productos. Se han diseñado diversos modelos para evaluar la permeabilidad *in vitro* de compuestos a través de la piel que incluyen celdas de difusión, sin embargo, estos estudios se llevan a cabo utilizando una gran variedad de configuraciones y protocolos experimentales que varían de un laboratorio a otro y son particulares al objeto de estudio [10], [11], [15]. En un esfuerzo por estandarizar el procedimiento, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) propone la directriz 428 donde se establecen las pautas de un protocolo general para el desarrollo de dichos estudios [16]. Sin embargo, es necesario conocer las variables de cada estudio particular y garantizar sus condiciones de acuerdo con el objetivo en cada caso, ya que como resultado de estas pruebas se podrá generar información que permita evaluar la seguridad y eficacia de los productos evaluados.

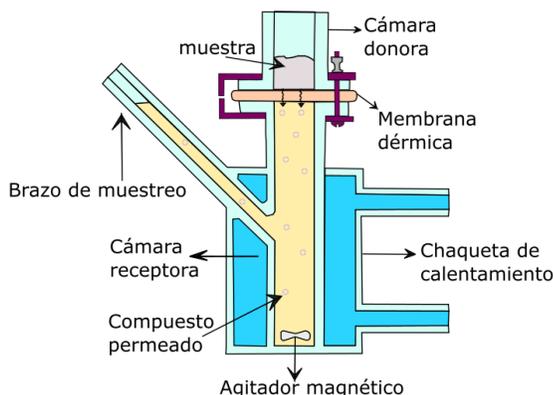
Existen dos diseños principales de celdas de difusión: estático o de flujo continuo. El principio general de las celdas es similar en ambas, básicamente, las celdas presentan una cámara receptora con líquido que simula el fluido sistémico y un compartimento dador en donde se dispone la muestra separados por una membrana que simula la piel humana. La principal diferencia radica en que, en las celdas dinámicas el fluido circula continuamente. Las celdas que más se emplean en los estudios de permeación cutánea son las celdas de Franz (**Figura 1-2**), éstas son celdas de difusión estática con sellado alrededor de la membrana, la cual se dispone con el lado epidérmico hacia el compartimiento dador que puede estar expuesto a las condiciones ambientales o en oclusión. Del fluido de la cámara receptora se toman muestras periódicamente para evaluar la cantidad de compuesto que penetra el tejido en el tiempo, y está sometido en todo momento a agitación y control de temperatura que puede mantenerse por medio de un baño térmico. La parte inferior de la membrana se encuentra empapada de fluido

receptor y no debe tener aire. Sobre la membrana se puede aplicar cualquier tipo o cantidad de vehículo que esté dentro de los límites del compartimento dador y asemeje las condiciones reales de uso del producto [23], [28], [16].

El medio receptor debe ser elegido de manera que simule el fluido sistémico, no debe interferir con la cuantificación o afectar la membrana, y debe permitir la solubilidad del compuesto evaluado. Para compuestos hidrófilos, suele emplearse soluciones salinas tamponadas a pH 7,4 para imitar las condiciones *in vivo* de pH fisiológicos. Para las moléculas hidrofóbicas, puede adicionarse al medio coadyuvantes o solventes orgánicos apropiados en cantidades que no deben interferir con la integridad de la membrana y pueden usarse agentes conservantes que eviten la proliferación de microorganismos sobre todo en ensayos de larga duración. El medio debe usarse desgasificado evitando la formación de burbujas y se deben respetar las condiciones *sink*, esto es, que la concentración del compuesto en el líquido receptor no supere el 10 % de su límite de solubilidad, pero que sea lo suficientemente grande para ser detectado por el método analítico. Es importante que el medio se mantenga en agitación y que ésta sea adecuada para que exista uniformidad del compuesto en el medio. Finalmente, el volumen de las alícuotas muestreadas debe ser el adecuado de manera que las condiciones *sink* se conserven durante el desarrollo del ensayo procurando que el medio retirado sea inmediatamente repuesto [22], [23], [27], [28].

La elección de la membrana y su espesor depende del propósito de la prueba y la disponibilidad del tejido. Aunque se prefiere que el ensayo sea ejecutado con tejido humano, el acceso a éste es limitado, por lo que se permite recurrir a modelos de piel animal o membranas sintéticas.

Figura 1-2: Celda de difusión de Franz. Elaboración propia



La piel de cerdo es el modelo más aceptado por organismos internacionales ya que, pese a que puede ser un poco más permeable que la piel humana, comparten características de permeación similar. La piel recién cortada debe usarse dentro de las 24h, pero puede ser almacenada bajo condiciones que permitan su uso posterior y que deben ser justificadas. También debe tenerse en cuenta el sitio anatómico y la edad del sujeto donante ya que la piel presenta características variables. Respecto al espesor, usualmente los ensayos utilizan piel de 200 a 500 μm de espesor (split-thickness) o de espesor total de 500 a 1000 μm (full-thickness). Sin embargo, el espesor puede ser ajustado de acuerdo con el objetivo del estudio y puede ser obtenido empleando técnicas de separación por calor, dermatomo o bisturí, entre otras. Estas técnicas de separación y la manipulación del tejido pueden comprometer la integridad de la membrana y aumentar su permeabilidad, por lo que se recomienda que previo a cada ensayo se verifique la integridad mediante la medición de TEWL, resistencia eléctrica o el uso de un compuesto marcador como fluoresceína o agua tritiada. Finalmente, dado que las propiedades de permeabilidad del estrato córneo no cambian después de la escisión del cuerpo se considera que el método de permeación *in vitro* genera una buena aproximación a las condiciones *in vivo* [9], [10], [14], [16], [29].

Otros factores que se deben considerar para la aplicación de ensayos de permeación *in vitro* son, el periodo de estudio, la dosis aplicada y la técnica de cuantificación del compuesto. En primer lugar, el tiempo del ensayo puede variar de acuerdo con los objetivos de la investigación y el tipo de producto. Una prueba puede durar unos minutos para dosis finita o llegar a 72 h en condiciones de dosis infinita. De acuerdo con las pautas de la OECD y el Comité Científico de Productos de Consumo (SCCP) se recomienda que los estudios de absorción tengan una duración máxima de 24 a 48 h, ya que, un tiempo mayor puede resultar en el deterioro de la membrana [22], [29]. Los ensayos de largo plazo deben considerar la contaminación microbiológica, la degradación enzimática y la integridad de la barrera e incluir compuestos que permitan mantener la membrana en buen estado durante la prueba. Respecto a la dosis, un producto puede ser aplicado en dosis finita (de 1 a 10 mg/cm^2), simulando las condiciones reales de uso, o en dosis infinita, empleando una cantidad lo suficientemente grande del compuesto (mayor a 10 mg/cm^2) de modo que la concentración en el compartimiento dador se mantenga constante durante el tiempo del ensayo. Este último caso se aplica cuando el objetivo del ensayo es

determinar los parámetros de difusión. Finalmente, el método de cuantificación se elige en función de la naturaleza del compuesto, de manera que sea posible detectar incluso pequeñas cantidades; es usual emplear técnicas analíticas como espectrofotometría UV y HPLC que deben ser validadas [10], [11], [28], [29], [30].

Al finalizar los ensayos, el tratamiento de los datos se realiza en función del tipo de dosis aplicada y el objetivo de la investigación. Generalmente, para una dosis finita se determina la cantidad máxima promedio del material que fue absorbido por la piel, esto requiere que se recupere y analice la cantidad en el receptor, la cantidad asociada con la piel y la cantidad derivada de los lavados de la piel. La absorción dérmica debe expresarse como una cantidad absoluta ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de superficie de la piel) o como un porcentaje de la cantidad de sustancia de prueba contenida en la dosis prevista aplicada por centímetro cuadrado de superficie de la piel. En el caso de dosis infinita, se asume que el paso del compuesto a través de la piel sigue la primera ley de Fick de difusión pasiva [10], [23], [16].

1.3 Cafeína

La cafeína es una sustancia natural ampliamente aprovechada por el ser humano, se encuentra en al menos 60 especies de plantas que incluyen las variedades de café, té, cacao, guaraná, yerba mate, yoco, huito y nueces de cola [9]. Es un ingrediente adicionado a diversas comidas y está presente en una numerosa cantidad de bebidas por lo que se consume frecuentemente en la dieta. Además, es administrada por vía tópica y transdérmica en una variedad de aplicaciones farmacéuticas y cosméticas puesto que se le atribuyen propiedades psicoestimulantes y beneficios sobre la acumulación excesiva de grasa en la piel, el drenaje linfático y protección del fotodaño [32].

La cafeína se ingiere a menudo en busca de beneficios para el rendimiento deportivo, pérdida de peso, estado de alerta cognitivo y reducción de la fatiga percibida [7]. Después de su administración oral, es completamente absorbida por el tracto gastrointestinal y metabolizada en el hígado en un 90-97 % por el sistema citocromo P450 oxidasa, el porcentaje restante de cafeína se elimina por los riñones sin sufrir cambios. La cafeína es transportada en la sangre después de su rápida absorción alcanzando el sistema nervioso central donde actúa como un estimulante, en este, actúa como antagonista de la adenosina, llegando a afectar la liberación de neurotransmisores mejorando el estado de ánimo, la concentración y eliminando la fatiga física [9], [3], [1].

Químicamente, la cafeína es conocida como 1,3,7-trimetilxantina, es un alcaloide de fórmula $C_8H_{10}O_2N_4$ (**Figura 1-3**). En su estado puro se presenta como un polvo blanco, inodoro, con sabor amargo. Es una base débil soluble en soluciones acuosas; 1g se disuelve en 46mL de agua a 25 °C, en 5,5 mL de agua a 80 °C y en 1,5 mL de agua hirviendo. Se disuelve también en diversos solventes, 1g de cafeína se disuelve en 66mL de etanol, 22 mL de etanol a 60°C, 50 mL de acetona, 5,5mL de cloroformo, 530 mL de éter, 100 mL de benceno y en 22 mL de benceno hirviendo [33]. En la **Tabla 1-1** se resume sus propiedades fisicoquímicas.

Figura 1-3: Estructura química de la cafeína. adaptada de [34]

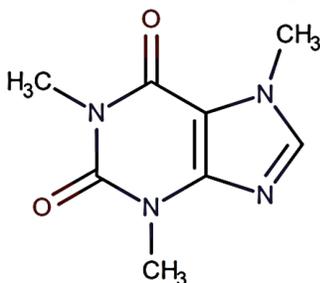


Tabla 1-1: Propiedades fisicoquímicas de la cafeína [32]

<i>Peso molecular</i>	194,2 g/mol
<i>Solubilidad acuosa</i>	22 mg/mL (25°C), 667 mg/mL (agua hirviendo)
<i>pKa</i>	14,5(25°C), 10,4 (40°C)
<i>Log P</i>	-0,07
<i>Punto de fusión</i>	238°C

1.3.1 Toxicología de la cafeína

Dadas las propiedades de la cafeína, es uno de los compuestos más consumidos en el mundo y su uso se considera seguro bajo dosis moderadas. De acuerdo con las autoridades de seguridad de alimentos, dosis inferiores a 400 mg por día son aceptadas como seguras en adultos sanos [8][35]. No obstante, pese a los beneficios que se atribuyen a la cafeína, una exposición excesiva puede presentar efectos sistémicos perjudiciales e incluso letales. Como se ha mencionado, el ser humano se encuentra ampliamente expuesto a este compuesto lo que aumenta el riesgo de toxicidad con el uso excesivo inadvertido desde múltiples fuentes [36]. Productos del consumo diario como una taza de café promedio contiene entre 40 y 150 mg de cafeína, 100 mL de té pueden contener hasta 73 mg y 100 g de chocolate hasta 20 mg de cafeína. Sumado a esto, las bebidas energéticas que son ampliamente consumidas por la población pueden contener hasta 500 mg de cafeína [9], [7].

Los informes de toxicidad por dosis intencionales o inadvertidas de cafeína relacionan la ingesta excesiva de bebidas energéticas provocando en los pacientes arritmia, taquicardia, infarto en el miocardio o paro cardíaco, además de síntomas gastrointestinales, neurológicos, metabólicos, musculoesqueléticos, pulmonares y de insuficiencia renal. El consumo moderado de cafeína puede incurrir en efectos adversos como temblor, ansiedad, insomnio, cambios de humor, malestar gastrointestinal, disminución de la atención, inquietud y psicosis, además, su uso excesivo a largo plazo puede causar alteración de los patrones de sueño, hipertensión y dependencia fisiológica [7], [8].

Los síntomas toxicológicos a menudo comienzan por encima de concentraciones plasmáticas de 15 mg/L donde son notables efectos secundarios psicológicos leves como irritabilidad y nerviosismo, y dependiendo del individuo pueden presentarse palpitaciones, náuseas, temblores y sudoración. Debido a la capacidad de la cafeína para afectar una variedad de receptores diferentes, los efectos secundarios de una sobreexposición a cafeína pueden ser profundos después de su ingesta, ya que la cafeína alcanza su concentración plasmática máxima entre 30 y 120 min. como resultado los niveles tóxicos pueden alcanzarse rápidamente y durar periodos prolongados correspondientes a su vida media que varía entre 2,5 a 10 h [10], [8], [9].

1.3.2 Cafeína en productos lipolíticos

La cafeína es un activo de uso popular en cosméticos debido a su actividad biológica en la piel, se ha estudiado su capacidad de proteger de la radiación UV, posee actividad antioxidante, propiedades antiinflamatorias, de proliferación folicular y de prevención de la acumulación excesiva de grasa en las células [3], [1]. El uso cosmético más ampliamente difundido de la cafeína es como activo lipolítico, es incorporada en preparaciones con proclamas adelgazantes, reafirmantes y anticelulíticas puesto que se le atribuye la capacidad de estimular la lipólisis. Este, es el proceso antagónico de la lipogénesis ocurrida durante la ingesta de alimentos, en donde el exceso de ácidos grasos se esterifica a triacilgliceroles (TAG) que se almacenan en gotas de lípidos en los adipocitos del tejido subcutáneo como reserva de energía. En la lipólisis los enlaces éster de los triacilglicéridos son escindidos lo que resulta en la generación de ácidos grasos y glicerol que son liberados al torrente sanguíneo y utilizados como sustratos energéticos por otros tejidos. Durante la lipólisis intervienen diferentes lipasas como la lipasa sensible a hormonas (HSL) que participa en la hidrólisis del TAG. Este proceso ocurre en condiciones basales, sin

embargo, en periodos de alta demanda energética las lipasas son estimuladas por catecolaminas y hormonas acelerando el proceso lipolítico [37], [38]. La cafeína actúa sobre las lipoproteínas lipasas que están ubicadas en la membrana de los adipocitos evitando el ingreso de los ácidos grasos a la célula y por tanto su acumulación, además, tiene la capacidad de incrementar la secreción de catecolaminas aumentando la concentración intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) provocando la activación de la hormona sensible lipasa (HSL) causante del proceso de lipólisis. Así mismo, puede inhibir la actividad de la fosfodiesterasa (PDE) responsable de la degradación del cAMP a su forma no cíclica, lo que también incrementa los niveles de este en los adipocitos. Además, puede bloquear los receptores α -adrenérgicos previniendo la acumulación de grasas, y puede mejorar la microcirculación estimulando el sistema linfático de drenaje en el tejido graso al eliminar la grasa acumulada, las toxinas y las sustancias innecesarias que surgen durante el proceso de lipólisis [1][3][4].

Se ha demostrado la eficacia de la cafeína incluida en matrices cosméticas con potencial acción lipolítica en pruebas *in vitro* en adipocitos cultivados con la sustancia y en pruebas *in vivo* con voluntarios que usan el producto por algunas semanas, donde se concluye sobre las mejoras en el aspecto de la piel, reducción en el diámetro de las células adiposas y reducción de medidas [4], [39]–[47]. Generalmente, la cafeína es usada en cosméticos en concentraciones que oscilan entre el 1 y 3%. Así mismo, en la búsqueda de atacar diferentes mecanismos de la acumulación de grasa y contribuir al tratamiento de afecciones estéticas como la celulitis, los productos liporeductores incorporan junto a la cafeína, extractos de plantas (centella asiática, fucus, hiedra, ginko biloba, ruscus, entre otros), xantinas y vitaminas (A, E, C) que pueden mejorar la microcirculación, promover la lipólisis, restaurar la estructura del tejido subcutáneo y prevenir la formación de radicales libres [3], [48][49].

1.3.3 Penetración de la cafeína a través de la barrera de la piel

Las moléculas activas se caracterizan por su capacidad para penetrar la barrera cutánea y actuar en los procesos celulares. La cafeína puede ser absorbida a través de la piel y es frecuentemente usada como sustancia modelo hidrofílica en los ensayos de permeación dérmica *in vitro*. Aunque la cafeína no posee las propiedades de un penetrante cutáneo ideal por ser una sustancia hidrófila con un LogP de -0,07 (**Tabla 1-1**), que en principio

debe atravesar el contenido de lípidos del estrato córneo, es ampliamente usada como ingrediente funcional cosmético dado que su habilidad de penetrar la barrera epidérmica se potencia en función de las estrategias de liberación cutánea empleadas, alcanzando las diferentes capas de la piel, afectando el proceso y metabolismo celular e incluso posibilitando su entrega sistémica. En efecto, se ha demostrado en estudios *in vivo* que la cafeína es capaz de penetrar la piel con una absorción media máxima a los 100 minutos después de la aplicación [3]; a su vez, la investigación realizada por Otberg N. et al. encontró que la cafeína se detecta en muestras de sangre a solo 5 min después de la aplicación tópica de una solución al 2,5% en voluntarios humanos [50].

Como compuesto modelo, la cafeína ha sido ampliamente empleada en estudios de permeación *in vitro* en celdas de difusión con diferentes tipos de membranas, piel humana, modelos animales y materiales sintéticos. Estos estudios confirman que la permeación en membranas sintéticas difiere con la permeación en piel humana, y que los modelos animales son los más similares a esta. Además, se señala que el flujo de difusión de la cafeína no depende de la concentración de la misma en la fórmula sino de la cantidad de formulación aplicada y se ve afectada por el tipo de vehículo (solución, emulsión, gel, microemulsión, entre otros), la inclusión de potenciadores de la penetración y las estrategias de liberación empleadas. De igual manera, los estudios indican que el espesor no influye significativamente en la cantidad total de cafeína penetrada, lo que sugiere que el estrato córneo es la barrera que limita la velocidad de penetración. Igualmente, las investigaciones encuentran que la mayor concentración de cafeína se localiza en la epidermis, la menor en dermis y cerca del 25 % de la dosis de cafeína aplicada permea al fluido receptor indicando su posible absorción sistémica [32], [3], [1], [51], [52].

- Estudios previos de permeación *in vitro* de cafeína incluida en matrices cosméticas

La permeación de cafeína incluida en matrices cosméticas se ha estudiado en numerosas investigaciones [32], [45], [60]–[64], [51], [53]–[59], con el objetivo de encontrar y/o demostrar cuál es la formulación más adecuada para lograr una administración tópica de cafeína exitosa, buscando aumentar su penetración y permeación, o su retención en la piel para su acción localizada. Se ha encontrado que la cantidad permeada desde estas matrices cosméticas es baja respecto a la dosis aplicada y depende de la naturaleza del vehículo. En general, emplear un vehículo microestructurado como una microemulsión, una emulsión de Pickering, un gel de etosoma o un emulgel posibilita una mayor

penetración y absorción que el uso de emulsiones O/W, W/O hidrogeles. Las sustancias incluidas en la formulación del vehículo también influyen en la penetración de la cafeína por lo que la mayoría incluyen promotores de la permeación como alcoholes, polioles, terpenos y tensoactivos. A su vez, existen estrategias de incorporación de cafeína como las nanopartículas sólidas que permiten la penetración y acumulación en la piel proporcionando una menor absorción sistémica.

Los estudios que utilizan modelos de membrana animal y humana muestran la distribución de la cafeína en la piel, concluyendo que la cafeína aplicada tópicamente queda mayoritariamente retenida en la epidermis ya que, por su naturaleza hidrofílica, consigue pasar la dermis. Por otro lado, respecto a la capa más profunda de la piel, son escasas las investigaciones que involucran esta capa, en efecto, dentro de la revisión solo se encontró un estudio que mantiene la hipodermis en la membrana cutánea [51]. En éste se resalta que dada la acción liporeductora que posee la cafeína, la formulación cosmética debería optimizarse de modo que la cafeína llegue al sitio de acción, es decir, a los adipocitos ubicados en la hipodermis. En este sentido, para observar si la cafeína llega a la hipodermis y se retiene allí, las membranas de piel conservaban esta capa con un espesor de 3 mm. Los autores concluyen que la presencia de hipodermis influye en el transporte en las capas superiores de la piel, puesto que demuestra que lo que se queda retenido en el estrato córneo, epidermis y dermis es mayor cuando se cuenta con la capa hipodérmica y por ende lo que absorbe es menos. A su vez, el tener esta capa no influye en la cantidad total de material penetrado, dado que, la cantidad de cafeína que logra administrarse en la piel es la misma. Adicionalmente, se encuentra que la hipodermis logra retener la mitad de la cafeína que ha penetrado permitiéndole al activo alcanzar la capa objetivo para ejercer su efecto lipolítico.

En relación con los estudios de permeación *in vitro* de cafeína desde productos cosméticos comerciales, Dias et al. [65], evaluaron la permeación de un gel liporeductor y dos lociones corporales a través de una membrana humana epidérmica y de dos membranas sintéticas a condiciones infinitas. El estudio concluye que las membranas sintéticas no son adecuadas para conocer el comportamiento real puesto que no son capaces de reproducir el comportamiento del activo al aplicarse en la piel, pero permiten establecer una tendencia. Encontraron que el gel evaluado presenta mayor permeación respecto a las lociones corporales, no obstante, dado que el desarrollo del estudio se llevó a cabo en

dosis infinitas la cantidad de cafeína encontrada en el receptor se encuentra sobreestimada respecto a la que se aplicaría típicamente *in vivo*. Por otro lado, Smith et al. [66] evaluaron tres cremas para el contorno de los ojos en membrana sintética a dosis finita identificando que la cantidad de cafeína que permea es baja, solo el 0,5 % de la cafeína aplicada fue encontrada en el fluido receptor. En sus resultados es posible apreciar que la permeación de la cafeína no depende tanto de la concentración si no de las estrategias de penetración incluidas en la formulación tal como fue demostrado Mustapha et. al [56].

Finalmente, respecto al detalle en los procedimientos, en general, los estudios implementan celdas de difusión estáticas como las celdas de Franz. Los medios receptores más empleados son buffer de fosfatos salino, solución salina NaCl o agua y se mantienen a temperatura 32 °C a 37 °C en agitación. Se trabaja con celdas abiertas y la mayoría bajo dosis infinitas con un porcentaje de cafeína que oscila entre el 0,1 % y el 5 %. El tamaño de las celdas en términos de área de permeación y volumen de fluido receptor es ampliamente variable, de 0,5 cm² a 7 cm² y de 3 mL a 200 mL. Así mismo, los estudios pueden durar de 4 h a 48 h e incluyen intervalos variables para toma de muestras dentro del tiempo de duración, las cuales son analizadas principalmente por HPLC con detector de UV a 271-276 nm, en columna C18 con fase móvil acuosa con cantidades variables de metanol, acetonitrilo y ácido acético. Adicionalmente, se puede apreciar la amplia gama de tejido empleado; se usa piel humana de mama o abdomen, piel de animales de diferentes especies (cerdo y rata), membranas sintéticas y espesores que van desde los 0,2 mm hasta lo 4mm incluyendo solo estrato córneo (SC), epidermis, epidermis con dermis o incluso con hipodermis cuya integridad es medida por TEWL o conductividad.

2. Capítulo 2. Objetivos

2.1 Objetivo General

- Evaluar la permeación de cafeína de algunas formulaciones comercializadas en Colombia con acción lipolítica, empleando el modelo *in vitro* de celdas de Franz con piel porcina, con el fin de suministrar información relacionada con la seguridad y eficacia del activo.

2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la influencia de la naturaleza del vehículo sobre la permeación tópica de cafeína de productos liporeductores comerciales.
- Contribuir con información relacionada con seguridad y eficacia a partir de la determinación de la cantidad de cafeína que puede alcanzar la hipodermis.

3. Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Equipos

Se utilizó 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. Columna cromatográfica Luna® C18, de 4,6 x 150 mm y 5 µm de tamaño de partícula Phenomenex obtenida de ARICEL (Bogotá, Colombia). Se empleó un ultrasonido Cole-Parmer® modelo 8891 (E.U.), equipo de filtración al vacío Milliporex con filtros de membrana de 0,45 µm, potenciómetro Hanna® referencia HI 2221 (E.U.), centrífuga Thermo Scientific modelo Megafuge 16 (E.U.), balanza analítica sensibilidad de 0,0001 g marca Ohaus® serie Pioneer (E.U.), micropipetas (2-20 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL) marca Select BioProducts® (E.U.), filtros Millex (Millipore Corporation, E.U.) de PVDF de 0,22 µm, baño termostático Lauda® (E.U.), plancha de agitación multipunto IKA® modelo RO 10 PS1 Werke (Alemania), celdas de Franz marca PermeGear® (E.U.), Tewametro Courage+Khazaka® modelo TM 300 (Alemania). Cartuchos de extracción en fase sólida de divinilbenceno hidrofóbico obtenidos de Aricel (Bogotá, Colombia). Reómetro C-VOR 200 de Bohlin Instruments con geometría cono plato 40 mm 2° y viscosímetro de Brookfield modelo DV-E. Espectroscopio electrónico de barrido con platina de enfriamiento JEOL, modelo JSM 6490-LV (Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia).

3.1.2 Reactivos

Cafeína Alfa Aesar grado reactivo 99 % (E.U. lote: W24A011). Agua ultrapurificada grado HPLC, acetonitrilo grado HPLC obtenido de PanReac AppliChem (E.U. lote 0001088071),

metanol grado reactivo obtenido de PanReac AppliChem (E.U. lote 0001904879), etanol 96 % grado reactivo, hidróxido de amonio 1 M, ácido clorhídrico 1 M, agua destilada. Carbómero (Carbopol 940), Glicerina, Propilenglicol, Metil parabeno y Propil parabeno obtenidos de Ciacomeq (Bogotá, Colombia). Mentol, PEG 40 aceite de ricino hidrogenado, Trietanolamina, BHT calidad materia prima. Extracto de alga fucus obtenido de Naturalgreen Extractos Naturales (Bogotá, Colombia). Extracto de centella asiática y Extracto de hiedra obtenidos de Laboratorios Phitother (Bogotá, Colombia). 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). Siete productos cosméticos lipolíticos tipo gel y emulgel adquiridos del mercado local en tiendas distribuidoras de cosméticos que corresponden a la codificación 01AZ, 02EB, 03NA, 04HV, 05CA, 06AD, 07AR (Bogotá, Colombia).

3.1.3 Material biológico

En el presente estudio se empleó tejido cutáneo porcino para la realización de ensayos de permeación *in vitro*, dada la similitud del tejido con la piel humana y la evidencia bibliográfica encontrada que indica que el modelo de piel porcina es el que presenta un comportamiento de permeación más semejante a esta[22][28]. El tejido se obtuvo de un frigorífico local que emplea cerdos de 4 a 6 meses de edad con un peso comprendido entre 80 y 100 kg, se utilizó tejido sin ningún proceso o tratamiento, es decir tejido íntegro y tejido que se encuentra listo para su comercialización.

3.1.4 Consideraciones éticas

El manejo de tejido biológico se realizó bajo las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud establecidas en la Resolución del Ministerio de Salud 8430 de 1993, así como bajo las disposiciones determinadas en la Ley 84 de 1989 teniendo en cuenta el principio de Russell Burch de las "3R" mediante el aprovechamiento de material proveniente de animales destinados a consumo humano [67], [68]. La disposición final del material biológico siguió las pautas establecidas en la Política ambiental de la universidad dentro del plan de manejo de residuos hospitalarios y similares.

A su vez, teniendo en cuenta la normatividad vigente, se declara que los ensayos realizados para evaluar los cosméticos fueron en modalidad *in vitro* planteados como alternativa a los

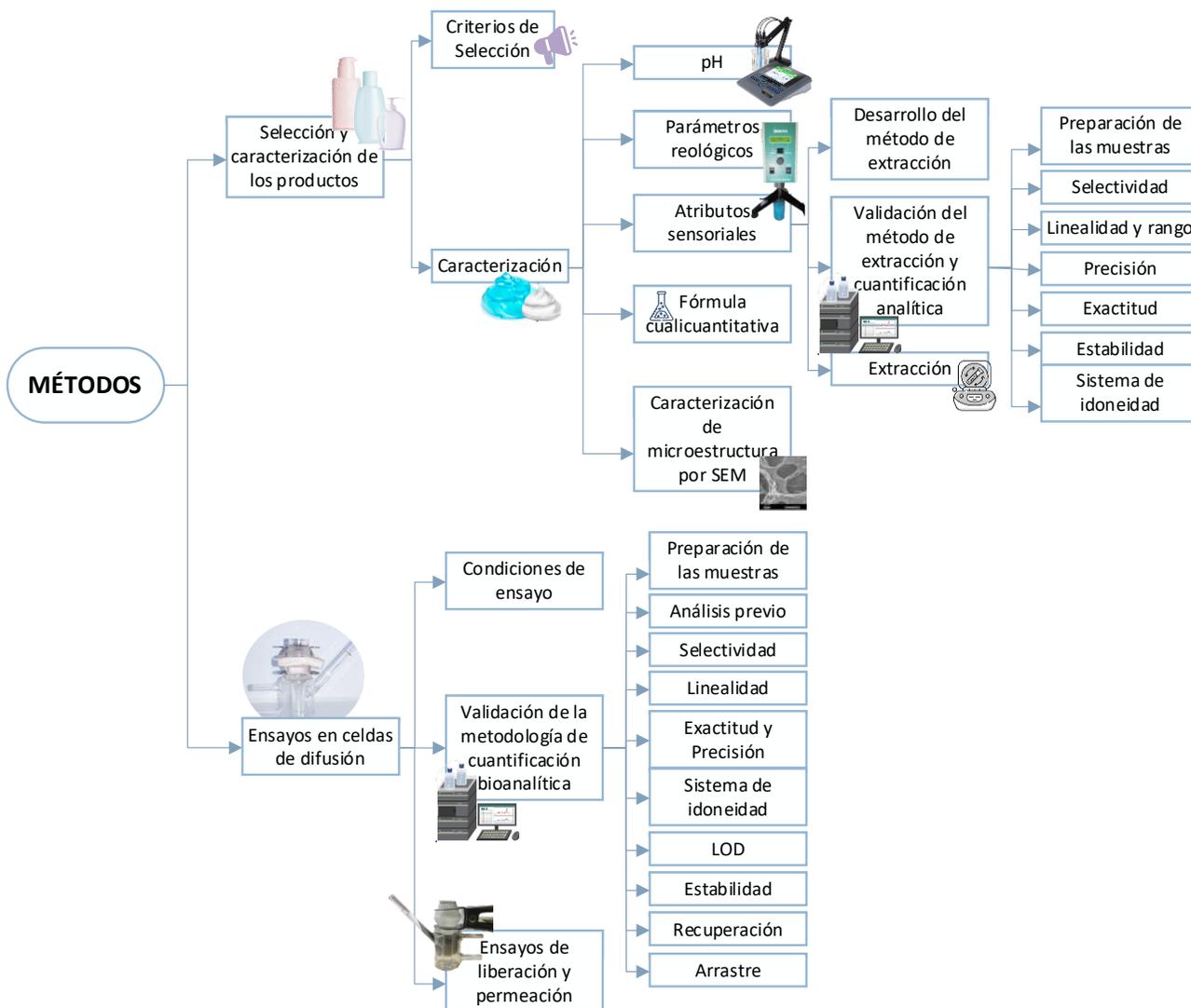
ensayos con animales conforme a la Ley 2047 de 2020, por la cual “se prohíbe en Colombia la experimentación, importación, fabricación y comercialización de productos cosméticos, sus ingredientes o combinaciones de ellos que sean objeto de pruebas con animales” [69].

El proyecto fue sometido frente al comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia y fue avalado mediante el Acta N° 11 de 2021.

3.2 Métodos

En el presente apartado se describen los procedimientos empleados para la caracterización de los productos comerciales, así como para la extracción de la cafeína de las matrices cosméticas y la respectiva validación de la metodología analítica. Se describe también la metodología empleada para los ensayos de liberación y permeación, y la correspondiente validación de la metodología bioanalítica. En la **Figura 3-1** se expone la secuencia metodológica planteada en esta investigación.

Figura 3-1: Esquema metodológico



A continuación, se detallan de manera específica los aspectos mencionados en el árbol metodológico.

3.2.1 Selección y caracterización de los productos

Los productos objeto de estudio fueron elegidos del mercado colombiano teniendo en cuenta criterios de selección y posteriormente fueron sometidos a análisis fisicoquímicos para evaluar su aspecto, pH, parámetros reológicos, microestructura y fórmula cualicuantitativa.

3.2.1.1 Criterios de selección

Para la selección de los productos se realizó una investigación inicial de productos lipolíticos comercializados en el mercado colombiano en sitios web de venta y distribución de cosméticos y una consecuente exploración en almacenes de cadena y tiendas locales que los comercializan. La búsqueda se enfocó en productos con proclamas de efecto liporeductor, anticelulítico, tonificante o reafirmante que declaraban en sus ingredientes la presencia de cafeína.

Conocidos los productos que se comercializan se determinaron las presentaciones más comunes y finalmente se filtró la búsqueda hacia la forma cosmética más popular eligiendo productos que, pertenecían a diferentes marcas, presentaban notificación sanitaria obligatoria vigente, con proclamas del tipo mencionadas anteriormente y que dentro de sus ingredientes incluyeran cafeína; además se consideró que los productos fuesen de fácil consecución y precio asequible.

3.2.1.2 Caracterización

3.2.1.2.1 pH

Las mediciones de pH fueron efectuadas por potenciometría realizando por triplicado para cada producto bajo estudio una dilución 1:10 de gel en agua desionizada. Para tal fin, se tomaron dos gramos de muestra en 20 g de agua disolviendo en un vaso de precipitados. La dispersión resultante se filtró y se tomó la medida potenciométrica determinando el pH de las muestras.

3.2.1.2.2 Parámetros reológicos

Se realizaron ensayos de extensibilidad y adherencia en montajes que se construyeron dentro del grupo de investigación para tal propósito. En la prueba de extensibilidad se determinó el cambio en el diámetro que sufre la muestra puesta entre dos placas de vidrio al adicionar peso, entre cada peso se permitió un tiempo de reposo de un minuto y se realizó la medición. En la de adherencia la muestra se colocó entre dos placas circulares metálicas que sufren tensión al adicionar peso a través de un sistema de poleas, para cada producto se adicionó el peso

necesario para separar las dos placas permitiendo un intervalo de un minuto entre cada adición de peso. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

La viscosidad se determinó en un viscosímetro de Brookfield, en el que se colocaron 100 g de muestra en un vaso de precipitados que se posicionó de modo que la aguja quedase centrada y que el nivel del fluido tocase la ranura indicada. Todas las muestras fueron evaluadas a una misma velocidad correspondiente a 50 rpm y la aguja fue seleccionada teniendo en cuenta un porcentaje de torque entre 30 y 90 %, las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Así mismo, para cada una de las muestras se realizaron ensayos de cizallamiento y comportamiento oscilatorio por triplicado para establecer el perfil de viscosidad y los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G''), utilizando un reómetro C-VOR 200 de Bohlin Instruments y la geometría cono-plato con cono de 40 mm y 2° de inclinación. Se utilizó un espaciado de 50 μm y una trampa para solventes para evitar su evaporación. El método de medición se estableció en el instrumento y se inicializó al posicionar la muestra en el plato retirando el exceso con espátula. Los ensayos fueron realizados a una temperatura de 25°C . La velocidad de corte se evaluó en el rango de 0,001 a 1000 s^{-1} , mientras que la frecuencia entre 0,01 a 50 Hz [70].

3.2.1.2.3 Atributos sensoriales

Los productos comerciales fueron evaluados en cuanto a su aspecto, a través de la aplicación de una prueba discriminativa de ordenamiento tipo ranking a voluntarios. Se seleccionó una población de 40 voluntarios sin discriminación de género y con edad mayor a 15 años. Los siete productos fueron evaluados por preferencias hedónicas en términos de consistencia, transparencia, pegajosidad, viscosidad, rapidez de absorción y esparcibilidad a través de una prueba sencilla de ordenamiento que consistió en organizar las muestras de acuerdo con el grado de intensidad en la percepción del atributo, de manera que los usuarios detectaran la existencia de diferencias entre ellas. Para tal fin, los participantes posicionaron las muestras de la mayor intensidad (posición 1) a la menor intensidad (posición 7) del parámetro valorado con la intención de conocer el número de veces que la muestra fue puesta en una misma posición. Cada consumidor evaluó las siete muestras aleatorizadas en dos sesiones, valorándose tres atributos en cada sesión.

Durante la aplicación de la prueba se dio una explicación introductoria y se entregó el formato de diligenciamiento a cada participante incluido en el Anexo A. Este formato fue desarrollado con la intención de ser explícito y gráfico para comodidad de los consumidores y contiene, la descripción de la prueba y el espacio para escribir el código de la muestra de acuerdo con la posición determinada, así como las definiciones y ejemplos guía para cada atributo con el objetivo de facilitar la comprensión de la prueba, considerando que se trata de un panel no entrenado. Finalmente, los resultados de ambas sesiones fueron reunidos y procesados bajo un análisis estadístico descriptivo y una prueba de significancia de Friedman.

3.2.1.2.4 Fórmula cualicuantitativa - Cuantificación de la cantidad de cafeína

Los productos objeto de estudio presentan en el etiquetado los ingredientes que contienen de acuerdo con la normatividad colombiana vigente [5], por lo que se establecieron aquellos que son comunes en cada formulación y su posible función dentro de la misma de acuerdo con la base de datos europea de referencia COSING. Así mismo, los productos fueron sometidos a una metodología de extracción desarrollada para determinar la composición de cafeína.

— Desarrollo del método de extracción

Para determinar el método de extracción idóneo se realizó una búsqueda de información en publicaciones científicas relacionadas con la extracción de cafeína a partir de matrices cosméticas tipo gel. Se identificaron los métodos más promisorios y se realizaron ensayos siguiendo el procedimiento descrito en las publicaciones. Se realizó la comparación de los resultados de cada método eligiendo el que se ajustara mejor a las expectativas; a éste, le fueron realizadas modificaciones que permitieron una buena recuperación del analito y la protección del sistema cromatográfico para evitar su sobrepresión y posible daño dada la complejidad de la matriz evaluada. Este procedimiento de extracción fue validado junto con el método de cuantificación.

Se seleccionaron tres métodos de extracción, denominados método A, B y C, que fueron implementados en una primera aproximación a un gel base realizado en el laboratorio. El gel base contiene algunos ingredientes en común presentes en al menos tres de las formulaciones seleccionadas con un porcentaje de cafeína equivalente al 0,5 % (Anexo B).

El método A correspondió al utilizado por Injac et al. para extraer cafeína de algunos productos, entre ellos dos geles con proclamas liporeductoras. Como se describe en el procedimiento, para este método se tomaron cinco gramos del gel y se llevaron hasta 50 mL con agua-metanol (1:1 v/v), la cafeína fue extraída dejando la preparación por 30 min a 40 °C en baño de ultrasonido. Se filtró a través de papel de filtro y luego a través de un filtro de 0,22 µm para su análisis [71].

El método que se denominó B en el presente trabajo, publicado por Marchei et al.[72], se empleó para analizar 19 cremas cosméticas, cremas tipo mud y geles diferentes, vendidos como cosméticos para la reducción de la celulitis. Siguiendo la metodología propuesta, se preparó una dispersión diluida del gel transfiriendo 1 g a un vaso de 100 mL (dilución 1:100) que fue llevado a volumen con agua: metanol (9:1 v/v) y sometido a tratamiento ultrasónico durante 10 min a 40° C. Después de la centrifugación, se recogió el sobrenadante transparente y se cuantificó por HPLC.

Finalmente, el método denominado C que corresponde al planteado por Mladenov & Sunarić para la determinación de cafeína en geles anticelulíticos y productos para el cuidado del cabello, se llevó a cabo de dos maneras. En la primera, se pesó 0,5 g del producto y se disolvió en 10 mL de etanol al 96 %. Después, se adicionó NH₄OH para obtener un pH básico que contribuyera a la precipitación del polímero, separando los excipientes insolubles mediante centrifugación durante 10 min a 4.000 rpm a 20 °C, el sobrenadante se filtró y cuantificó. Para la segunda, se llevó a cabo el procedimiento descrito y además se incluyó un paso de extracción en fase sólida (SPE) previa a la cuantificación por HPLC como recomiendan los autores. Los cartuchos SPE se acondicionaron con 3 mL de metanol (Fase 1 activación) y 3 mL de agua desionizada (Fase 2 equilibrio), la muestra se pasó a una velocidad de flujo de 1 mL/min (Fase 3 carga) y finalmente se realizó la elución de cafeína con 4 mL de metanol (Fase 4 elución). El cartucho utilizado para la extracción de cafeína corresponde a HR-X divinilbenceno hidrofóbico que ofreció el mejor resultado de acuerdo con la publicación [73].

Para determinar la cantidad de cafeína extraída bajo los procedimientos se empleó la técnica de cuantificación analítica HPLC-DAD en las condiciones que se mencionan en el siguiente apartado.

— Validación del método de extracción y cuantificación analítica

Para cuantificar la cafeína extraída de las matrices cosméticas, se seleccionaron condiciones similares a la metodología analítica propuesta en estudios previos dentro del grupo de investigación, que permitieron la cuantificación de cafeína por cromatografía líquida en ensayos de permeación con mucosa oral porcina [74]. Una columna cromatográfica del tipo C18 de 4,6 x 150 mm y 5 μm de tamaño de partícula, el manejo de temperatura constante a 30 °C, el uso de agua y acetonitrilo en proporción 80:20 como componentes de la fase móvil a 1 mL/min de flujo binario, un volumen de inyección de 10 μL y la detección a una longitud de onda de 273 nm. El equipo empleado fue un cromatógrafo de marca Shimadzu con detector de arreglo de diodos y el procesamiento de los datos se realizó en el software LCsolution® versión 1.25. Las condiciones fueron probadas en un estudio preliminar con cafeína disuelta en agua: etanol (80:20) para demostrar que el sistema cromatográfico permitía obtener la señal del analito en el tiempo de retención indicado en el estudio previo y obtener una curva de calibración preliminar que permitiera la comparación de las metodologías de extracción.

Una vez establecidas las condiciones de la metodología analítica para la cuantificación de cafeína extraída de matrices tipo gel y emulgel, estas fueron validadas bajo los lineamientos establecidos por la conferencia internacional de armonización (ICH), en el documento *Laboratory Manual Volume II - Methods, Method Verification and Validation* de la oficina de asuntos regulatorios de la FDA (ORA) y en el capítulo <1225> de la farmacopea americana (USP). Se analizaron los parámetros de selectividad linealidad y rango, precisión, exactitud, estabilidad y sistema de idoneidad.

- *Preparación de las muestras:*

Para determinar la linealidad del sistema, teniendo en cuenta los documentos de referencia, se preparó por triplicado una solución madre de cafeína (SMS) que contenía 25 mg de cafeína disuelta en 50 mL de etanol al 96 % para una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De esta solución se tomaron diferentes alícuotas para cada nivel de la curva en un rango de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que fueron llevadas a 10 mL con fase móvil (**Tabla 3-1**). De la misma manera cada día de la validación se preparó una solución madre de la que se obtuvieron dos réplicas para generar una curva de calibración externa con la que se obtuvo el porcentaje de recuperación. Previo al análisis, todas las muestras se filtraron a través de filtros de PVDF de 0,22 μm .

Tabla 3-1: Niveles de la curva de calibración para el sistema preparados a partir de una solución madre de cafeína de 500 µg/mL.

Concentración [µg/mL]	0,5	12,5	25	37,5	50
Alícuota [µL]	10	250	500	750	1000

En la validación del método se aplicó el procedimiento analítico completo, por lo cual, la preparación de la muestra se efectuó desde la extracción de cafeína del producto terminado hasta su cuantificación analítica. Se preparó una matriz que incluyera los ingredientes en común presentados en más de tres de los siete productos evaluados, de forma que se consiguiera una matriz compleja representativa de los productos a evaluar que permitiera obtener los parámetros de validación.

Se prepararon por separado tres geles idénticos que correspondieron a tres productos terminados con el mismo porcentaje de cafeína (0,18 %) incorporada en la preparación (Anexo B, **Tabla B-2**), identificados como geles madre (GM) y también un gel blanco sin cafeína. **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Para obtener cada nivel de la curva se pesaron diferentes cantidades de GM como se indica en la **Tabla 3-2**. Dichas cantidades se sometieron a extracción de cafeína bajo el método definido, para su posterior cuantificación.

Tabla 3-2: Cantidad a pesar de gel para cada nivel de la curva de calibración para el método preparados a partir de gel madre con 0,18 % de cafeína.

Concentración [µg/mL]	0,5	12,5	25	37,5	50
peso gel [g]	0,0139	0,3472	0,6944	1,0417	1,3889

- *Selectividad:*

Por tratarse de formulaciones cosméticas que presentan varios ingredientes, para determinar la selectividad del método se analizaron varias soluciones obtenidas a partir de la extracción de diferentes matrices, que fueron, cada producto comercial, los GM preparados, el gel blanco, un GM sometido a condiciones de estrés bajo condiciones de estabilidad preliminar, seis ciclos de 24 h a temperatura de 40 °C y 24 h bajo refrigeración a 4 °C y una solución de cafeína en etanol.

Como criterio de evaluación se compararon los perfiles cromatográficos, topogramas y la pureza de pico de las soluciones analizadas con el fin de determinar si se identificaban

interferencias respecto a la solución de cafeína. Así mismo, respecto al gel placebo, se pretendía evaluar si existían sustancias que pudieran eluir en el mismo tiempo de retención de la cafeína incidiendo en su cuantificación.

- *Linealidad y rango:*

Para evaluar la linealidad del sistema y método se realizaron dos curvas de calibración con cinco niveles de concentración de analito, que correspondieron en el sistema, a las diluciones de tres soluciones madre de cafeína en etanol y en el método, al extracto de los tres GM elaborados en el laboratorio como se mencionó en el apartado de preparación de muestra. El sistema y el método hicieron uso de los mismos niveles de concentración en el rango especificado de 0,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ que fue determinado de acuerdo con estudios de linealidad y la aplicación prevista del procedimiento en geles comerciales. Para conceptuar acerca de la linealidad se realizó un análisis estadístico a través de la prueba t de Student y la prueba de varianza ANOVA a un nivel de confianza del 95 % de acuerdo con los criterios definidos en la **Tabla 3-3**. Adicionalmente, se acepta una regresión como lineal si su coeficiente de determinación R^2 es $\geq 0,995$.

Tabla 3-3: Criterios de evaluación estadística para los parámetros de linealidad.

	Prueba	H0	Criterio
Estadístico t de Student	Correlación	No existe correlación significativa entre (x) y (y).	Si el valor calculado de t es mayor que el valor t de la tabla con un 95% de confianza la hipótesis nula se rechaza aceptando la hipótesis alterna.
	Pendiente	La pendiente no es significativamente diferente de cero	
	Intercepto	El intercepto no es significativamente diferente de cero	
Análisis de Varianza (ANOVA)	Regresión	La regresión no es significativa	Si el valor calculado de F es mayor que el valor de F de la tabla de Fisher para un alfa de 0,05, la hipótesis nula se rechaza aceptando la hipótesis alterna.
	Falta de ajuste	El desvío no es significativo	

- *Precisión:*

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad, concebida como repetibilidad instrumental y repetibilidad del método, y de precisión intermedia. Para determinar la primera se analizó la respuesta instrumental de seis réplicas de una misma concentración con el fin de estimar la variabilidad debida al instrumento considerando como criterio de aceptación un valor de coeficiente de variación (RSD) menor a 2,0 %.

La repetibilidad del método se estimó analizando tres réplicas de cinco concentraciones que cubren el rango de trabajo (0,5 12,5 25 37,5 y 50 µg/mL) en el mismo día y con el mismo analista. Este parámetro se evaluó mediante el coeficiente de variación promedio ponderado, obtenido al comprobar la homogeneidad de varianzas por la prueba de Cochran para un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. La hipótesis nula H_0 : varianzas significativamente homogéneas, se acepta, cuando el valor de G calculado es menor al valor de G obtenido de la tabla ($\alpha = 0,05$, K, n) donde K es igual a los niveles de concentración, es decir cinco y n es el número de réplicas por nivel, es decir, tres. Se aceptan valores de RSD inferiores a 2,0 %.

La precisión intermedia del método se determinó analizando el coeficiente de variación global (RSD global), del porcentaje de recuperación de tres réplicas correspondientes a tres niveles de concentración (0,5, 25 y 50 µg/mL) en tres días y para dos analistas (A y B). Se acepta que el RSD global que incluye la variación entre días, entre niveles, entre réplicas y entre analistas, tenga un valor menor o igual al 2.0 %.

- *Exactitud:*

La exactitud del método se estimó analizando el porcentaje de recuperación obtenido del procesamiento de nueve muestras, que incluyeron tres réplicas de tres concentraciones (0,5 25 y 50 µg/mL) que cubren el intervalo de trabajo. Se considera apropiado un porcentaje de recuperación entre el 95,0 % y el 105,0 %, intervalo permisible para formas farmacéuticas terminadas. Con el fin de establecer la idoneidad estadística de la exactitud se llevaron a cabo la prueba de homogeneidad de varianzas de Cochran y la prueba de t de Student de acuerdo con los criterios establecidos en la **Tabla 3-4**.

Tabla 3-4: Criterios de evaluación estadística para determinar la idoneidad de la exactitud.

Prueba	H0	Criterio
Test de Cochran	Las varianzas son significativamente homogéneas	Se acepta cuando el valor de G calculado es menor al valor de G obtenido de la tabla ($\alpha = 0,05$, K, n) donde K es igual a 3 niveles de concentración y n el número de réplicas por nivel, es decir, 3.
Prueba de t	La recuperación media no es significativamente diferente del 100%	Si el valor calculado de t es menor que el valor de t de la tabla para $\alpha = 0,05$ y $gl = n-1$, la hipótesis nula se acepta y la recuperación es satisfactoria.

- **Estabilidad:**

La estabilidad de las soluciones de cafeína extraída se determinó a través del porcentaje remanente del analito al someter las muestras a las siguientes condiciones de estabilidad:

- En un periodo de permanencia en el automuestreador y, por lo tanto, a las condiciones de temperatura de trabajo (20 ± 2 °C). Se evaluaron tres concentraciones diferentes al inicio y pasado el tiempo de duración del ensayo (12 h).
- En condiciones de refrigeración (4 ± 1 °C). Se evaluaron tres muestras de concentración alta, media y baja que fueron dejadas en el refrigerador por 6, 8, 13 y 15 días.
- En condiciones de estrés, tomando las tres réplicas que fueron realizadas para selectividad (seis ciclos de 24 h a temperatura alta (40 ± 1 °C) y 24 h bajo refrigeración (de 4 ± 1 °C)).

Se considera aceptable si los resultados de las muestras se encuentran dentro del 90 % de la concentración inicial, es decir que su degradación no supere el 10 %.

- **Sistema de idoneidad:**

La idoneidad del sistema se verificó mediante los datos procesados por el software LCsolution® para los parámetros de número de platos teóricos, respuesta instrumental,

asimetría y tiempo de retención. Se considera como criterio de aceptación valores mayores a 2000 para el número de platos teóricos, valores del %RSD menores de 2 % para la variación del área entre inyecciones, valores entre 0,8 y 2,0 para el factor de asimetría y una variación no mayor al 10 % para el tiempo de retención.

— **Extracción de cafeína de los productos comerciales**

De acuerdo con el método desarrollado y validado se realizó la extracción de cafeína de los productos comerciales para tres muestras de producto y se determinó la cantidad del ingrediente presente en estas.

3.2.1.2.5 Caracterización de microestructura por microscopía electrónica de barrido

Se realizó la toma de imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM) con platina de enfriamiento para los productos comerciales que presentaron un contenido significativo de cafeína de acuerdo con el análisis de la fórmula cualicuantitativa. La técnica criogénica fue seleccionada debido a que es recomendada para productos con alto contenido de agua puesto que ésta puede dificultar la medición por microscopía [70][75]. Se tomaron imágenes a 1000 y 5000 aumentos visualizando la estructura de la red microscópica de los productos.

3.2.2 Ensayos en celdas de difusión

Se emplearon celdas de difusión de Franz para la realización de ensayos de liberación y permeación que cuentan con un compartimiento dador y uno receptor entre los que se posiciona una membrana. Para cada metodología se establecieron en primer lugar las condiciones de ensayo que fueron desafiadas en ensayos preliminares y se realizó la validación del método de cuantificación analítica. Ambos estudios fueron realizados para los productos que en la etapa de extracción demostraron contener un contenido de cafeína superior al 0,009 %.

3.2.2.1 Condiciones de ensayo

Para determinar las condiciones de ensayo se consideraron las generalidades y particularidades de cada tipo de estudio a realizar (liberación y permeación). Respecto a las

condiciones generales, de acuerdo con el uso esperado de producto se siguieron las recomendaciones de organismos internacionales en materia de implementación de ensayos de permeación *in vitro* en celdas de difusión [22], [29], [30] y las condiciones propuestas en estudios previos del grupo de investigación [74], [76]. Así mismo, se estableció y estandarizó la aplicación de la dosis considerando las propiedades fisicoquímicas de cada producto a evaluar.

De acuerdo con la revisión bibliográfica se establecieron algunas de las condiciones generales para la realización de los ensayos en celdas de difusión. En primer lugar, la temperatura de membrana en 32 ± 1 °C, que corresponde a la temperatura de la piel y es el valor recomendado en la directriz 428 de la OECD [29]. Así mismo, dado que se evalúa producto comercial en condiciones de uso, en el que generalmente se aplica una cantidad y se deja 'absorber' brevemente, se estableció la aplicación de dosis finita a 10 mg/cm^2 según el documento de opinión del SCCP para sustancias semisólidas en condiciones de uso de producto [30]. De igual manera, de acuerdo con estudios previos dentro del grupo de investigación, se fijó la velocidad de agitación en 400 rpm [77], [78] por resultar adecuada para celdas de 5 a 75 mL de volumen de compartimiento receptor. Respecto al medio receptor, el medio adoptado fue buffer de fosfatos salino a pH 7,4 por considerarse un fluido que imita las condiciones del medio fisiológico *in vivo* y, además, porque fue el medio utilizado por Sanabria et. Al [74] para el cual se validó la metodología analítica de cuantificación de cafeína por HPLC-DAD, cuyo sistema cromatográfico fue implementado y validado para la cuantificación de cafeína en los ensayos de difusión del presente trabajo.

Por otro lado, para establecer las condiciones particulares se realizaron ensayos preliminares con el mejor y peor escenario de contenido de cafeína de los productos comerciales para ambos tipos de estudios en celdas de difusión. Los estudios preliminares permitieron establecer el tiempo de duración, frecuencia de muestreo, temperatura del baño de calefacción, comportamiento de liberación y permeación preliminar, rango de cuantificación y tratamiento de las muestras recolectadas. Estos ensayos de permeación se realizaron con piel no íntegra (piel que ha sido limpiada, almacenada y refrigerada) estableciendo la parte del cerdo a utilizar, el tratamiento de la piel y su almacenamiento, además de servir como comparador frente al empleo de piel íntegra.

3.2.2.2 Validación de la metodología de cuantificación bioanalítica

Para cuantificar la cafeína en el compartimiento receptor, se utilizó la técnica de cromatografía líquida HPLC-DAD adoptando el sistema cromatográfico propuesto en el presente trabajo para la cuantificación de cafeína extraída de los productos cosméticos, y que se basó en el sistema planteado en estudios previos para la cuantificación de cafeína en ensayos de permeación con mucosa oral porcina [74]. Se mantuvieron las mismas condiciones de columna cromatográfica, temperatura, proporción y flujo de fase móvil, volumen de inyección y longitud de detección empleadas para la cuantificación de la cafeína extraída que demostraron obtener el pico de cafeína alrededor de los tres minutos. Sin embargo, debido a que se trata de ensayos de permeación que incluyen el uso de una matriz biológica, la piel de cerdo, la metodología de validación fue realizada en conformidad con las pautas para metodologías bioanalíticas M10 de la conferencia internacional de armonización (ICH) [79] y la guía de validación de métodos bioanalíticos de la Food and Drug Administration (FDA) [80]. Se evaluaron los parámetros de selectividad, linealidad, idoneidad del sistema, reproducibilidad de inyección, exactitud y precisión, límite de detección, estabilidad, recuperación y *carry over*.

- **Preparación de muestras**

Bajo los lineamientos de referencia, las muestras fueron preparadas de dos maneras. En primera instancia, se prepararon muestras correspondientes al analito disuelto en solución del medio receptor y correspondieron a las muestras utilizadas para realizar la curva de calibración (CC) y, en segundo lugar, se prepararon muestras con el analito disuelto en medio receptor que fue sometido previamente a las condiciones del ensayo de permeación, estas últimas fueron denominadas 'muestras control (MC)'.

Muestras de curva de calibración (CC): se preparó cada día una solución madre de cafeína disuelta en medio receptor pesando 12,5 mg de cafeína en un balón de 500 mL para una concentración de 0,025 mg/mL. De esta solución se tomaron diferentes alícuotas como se muestra en la **Tabla 3-5** realizando dos repeticiones de cada nivel, llevando a volumen con más medio fresco en un balón aforado de 10 mL.

Tabla 3-5: Niveles de la curva de calibración preparados a partir de una solución madre de concentración de 0,025 mg/mL.

Nivel	n1	n2	n3	n4	n5	n6
Concentración [µg/mL]	0,05	0,25	0,5	0,75	1	1,25
Alícuota [µL]	20	100	200	300	400	500

Muestras control (MC): Las muestras correspondieron a diferentes cantidades de cafeína tomadas de una solución madre que fueron preparadas de manera similar a las de la curva de calibración, pero empleando medio receptor que fue sometido a las condiciones de ensayo. Para ello, se utilizó un 'extracto de piel' que fue preparado dejando la piel tratada en el medio receptor a las condiciones de agitación, temperatura y duración del ensayo seleccionadas. La piel fue tomada de seis especímenes diferentes realizando extracto de cada uno. Todos los extractos fueron centrifugados a 8500rpm por 10 min para eliminar partículas grandes que pudiesen desprenderse de la piel.

De la solución madre se tomaron alícuotas para preparar cinco repeticiones de cada nivel, que fueron llevadas a un balón aforado de 10 mL y completadas a volumen con el extracto de piel. Los niveles preparados para las muestras MC correspondieron al límite de detección (LOD) (n1), nivel bajo (n2), nivel medio (n4) y nivel alto (n6).

Las muestras de *recuperación*, se realizaron tomando alícuotas de la misma solución madre hecha para las MC manejando los mismos niveles, se hicieron dos repeticiones de cada nivel y se aforó con extracto de piel que fue previamente tratado antes de ser enriquecido con el analito. Es decir, se empleó extracto previamente filtrado.

- **Análisis previo**

Debido a que la complejidad del extracto de piel presiona el sistema cromatográfico, se realizó un análisis previo comparando el comportamiento de las curvas de calibración cuando se empleaba solo el medio receptor y cuando se empleaba el extracto de piel. Este ensayo tenía como objetivo determinar la igualdad entre las curvas, de manera que, la curva de calibración de cada día se pudiera realizar solamente con medio receptor y no fuera necesario emplear el extracto de piel. Para esto se preparó con medio receptor y extracto de piel soluciones madre como se establece en la sección de preparación de muestras, realizando tres

repeticiones para los seis niveles aforando con medio y aforando con extracto de piel, según correspondiera.

- **Selectividad**

Se analizaron las muestras blanco de la matriz biológica de seis especímenes diferentes con el objetivo de determinar posibles interferencias con el pico del analito. Por esta razón, se realizó la comparación de perfil y pureza cromatográfica del extracto de piel de los seis especímenes, aceptando la selectividad al demostrar visualmente que los perfiles estuvieran libres de interferencias en el tiempo de retención del analito. A su vez, se consideró la pureza de pico para las muestras control.

- **Linealidad**

Para evaluar este parámetro se consideraron los resultados obtenidos del análisis previo. Se prepararon seis niveles de concentración de cafeína en el rango de 0,05 a 1,25 $\mu\text{g/mL}$ (incluido el LOD), que fue establecido teniendo en cuenta la naturaleza de los ensayos en las celdas de difusión. Se realizó una curva de calibración cada día efectuando dos repeticiones de cada nivel. Para evaluar estadísticamente la linealidad, se aplicaron los mismos criterios que fueron establecidos para la validación de la extracción de cafeína (**Tabla 3-3**).

- **Exactitud y precisión**

De acuerdo con los lineamientos, para evaluar la exactitud y precisión se prepararon muestras control de una sola fuente de matriz a cuatro niveles de concentración, n1, n2, n4 y n6. Se realizaron cinco réplicas de cada nivel en tres días diferentes. A su vez, un segundo analista realizó dos réplicas de cada nivel los mismos tres días, aforando con el extracto de piel. La precisión se evaluó en términos de precisión intermedia teniendo en cuenta cuatro niveles, dos analistas, tres días, y de repetibilidad, analizando cinco réplicas de cada nivel el mismo día y con el mismo analista. La precisión intermedia se estimó analizando el coeficiente de variación global, mientras que la repetibilidad se evaluó mediante el coeficiente de variación promedio ponderado obtenido después de verificar homogeneidad de varianzas por la prueba de Cochran para cuatro niveles de concentración y cinco réplicas por nivel. La exactitud se estimó determinando el porcentaje de recuperación. Se consideró como criterio de aceptación para exactitud que el coeficiente de variación para el porcentaje de recuperación en cada nivel de concentración fuera inferior a 15 %. Así mismo, para la precisión el coeficiente de variación

de las concentraciones determinadas en cada nivel, cada día y para ambos analistas no debería exceder el mismo valor.

- **Idoneidad**

Se estimó la aptitud del sistema y la reproducibilidad instrumental realizando la reinyección para el mismo nivel de concentración (n4) seis veces. Con ayuda del software LC Solutions® se determinaron los parámetros de idoneidad aceptando para el tiempo de retención una variación inferior al 10 %, para la respuesta instrumental un RSD inferior al 2 %, un factor de asimetría entre 0,8 y 2, una separación mayor a la unidad y un número de platos teóricos superior a 2000.

- **Límite de detección**

Debido a la naturaleza de los ensayos, se esperaba que la cantidad de cafeína encontrada fuera baja o incluso nula y que pudiera incrementar con el tiempo de duración del ensayo. Por este motivo, se consideró adecuado determinar el parámetro de límite de detección que fue incluido dentro de la curva de calibración y tomado como el punto más bajo de las muestras control. Esta mínima cantidad detectable fue determinada bajo el método de diluciones seriadas a bajas concentraciones.

- **Estabilidad de las soluciones**

Para evaluar la estabilidad del analito, tres muestras control preparadas a concentración alta y baja el primer día, se dejaron en condiciones de almacenamiento (4 °C refrigeración) y otras tres muestras control de concentración alta y baja se dejaron a condiciones de trabajo 20±2 °C. Las muestras fueron inyectadas el segundo y tercer día de análisis y dos semanas después. Se consideró como criterio de aceptación que la concentración media en cada nivel estuviera dentro de ± 15 % de la concentración nominal.

- **Recuperación**

Para evaluar este parámetro se comparó la respuesta instrumental de cuatro niveles de concentración de muestras control (MC), con la respuesta para los mismos niveles de las muestras blanco que fueron procesadas y luego enriquecidas con el analito, es decir, se filtró el extracto antes de adicionarle cafeína. La recuperación se considera aceptable si el

coeficiente de variación es inferior al 15 % para el porcentaje de recuperación promedio. Se aceptan recuperaciones del 80 a 120 %.

- **Arrastre (*Carry over*)**

El arrastre se evaluó analizando dos muestras de solvente que se inyectan después de que pasó por el sistema cromatográfico la muestra control más alta (n6). Se consideró aceptable que el arrastre en las muestras de solvente fuera inferior al 20 % de la respuesta del analito en el límite de detección.

3.2.2.3 Ensayos de liberación y permeación

Los estudios de liberación y de permeación, para cada producto en celdas de difusión de Franz incluyeron los siguientes aspectos. En el compartimiento receptor se adicionó medio previamente desgasificado y los imanes para agitación. La chaqueta de las celdas se conectó al recirculador y se establecieron las condiciones de temperatura y agitación. Para los ensayos de liberación se empleó una membrana de acetato de celulosa (12000 D) previamente hidratada mientras que, en el caso de los estudios de permeación, se utilizó piel porcina como membrana con dos tipos de espesores, piel de espesor total, es decir, piel dermoepidérmica (con un espesor aproximado de $1\pm 0,5$ mm) y piel con alrededor de 3 mm de tejido hipodérmico, que fueron ubicadas y ajustadas entre el compartimiento receptor y el dador. Se permitió el equilibrio del sistema hasta alcanzar la temperatura determinada y en el caso del estudio de permeación se midió la integridad de la membrana a través del valor de TEWL con la sonda Courage+Khazaka®. Para ambos estudios, la dosis fue aplicada sobre la membrana en el compartimiento dador y el medio receptor fue muestreado a diferentes tiempos durante la duración del ensayo.

Los ensayos fueron realizados por triplicado con cada tipo de membrana y las muestras tomadas durante el desarrollo del estudio fueron tratadas en cada caso y filtradas para su posterior cuantificación, estableciendo la cantidad de cafeína que se encontraba en el compartimiento receptor. El producto que se mantuvo sobre la membrana en el compartimiento dador fue tratado bajo el procedimiento de extracción y cuantificado para determinar el contenido de cafeína que no atravesó la membrana. Para los ensayos de liberación, los resultados fueron representados en gráficas de porcentaje de cafeína respecto a la cantidad aplicada encontrada en el compartimiento receptor en función del tiempo, y para

los estudios de permeación, el uso de ambos espesores permitió por diferencia establecer la concentración de cafeína [%w/w] que quedó retenida en la hipodermis y la que podría llegar al fluido sistémico. Para cada tiempo de muestreo se determinó el promedio de las tres réplicas y su desviación estándar y se analizaron los resultados estableciendo la concentración máxima de cafeína obtenida. A su vez, para el estudio de liberación se realizó un análisis del factor de similitud f_2 comparando todos los perfiles.

El procedimiento general para ambos estudios en celdas de difusión, tanto el de liberación como el de permeación, se siguió encendiendo el baño de calefacción y estableciendo la temperatura adecuada para cada ensayo, enseguida, la membrana fue acondicionada por 15 minutos en el medio receptor el cual fue filtrado y desgasificado para su uso. El imán de agitación fue ubicado en el fondo del compartimiento receptor y el líquido adicionado, la membrana se posicionó entre el compartimiento dador y receptor y se ajustó con una pinza cuidando de no dejar burbujas en el medio. La celda se colocó en una plancha multipunto conectando las mangueras a la chaqueta de calentamiento y se activó la agitación y la recirculación del baño térmico. El sistema fue equilibrado por 15 a 30 minutos hasta que la membrana alcanzara la temperatura establecida. En el caso de los ensayos de permeación se determinó la integridad de membrana antes de iniciar el ensayo. Enseguida, la dosis fue aplicada y la cámara receptora fue muestreada con la frecuencia establecida. Al finalizar el ensayo el producto remanente sobre la membrana fue recolectado y tratado bajo el procedimiento de extracción de cafeína para su cuantificación.

4. Capítulo 4. Resultados y discusión

4.1 Selección y caracterización de los productos

Producto de la investigación del mercado se obtuvieron siete productos comercializados en Colombia con proclamas de efecto liporeductor que declaran en sus ingredientes la presencia de cafeína. En la investigación se detectaron que las presentaciones comerciales más difundidas en el mercado pertenecen a la forma cosmética tipo gel, emulgel y crema. Sin embargo, teniendo en cuenta los ingredientes y la estructura heterodispersa, se decidió adquirir los productos de las formas cosméticas tipo gel y emulgel por presentar ingredientes cercanos descartando el sistema tipo crema.

Los productos adquiridos fueron elegidos sin ningún interés particular en la marca sino por su facilidad de consecución y precio asequible¹, teniendo en cuenta que estos factores los hace productos al alcance del consumidor y, por ende, con una más alta probabilidad de compra que aquellos con mayor precio y menor accesibilidad. Finalmente se seleccionaron siete productos codificados de la siguiente forma 01AZ, 02EB, 03NA, 04HV, 05CA, 06AD, 07AR. Dichos productos, en su etiquetado recomiendan ser aplicados bajo masaje hasta su completa absorción, algunos indican 'dejar actuar' por 15 min o 30 min bajo uso diario de una o dos veces al día sin necesidad de enjuague.

Los productos adquiridos fueron caracterizados en términos de pH, parámetros reológicos, fórmula cualicuantitativa, atributos sensoriales y microscopía electrónica de barrido obteniendo los resultados que se describen a continuación.

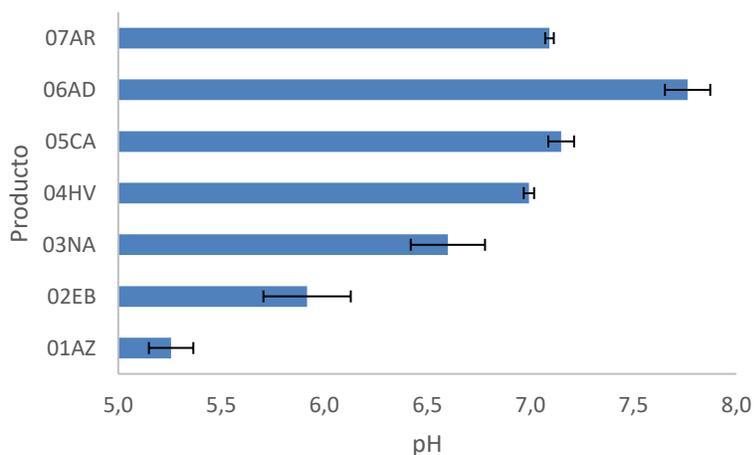
4.1.1 pH

Los productos evaluados están destinados a ser puestos en contacto con las áreas del cuerpo afectadas por padecimientos estéticos relacionados con el exceso de grasa, principalmente abdomen, caderas, piernas y brazos, de acuerdo con las indicaciones del etiquetado. Estas zonas presentan un pH ligeramente ácido que oscila entre 4,5 a 6, éste

¹ Precio inferior a 50000 \$COP

funciona como una barrera química, que disminuye el crecimiento bacteriano. Por el contrario un pH alcalino tiende a causar desequilibrio dejando a la piel expuesta a patógenos y afecta a la absorción de sustancias aplicadas sobre la piel aumentando su permeabilidad [13]. Se considera que los productos cosméticos aplicados sobre la piel deben presentar un pH similar a ésta para mimetizar la barrera y mantener el equilibrio ácido. La **Figura 4-1** expone los valores de pH obtenidos para tres réplicas de cada producto. En esta, es posible observar que los productos presentan un rango de pH que oscila entre 5 y 8, un rango más amplio que el que posee la piel. En efecto, solo dos de los siete productos evaluados presentaron un valor de pH que respeta el valor de la barrera cutánea normal y corresponde a los productos 01AZ y 02EB, mientras que el gel 06AD presentó el valor más alcalino y cercano a 8, lo que implica que, al ser aplicado, su mayor alcalinidad respecto a los otros podría provocar un desequilibrio a la barrera cutánea aumentando su permeabilidad. Por otro lado, los productos restantes presentan valores entre 6,5 y 7,1 siendo el gel 03NA el más ácido seguido por el 04HV, 07AR y 05CA, estos tres últimos valores son cercanos entre sí y oscilan alrededor del pH neutro.

Figura 4-1: Valor de pH obtenido para los siete productos seleccionados del mercado colombiano.

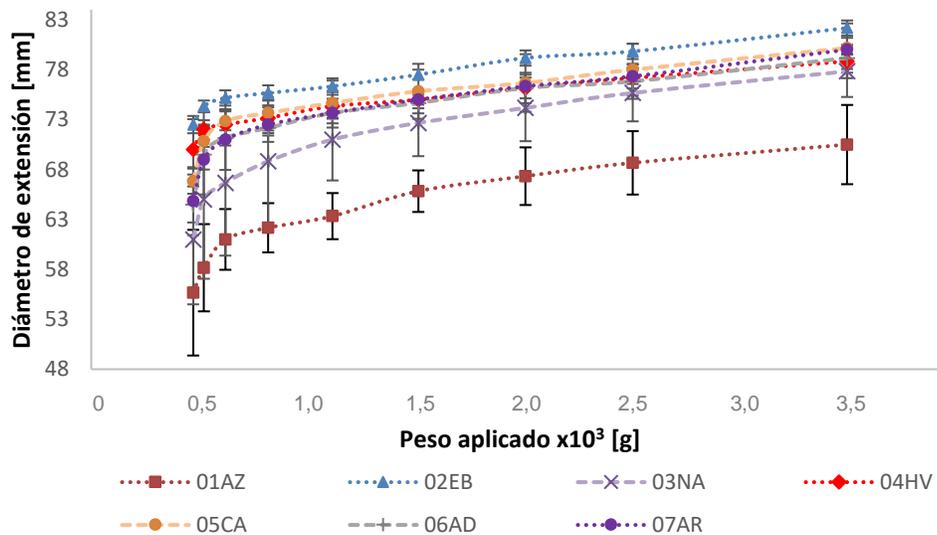


4.1.2 Parámetros reológicos

Extensibilidad y adherencia: Estas propiedades fueron evaluadas por su relación con la firmeza y facilidad de aplicación del producto puesto que, inciden en la absorción cutánea

y la duración del efecto cosmético que se busque. La extensibilidad, se define como el incremento de superficie que experimenta una cierta cantidad de producto semisólido, al someterlo a la acción de pesos crecientes en intervalos fijos de tiempo [81], determinándose el área de extensión que es correlacionada con la facilidad del producto para extenderse sobre la piel. La **Figura 4-2** muestra el perfil de extensibilidad obtenido para cada producto, donde se observa que los geles presentan una tendencia similar entre ellos, con un rápido incremento hasta la tercera medición y luego incrementos moderados. A su vez, se observa que cuatro de los siete productos evaluados presentan un perfil muy cercano, compartiendo incluso algunos valores como lo son los geles 04HV, 05CA, 06AD y 07AR, presentando un comportamiento intermedio en comparación con los demás productos. El producto 02EB presenta los valores más altos, demostrando que es el de menor firmeza y, que tiende a extenderse cubriendo una mayor superficie por la acción de la presión aplicada. El gel 01AZ presenta los valores más bajos lo que podría indicar que posee una firmeza inicial mayor que los demás geles y una pobre capacidad de extenderse sobre la superficie con respecto a los otros productos.

Figura 4-2: Perfil de extensibilidad que corresponde al incremento del diámetro en función del peso aplicado para los siete productos evaluados.



Para establecer la proporción con que se extienden los productos se determinó la pendiente de la regresión lineal de cada perfil, como se muestra en la **Tabla 4-1**, de esta forma se encontró que los productos 03NA y 01AZ presentaron una mayor pendiente, indicando que al aplicar presión la superficie de extensión cambia de forma más pronunciada que en los otros, por lo que podrían considerarse que son los que presentan

mayor facilidad de aplicación; esto se contradice un poco con la baja área alcanzada en comparación con los demás, reflejando una capacidad inferior para extenderse sobre la superficie. Por su parte los productos 04HV, 05CA y 07AR presentan pendientes similares por lo que la respuesta de aumento de superficie es proporcional en estos geles con el incremento del peso aplicado, mientras que el producto 02EB con la menor pendiente tiende a tener un cambio de extensión más leve con el peso aplicado, no obstante, es este el producto que presentó un área de extensión más alta, por lo que se considera que es el gel con mayor facilidad de aplicación y una mayor capacidad de extensión sobre la superficie.

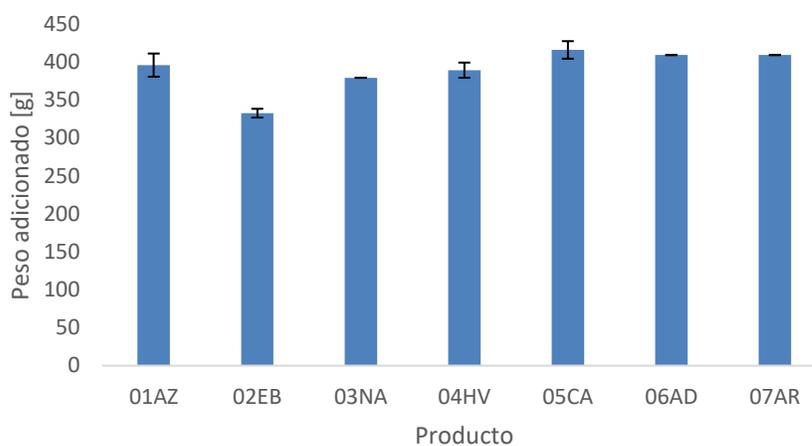
Tabla 4-1: Parámetros de la regresión lineal para el perfil de extensibilidad de los productos evaluados

Producto	Pendiente	Intercepto	R ²
01AZ	0,0043	57,298	0,85
02EB	0,0028	72,882	0,94
03NA	0,0047	63,401	0,83
04HV	0,0025	70,664	0,91
05CA	0,0034	69,454	0,79
06AD	0,0037	67,724	0,76
07AR	0,0039	67,522	0,81

En cuanto a la propiedad de adherencia, esta se asocia con la energía de adhesión del producto y la afinidad de sus partículas a las superficies. La **Figura 4-3** muestra los valores de adherencia obtenidos para los productos evaluados. Se observa que para la mayoría de ellos el peso aplicado para que las placas que contienen el producto se separen es similar, siendo el gel 05CA quien presentó el valor más alto en este peso, seguido por 06AD y 07AR con el mismo valor; luego están los productos 01AZ, seguido por el 04HV y finalmente el gel 03NA, que mostraron un comportamiento de adherencia muy similar, con una diferencia de 36 g entre el primer y el último valor, margen que se estrecha gracias a las barras de error. El gel 02EB presentó el valor más bajo ya que necesitó menos de 83 g respecto al gel con mayor adherencia para que las placas fueran separadas, por lo que es el producto que presenta menor energía de adhesión. Esto probablemente se debe a que es el único producto de forma cosmética emulgel, que incluye un sistema tensoactivo que modifica la tensión interfacial entre la fase oleosa y acuosa, que podría modificar la afinidad por la superficie en la que se extiende, presentando una adherencia más débil en

comparación con la de los geles. Se ha observado que, una mejor adherencia a la superficie de la piel permite que el ingrediente activo esté más disponible asociándose a una mayor absorción del mismo [53], por lo que el producto 02EB podría ser aquel con menor permeación de cafeína respecto a los demás.

Figura 4-3: Adherencia de los productos evaluados.



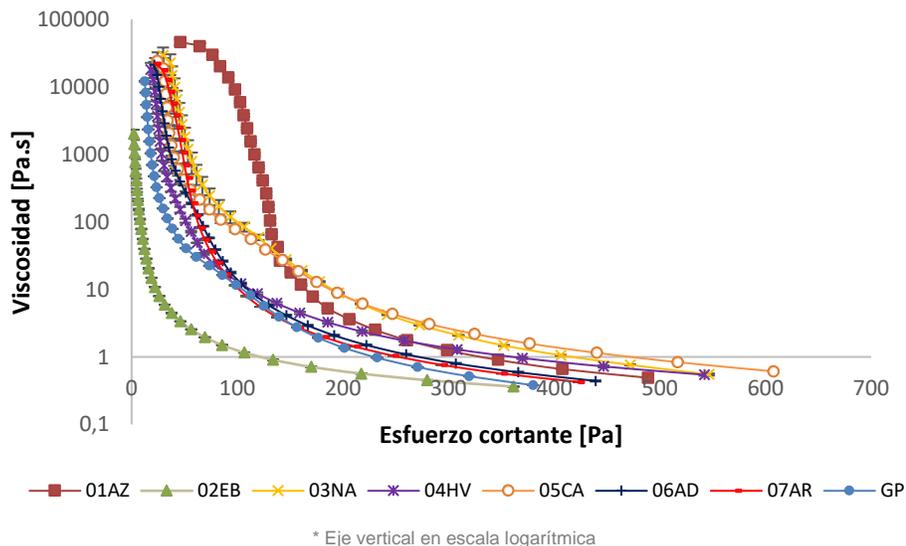
Viscosidad: la **Tabla 4-2** muestra el valor de viscosidad promedio obtenido para tres muestras de cada producto. El producto 05CA presenta el mayor valor de viscosidad seguido por el producto 03NA con una viscosidad similar, a su vez, la viscosidad del gel 05CA es el doble del valor obtenido para los geles 04HV, 01AZ, 06AD y 07AR que presentan valores similares entre ellos, y es incluso seis veces el valor del gel 02EB siendo éste el producto de menor valor de viscosidad. Los productos indican en su etiqueta contener carbómero y agua por lo que se pueden considerar hidrogeles, para este efecto, se realizó un hidrogel de prueba en el laboratorio con contenido de 1% de carbómero, el cual presentó una viscosidad de alrededor de 30000 cPs, bajo esta referencia, es posible considerar que el producto con mayor viscosidad (05CA) podría incluir poco menos de este porcentaje de carbómero, y los demás, cantidades inferiores, sin embargo, la formulación puede presentar mayor o menor viscosidad dependiendo no solo de la cantidad de agente gelificante sino también del tipo de gelificante, así como de la proporción de agua y los demás ingredientes. La viscosidad puede estar relacionada con el comportamiento de permeación del activo, a menudo una alta viscosidad se correlaciona con una baja tasa de permeación [82][83], lo que podría esperarse de los productos con viscosidad elevada.

Tabla 4-2: Valor promedio de viscosidad y su desviación (n=3).

Producto	Viscosidad (cPs) \pm SD
01AZ	15433 \pm 153
02EB	4670 \pm 54
03NA	25200 \pm 480
04HV	17233 \pm 83
05CA	26693 \pm 441
06AD	13440 \pm 209
07AR	11400 \pm 203

Así mismo, se determinó el comportamiento de la viscosidad en función del esfuerzo cortante para los productos evaluados. La **Figura 4-4** muestra que, en general, las muestras presentan un comportamiento similar cuando son sometidas a la deformación con un perfil que tiende a disminuir con el esfuerzo, es decir, los productos pierden su viscosidad a medida que se ejerce sobre ellos fuerza de corte, comportamiento esperado para formas cosméticas semisólidas que dentro de sus características de calidad sensorial se busca que sean viscosos en reposo pero que se esparzan fácilmente al cizallarse [84]. Este comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento es típico de los fluidos pseudoplásticos por lo que los productos evaluados podrían catalogarse dentro de esta categoría.

Figura 4-4: Perfil de viscosidad en función del esfuerzo cortante para los siete productos del mercado y un gel de prueba fabricado en el laboratorio (GP) con 0,5 % de carbómero y algunos ingredientes en común de los productos comerciales.



Aunque el comportamiento general de los perfiles es similar, los productos evaluados presentaron algunas particularidades. La principal diferencia se observa en el gel 01AZ, el cual necesitó la aplicación de un esfuerzo mayor para disminuir su viscosidad, lo que implicaría que la fuerza de aplicación respecto a los demás productos fuera mayor para obtener el mismo efecto de extensión sobre la superficie cutánea. Este resultado corresponde con el perfil obtenido de extensibilidad donde demostró ser el gel con menor capacidad de extenderse bajo la misma presión aplicada. De otra parte, el producto 02EB presenta un perfil mucho más corto que los demás geles indicando que sufre un adelgazamiento más rápido con el esfuerzo, en efecto, no sólo su viscosidad inicial es menor, sino que la pierde con mayor facilidad sugiriendo que es más fluido que los demás geles, característica que corresponde con los resultados de extensibilidad. El comportamiento del gel 03NA es similar al del gel 05CA y mayor a los productos restantes, es decir, que el esfuerzo para causar el mismo grado de deformación es más alto respecto al de los otros, lo que los hace más viscosos. Para los geles 04HV, 06AD y 07AR su comportamiento de deformación es similar entre ellos y al del gel fabricado en el laboratorio (GP), con una concentración de agente gelificante de 0,5 %, el 86 % de agua y 0,75 % de agente neutralizante. Los resultados anteriores junto con los de viscosidad podrían indicar que la concentración de agente gelificante para los geles 04HV, 06AD y 07AR oscila alrededor del 0,5 % mientras que para los geles 03NA y 05CA puede estar entre el 0,5 y 1 % y posiblemente el producto 02EB presente una concentración inferior al 0,5 %.

Con el fin de complementar los resultados anteriores, se presentan las curvas de flujo del esfuerzo cortante en función de la velocidad de corte para una fuerza de hasta 200Pa (**Figura 4-5**), que fueron ajustadas al modelo de ley de potencia de Ostwald (**Tabla 4-3**) por ser uno de los modelos que describe satisfactoriamente el comportamiento de flujo de hidrogeles que contienen carbómero [70]. Este modelo, descrito en la ecuación 4-1, relaciona el comportamiento de los productos con la fuerza de corte (τ) cuando se aplica una velocidad de cizalla ($\dot{\gamma}$) y permite obtener el coeficiente de consistencia (K) y el índice de comportamiento de flujo (n).

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad \text{Ec. 4-1}$$

Como se puede observar en la **Tabla 4-3**, se obtuvo un ajuste aceptable, superior a 0,9, y todos los valores del índice de flujo son inferiores a 1, confirmando el comportamiento pseudoplástico de los productos. Por otro lado, un mayor coeficiente de consistencia se

asocia con una mayor viscosidad, por lo que los geles 01AZ, 03NA y 05CA presentaron una mayor consistencia seguidos por los geles 07AR, 06AD y 04HV con coeficientes intermedios y similares al del gel de prueba y finalmente, el gel 02EB con el menor coeficiente, que indica que es el producto con menor consistencia y, por lo tanto, menor viscosidad en concordancia con lo observado en la **Figura 4-5**.

Figura 4-5: Curvas de flujo, esfuerzo cortante en función de la velocidad de corte (ambos ejes en escala logarítmica) para los siete productos evaluados y el gel de prueba fabricado en el laboratorio (GP).

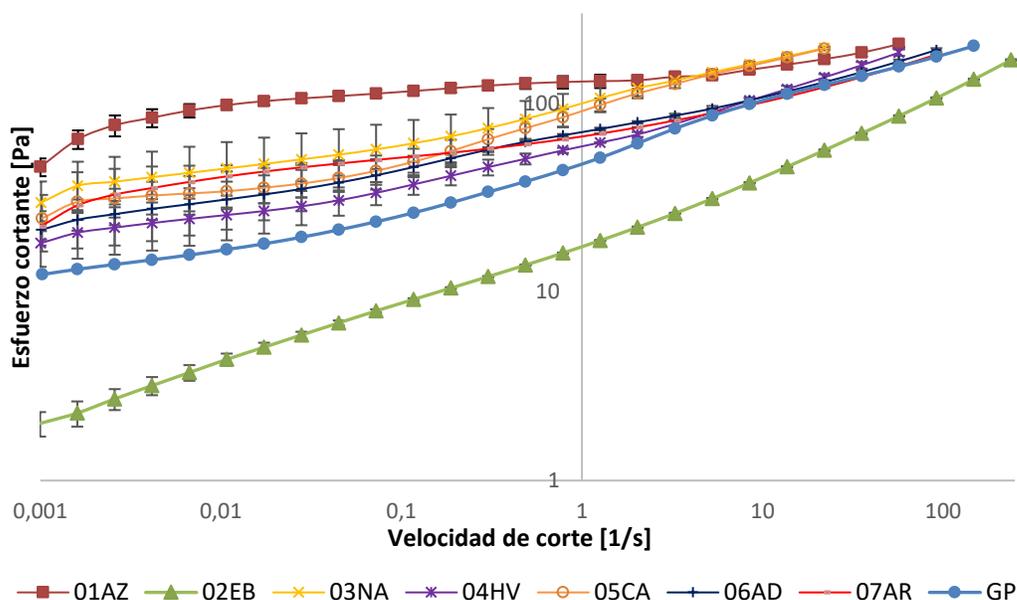


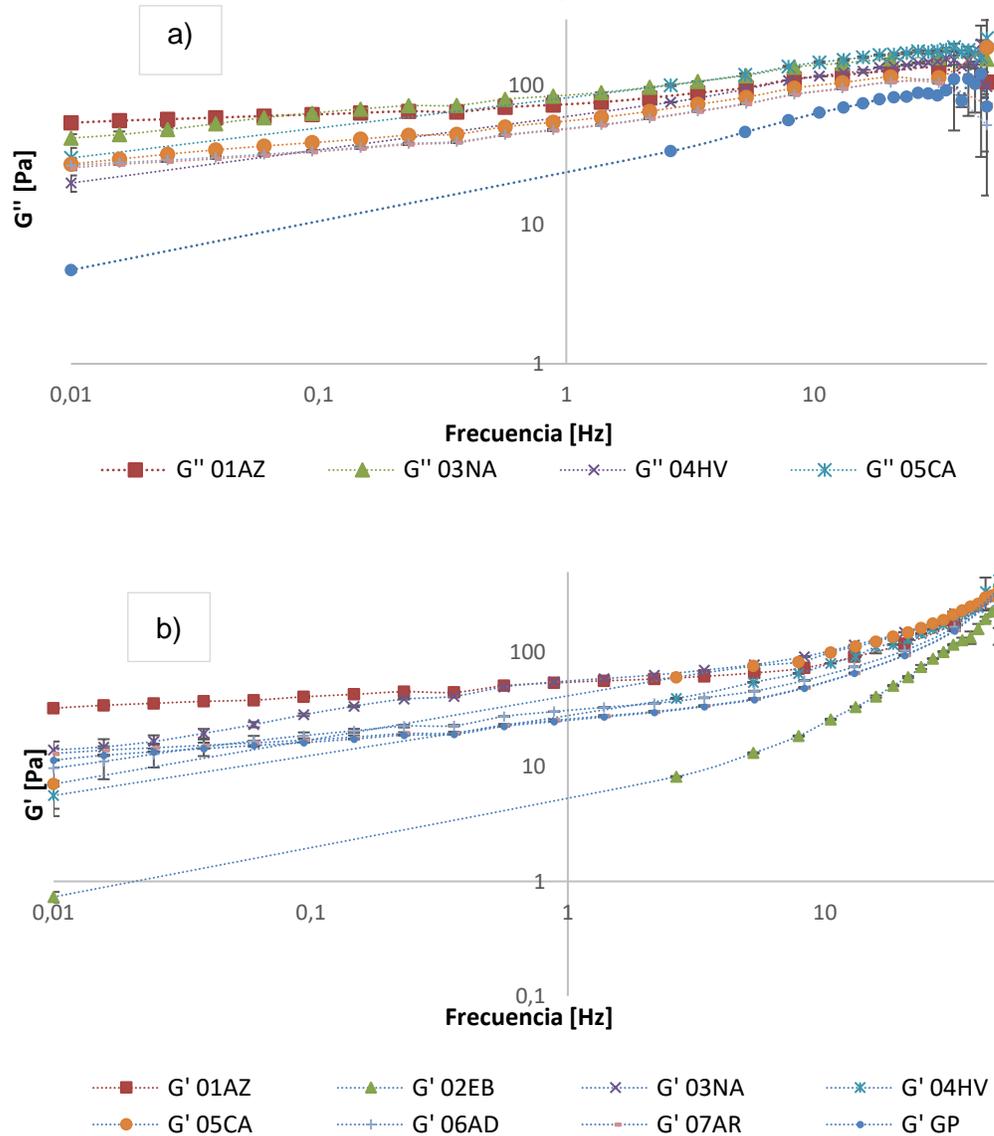
Tabla 4-3: Parámetros del modelo de Ostwald para los siete productos del mercado y el gel de prueba fabricado en el laboratorio (GP).

	K	n	R ²
01AZ	132,7	0,0938	0,933
02EB	19,829	0,3455	0,983
03NA	102,21	0,1817	0,987
04HV	65,032	0,2056	0,973
05CA	91,896	0,2092	0,985
06AD	72,233	0,1853	0,988
07AR	74,508	0,152	0,959
GP	52,931	0,2478	0,994

Módulos G' y G'' : los ensayos de viscosimetría dinámica permitieron evaluar el comportamiento oscilatorio, determinando los módulos de elasticidad o almacenamiento (G') y viscosidad o pérdida (G'') en función de la frecuencia en un rango de 0,1 a 50 Hz y en función del esfuerzo cortante a una frecuencia de 1Hz como se muestra en la **Figura 4-6**. Es importante notar que el módulo G' hace referencia a la energía que se almacena en el gel cuando se somete a tensión, mientras que el módulo G'' da cuenta de la energía que se disipa [85], por lo que, cuando predomina el módulo de almacenamiento sobre el módulo de pérdida se asocia con una mayor rigidez del sistema, mientras que cuando el módulo de viscosidad predomina se considera que la estructura tiene un comportamiento más fluido. En la **Figura 4-6** se puede observar que en general, todos los productos poseen una tendencia similar respecto al comportamiento de ambos módulos en función de la frecuencia, siendo un comportamiento ascendente que se distingue por una predominancia del módulo de pérdida hasta alcanzar valores de frecuencia mayores donde comienza a predominar el módulo de almacenamiento. El resultado anterior implica que, en primer lugar, la predominancia del módulo G'' a bajas frecuencias determina que los productos presentan un comportamiento como líquido tendiendo a fluir con facilidad, lo que se esperaba de productos cosméticos semisólidos, cuya aplicación sobre la piel se requiere que sea fluida [84]. Mientras que, el aumento del módulo G' a frecuencias más altas puede significar la ruptura parcial de la red polimérica así como fue determinado por Kim J. et al. [70], en donde las estructuras rígidas y quebradizas de los geles de carbómero neutralizados con TEA son destruidas por el cambio de oscilación continuo a medida que se aumenta la frecuencia ocasionando un aumento del módulo de almacenamiento.

Por otro lado, claramente, debido a la diferencia en la forma cosmética, los valores encontrados para los módulos a lo largo del ensayo para el emulgel 02EB son distantes al comportamiento de los demás geles, con valores de módulos inferiores dada su baja consistencia. Así mismo, en orden decreciente en rigidez de estructura de acuerdo con la tendencia del módulo de almacenamiento se encuentran los geles 03NA, 05CA, 01AZ, 04HV, 06AD y 07AR.

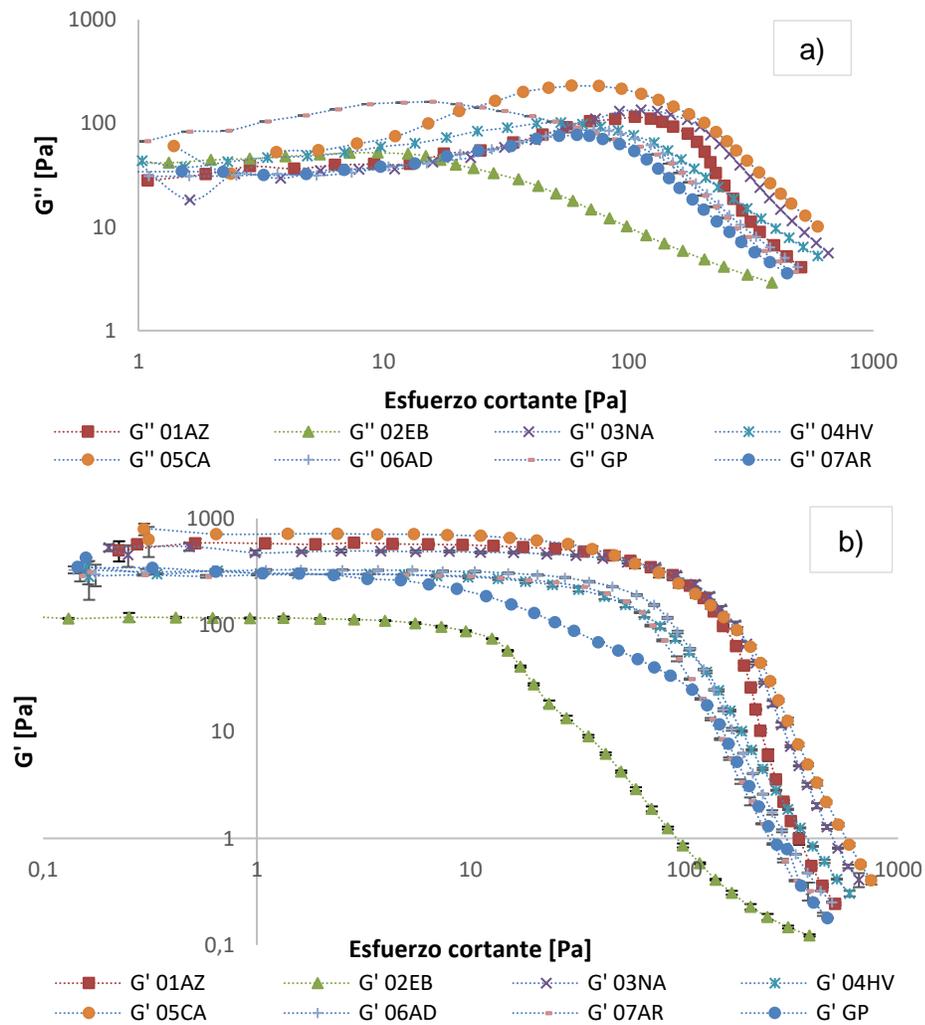
Figura 4-6: Módulos de a) viscosidad (G'') y b) elasticidad (G') en función de la frecuencia para los siete productos del mercado y el gel de prueba fabricado en el laboratorio (GP).



De otra parte, el ensayo de barrido permitió visualizar la resistencia a la deformación de las muestras. En la **Figura 4-7** se observa que, para velocidades de corte bajas los productos parecen comportarse de forma lineal, sin embargo, ambos módulos sufren caídas abruptas a medida que el esfuerzo cortante aumenta, y, en el caso del módulo G'' antes de su caída se presenta un aumento. En este punto particular para cada producto, al aumentar el esfuerzo se induce la ruptura de la estructura inicial siendo un punto de

esfuerzo cortante crítico, es decir, un punto en que el aumento del esfuerzo induce un efecto destructivo. En ese sentido, el desplazamiento hacia arriba de la curva del módulo G'' puede ser debida a una estructura más rígida. Estos comportamientos de los módulos se encuentran conformes con los resultados obtenidos por Kim J. et al. [70] quienes evaluaron hidrogeles a base de carbopol 941. En general, una mayor cantidad de polímero se asocia con una estructura más rígida, de forma que, se confirma lo mencionado previamente derivado de las otras caracterizaciones respecto al probable contenido de carbómero en los productos.

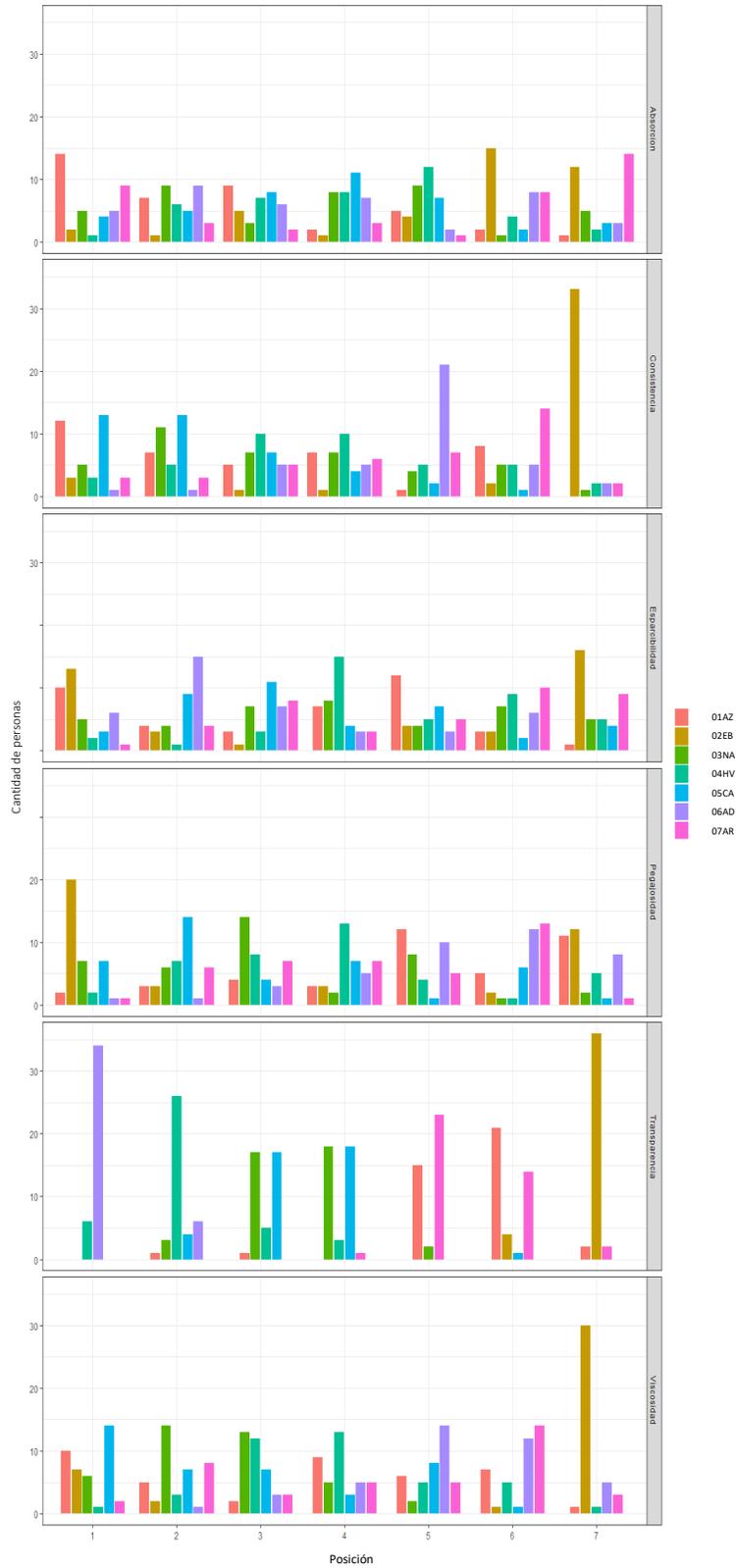
Figura 4-7: Módulos de a) viscosidad (G'') y b) elasticidad (G') en función de la velocidad de corte para una frecuencia fija de 1 Hz para los siete productos evaluados y el gel de prueba fabricado en el laboratorio (GP)



4.1.3 Atributos sensoriales

Los resultados de la evaluación sensorial tipo ranking aplicada a 40 posibles consumidores fueron analizados en dos pasos. En primer lugar, se efectuó un análisis exploratorio descriptivo para generar un panorama general y luego se realizó un análisis estadístico para determinar si existía diferencia significativa entre los productos para cada uno de los atributos evaluados. De esta forma, para el análisis descriptivo, se graficó la distribución de cada uno de los atributos para cada uno de los productos evaluados como se muestra en la **Figura 4-8**. Se observó que, para los atributos *absorción*, *esparcibilidad*, y *pegajosidad* la distribución de las posiciones en la percepción de los encuestados fue principalmente homogénea; casi para todos los geles, los atributos tuvieron una distribución similar, de forma que, para los encuestados no hubo un gel que predominara determinantemente una cierta posición de intensidad. No obstante, se puede indicar por la cantidad mayoritaria de veces que los encuestados posicionaron los productos en el mismo nivel que, para el atributo *absorción*, los productos percibidos como de más rápida absorción fueron los geles 01AZ, 03NA y 06AD, los de más baja, 04HV, 02EB y 07AR, mientras que el gel 05CA ocupó la posición de intensidad de absorción intermedia. En ese mismo sentido, para el atributo *esparcibilidad*, los productos que según los encuestados presentaban una más alta esparcibilidad, es decir una mayor facilidad de manipulación del producto sobre la superficie del antebrazo fueron, el 02EB seguido por el gel 06AD y el 05CA, con el 04HV en una posición intermedia y los productos 01AZ, 07AR y 02EB percibidos como de mayor dificultad de aplicación. Sin embargo, para esta propiedad, se encontró que el gel 02EB para la mayoría de las personas ocupó tanto la posición más alta como la más baja, aunque, fueron 16 personas que lo posicionaran en el nivel de más alta intensidad y 13 en el de más baja, por lo que se considera que en realidad la posición predominante es la más alta. Este resultado corresponde con los obtenidos en el ensayo de medición de extensibilidad, donde se encontró que el producto 02EB es aquel que presenta una mayor facilidad de aplicación y capacidad de extensión sobre la superficie de la piel. El hecho anterior se repitió para el atributo *pegajosidad* (fuerza requerida para separar la muestra adherida en los dedos), en el que el producto 02EB fue posicionado más veces en el lugar de mayor intensidad y a su vez en el de menor intensidad.

Figura 4-8: Distribución de la intensidad de atributo percibida por los encuestados para cada producto evaluado.



Por otro lado, para los atributos *consistencia*, definida como un atributo mecánico relacionado con la reacción del producto al esfuerzo percibida por la sensación al presionar, *transparencia*, entendida como el atributo que permite que la luz pase y aparezcan imágenes nítidas y *viscosidad* o resistencia a fluir, se encontró una distribución más heterogénea. En los tres casos se puede ver que predomina el producto 02EB en las posiciones más bajas, indicando que es el que consideran los encuestados que tiene menos, *consistencia*, *transparencia* y *viscosidad*. Para estos atributos, los voluntarios evidenciaron una diferenciación más puntual de la posición en la que se clasifica el producto respecto al atributo. En este sentido para el atributo *consistencia*, en el nivel de mayor intensidad se posicionaron los geles 05CA y 01AZ, mientras que los productos 04HV y 03NA compartieron la posición intermedia, finalmente, en los niveles inferiores se posicionaron los geles 07AR, 01AZ y 02EB. A su vez, para el atributo de *transparencia* se puede ver con más claridad que los encuestados tenían una posición más definida para los niveles de intensidad, donde en general, se considera que el producto más transparente es el 06EB y el más opaco el 02EB, mientras que el 04HV ocupó la segunda posición, el 03NA y el 05CA compartieron la posición intermedia, y los productos 07AR y 01AZ los niveles más bajos. Igualmente, para el atributo *viscosidad* los productos 05CA y 01AZ se encontraron en el nivel de más alta percepción, los productos 03NA y 04HV compartieron la posición intermedia, mientras que los productos 06AD y 02EB los niveles inferiores. En este sentido, teniendo en cuenta las tendencias obtenidas en la evaluación sensorial, fue posible encontrar una relación con los resultados de la caracterización de parámetros reológicos, estableciendo que los encuestados percibieron a los geles 05CA, 03NA y 01AZ como los más viscosos y consistentes, los cuales, en efecto corresponde a aquellos que presentaron mayor módulo de almacenamiento y mayor viscosidad. A su vez, es claro que, respecto al atributo de *transparencia*, el producto con forma cosmética emulgel presentó una mayor opacidad debido a las propiedades heterodispersas que caracterizan esta forma. No obstante, los demás productos presentaron variaciones de opacidad en función de, por un lado, el colorante y por otro el contenido de polímero, considerando que son menos opacas aquellas cuyo contenido es bajo, como podrían ser las formulaciones 06AD y 04HV.

En segundo lugar, se realizó una prueba de Friedman para cada uno de los atributos (**Tabla 4-4**). Este método estadístico no paramétrico se utilizó para detectar si existe una

diferencia entre al menos dos productos, teniendo en cuenta que para su aplicación los datos pueden ser ordinales y no necesitan provenir de una distribución normal. De esta forma, se plantearon las siguientes hipótesis: $H_0: \theta_1 = \theta_2 = \dots = \theta_7$ y $H_1: \text{Algún } \theta_i \neq \theta_j$, donde θ es la posición mediana de alguno de los atributos. La hipótesis nula fue rechazada cuando el *p valor* fue menor o igual al valor de significancia de 0,5. De acuerdo con los resultados, para todos los atributos existe una diferencia en al menos dos productos.

Tabla 4-4: Resultados de la prueba de Friedman para los seis atributos evaluados

Variable	n	Estadístico	p
Consistencia	40	89,357	0,0000000
Transparencia	40	213,729	0,0000000
Pegajosidad	40	38,679	0,0000008
Viscosidad	40	72,375	0,0000000
Absorción	40	37,468	0,0000014
Esparcibilidad	40	22,479	0,0009913

Los resultados anteriores fueron confirmados al calcular el coeficiente de concordancia de Kendall que indica la magnitud de coincidencia entre los mismos, siendo 1 el valor para una coincidencia completa y 0 para una coincidencia nula. Como se observa en la **Tabla 4-5**, la coincidencia de los resultados para el atributo *transparencia* es alto con un valor de 89%, resultado que confirma lo encontrado en el análisis descriptivo realizado anteriormente. Así mismo, se encontraron coincidencias moderadas para los atributos *consistencia* y *viscosidad* con valores de alrededor del 30%. Para los atributos de *esparcibilidad*, *absorción* y *pegajosidad* la coincidencia es baja en conformidad con el análisis exploratorio donde los resultados fueron homogéneos.

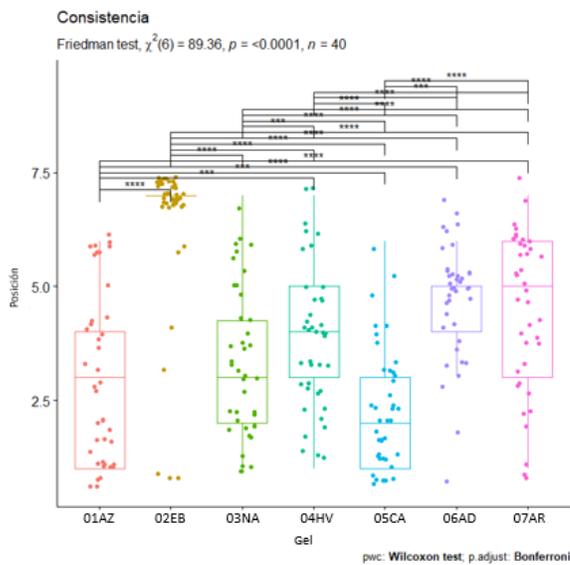
Tabla 4-5: Resultados para el efecto Friedman: Kendall de magnitud de coincidencia.

Variable	n	Coeficiente	Magnitud
Consistencia	40	0,3723	Moderada
Transparencia	40	0,8905	Grande
Pegajosidad	40	0,1612	Baja
Viscosidad	40	0,3016	Moderada
Absorción	40	0,1561	Baja
Esparcibilidad	40	0,0937	Baja

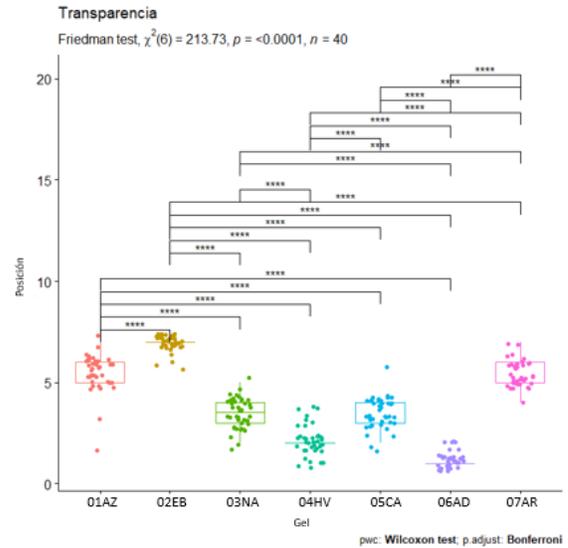
Finalmente, se realizó una comparación para cada par de geles por medio de la prueba del signo con el ajuste Bonferroni, determinando si existen diferencias estadísticamente

significativas entre dos geles para cada atributo, es decir, si las diferencias entre productos establecidas por los encuestados fueron significativas. Como se observa en la **Figura 4-9**, para el atributo *consistencia*, los únicos productos que parecen no tener diferencia son la pareja 01AZ-03NA y 06AD-07AR, las demás comparaciones entre productos tienen una diferencia estadísticamente significativa superior al 0,1%. Así mismo, para el atributo *transparencia* los productos que parecen no tener diferencia son el 03NA con el 05CA y el 01AZ con el 07AR, el resto de las comparaciones entre productos tienen una diferencia estadísticamente significativa al 0,01%. Para el atributo *pegajosidad* el par de productos comparados 01AZ-06AD, el 02EB con 03NA, 04HV y 5CA y la pareja 03NA-05CA no presentaron diferencia estadísticamente significativa, aunque para los otros pares de geles el valor de significancia es superior al 5%. Para los atributos faltantes, el par de productos que no presentaron estas diferencias fue un poco mayor, de manera que para el atributo *viscosidad* los geles que no obtuvieron diferencia son el 01AZ-04HV, el 02EB-06AD, el 03NA-05CA y el 04HV-07AR. Para el atributo *absorción* la pareja de geles 03NA-05CA, 03NA-06AD, 04HV-06AD, 04HV-07AR y 5CA-06AD no presentaron significancia estadística, las demás mostraron una significancia superior al 5%. Finalmente, para el atributo *esparcibilidad* los productos 01AZ-05CA y 01AZ-06AD, el 02EB con 03NA, 04HV, 05CA y 07AR, y el 04HV con el 07AR no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas. Los resultados anteriores demuestran que para la mayoría de los productos en todos los atributos evaluados existieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, pero existieron algunos atributos en los que los encuestados no notaron diferencias entre productos.

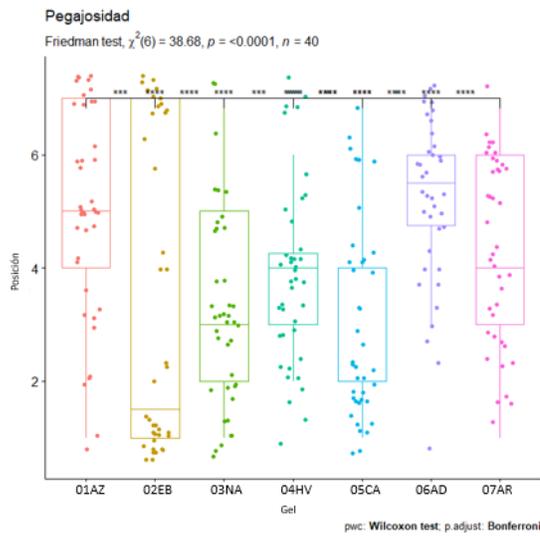
Figura 4-9: Diagramas box-plot que muestran la existencia de significancia entre dos productos evaluados para los atributos a) Consistencia b) Transparencia c) Pegajosidad d) Viscosidad e) Absorción f) Viscosidad.



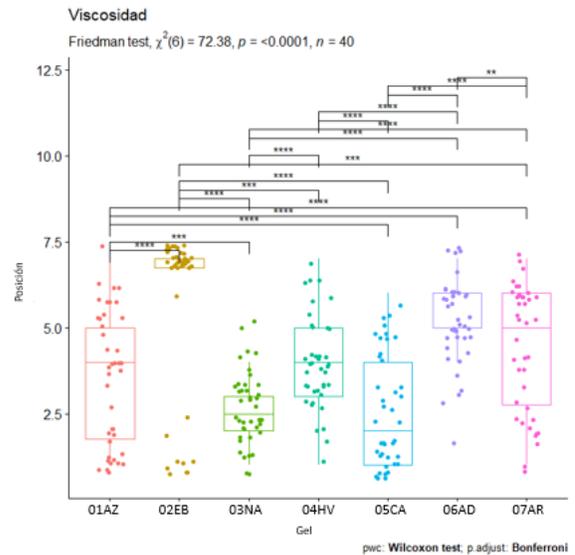
a)



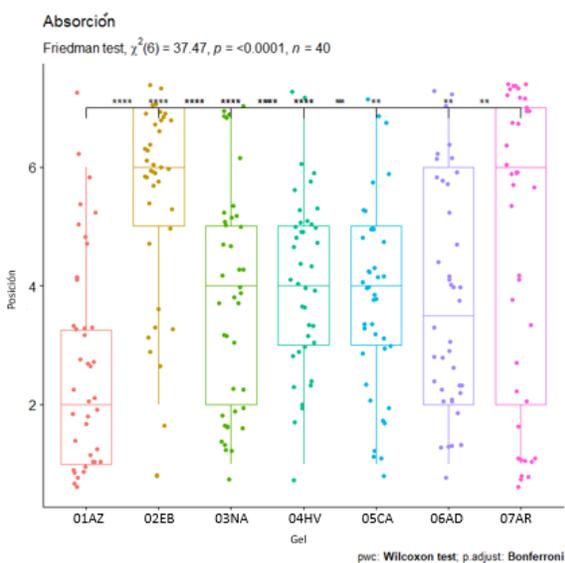
b)



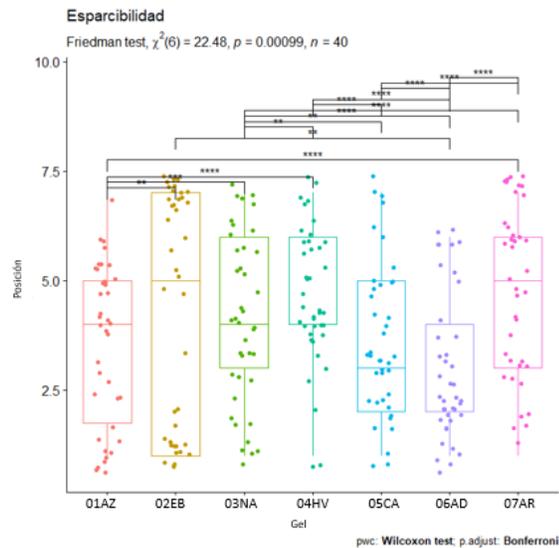
c)



d)



e)



f)

4.1.4 Fórmula cualicuantitativa – Cuantificación de la cantidad de cafeína

Los siete productos del mercado exhiben en su etiquetado los componentes que se muestra en la **Tabla 4-6**, se aclara que, solo se presentan los ingredientes en común en más de dos productos. Todos los geles seleccionados contienen agua, carbómero, trietanolamina, cafeína y el sistema preservante, a su vez, la mayoría (más de cuatro geles) contienen alcohol, propilenglicol, glicerina, mentol, extracto de fucus y centella asiática. Así mismo, fue posible notar en el empaque que no existe una homogeneidad en la posición de la cafeína en el listado de ingredientes, lo que indica que su contenido en los productos es variable. Como se observa, de acuerdo con las funciones declaradas, el carbómero es prácticamente el único agente gelificante y es común en todos los productos que, en general, contienen solventes, también considerados promotores de la permeación como el alcohol, la glicerina, el propilenglicol y el alcohol bencílico, y extractos de plantas y sustancias a las que se les atribuye función de cuidado de la piel.

Tabla 4-6: Ingredientes presentes en más de dos productos comerciales y su función declarada en la base de datos de referencia COSING.

Ingrediente	N° de productos que lo contienen	Función COSING
Agua	7	Acondicionador de piel. Solvente.
Cafeína	7	Acondicionador de piel.
Carbómero	7	Estabilizador de emulsión. Formador de gel. Controlador de viscosidad.
Trietanolamina	7	Modificador de pH. Limpiador. Tensoactivo. Emulsificante.
Alcohol	5	Antiespumante. Antimicrobiano. Astringente. Solvente. Controlador de viscosidad.
Propilenglicol	4	Humectante. Acondicionador de piel. Solvente. Controlador de viscosidad.
Glicerina	4	Desnaturante. Humectante. Acondicionador de piel. Protector de piel. Solvente. Controlador de viscosidad.
Propilparabeno	2	Preservante.
Metilparabeno	2	Preservante.
Metilcloroisotiazolinona	3	Preservante.
Metilisotiazolinona	3	Preservante.
Fenoxietanol	4	Preservante.
Etilhexilglicerina	2	Desodorante. Acondicionador de piel.
Extracto de Fucus vesiculosus	5	Acondicionador de piel. Emoliente. Suavizante. Calmante.
Extracto de Centella asiática	5	Limpiador. Acondicionador de piel. Suavizante. Calmante. Tónico.
PEG-40 aceite de ricino hidrogenado	3	Tensoactivo- limpiador. Tensoactivo- Emulsificante.
L-carnitina	3	Antiestático. Limpiador. Acondicionador de piel. Tensoactivo- limpiador.

		Tensoactivo- Aumento de espuma. Controlador de viscosidad.
Mentol	4	Desnaturante. Fragrancia. Refrescante. Calmante.
Extracto de Hedera hélix	3	<i>Anticaking</i> . Antimicrobiano. Astringente. Acondicionador de piel. Calmante. Tónico.
Alcohol bencílico	3	Preservante. Solvente. Controlador de viscosidad.
Extract de Equisetum arvense	2	Astringente. Acondicionador de piel. Emoliente. Calmante. Tónico.
EDTA disódico	2	Quelante. Controlador de viscosidad.

De acuerdo con el listado de ingredientes es posible interpretar que los productos están compuestos en su mayoría por agua y que la estructura de gel es debida a la interacción del carbómero con la misma como se mencionó anteriormente. Así mismo, solo un producto declara el contenido de cafeína en su empaque indicando que es 3%. Para los demás productos, no se declara el contenido de ningún ingrediente, y, ya que la cafeína se ubica en diferentes posiciones dentro del listado no es posible conocer la magnitud en que se encuentra respecto a otras sustancias. Sin embargo, para cinco de los siete productos se puede deducir que, el contenido de cafeína es del mismo orden que el contenido de los extractos al encontrarse en una posición similar a éstos, la cual puede ser baja, considerando que en general, este tipo de ingredientes son adicionados en proporciones inferiores al 1 %w/w [86]. Cinco de los siete geles poseen algún otro componente diferente respecto a los que se mencionaron en la **Tabla 4-6**, que en su mayoría corresponden a extractos de plantas y aminoácidos. El producto 02EB por poseer una forma cosmética tipo emulgel incluye una amplia gama de ingredientes, en general, tensoactivos, antioxidantes y sustancias oleosas. A su vez, el gel 04HV tiene una variedad de otros componentes como la celulosa microcristalina, mientras que el gel 06AD incluye además ciclometicona y acrilatos.

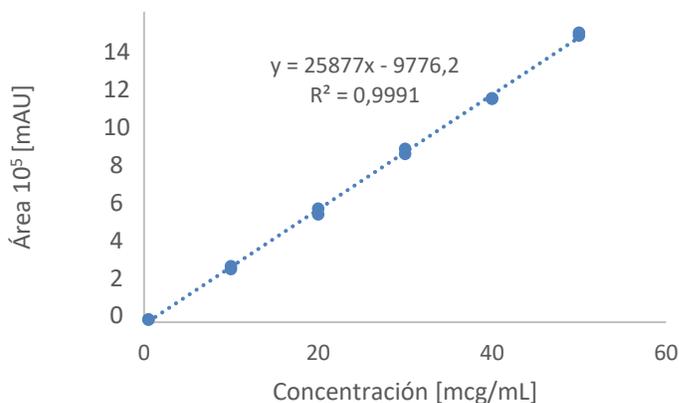
De los ingredientes que más comparten los productos, en particular, el alcohol está presente en los geles 01AZ, 02EB, 04HV, 05CA y 06AD, el propilenglicol en los productos 02EB, 03NA, 05CA y 07AR, la glicerina en 02EB, 04HV, 05CA, 06AD, el alcohol bencílico en 02EB, 04HV y 06AD y el mentol en 01AZ, 02EB, 04HV y 06AD. En efecto, en su mayoría son solventes capaces de afectar la barrera de la piel de forma moderada, de manera que una de sus funciones dentro de la formulación es generar condiciones para promover la permeación de sustancias a través de ésta. La **Tabla 4-7** muestra algunas de sus propiedades fisicoquímicas, donde se observa que en general, son sustancias con cierto grado de polaridad, miscibles en agua, con bajo coeficiente de reparto y que pueden ser empleadas para mejorar la solubilidad y la estabilidad de los demás ingredientes de la formulación dada su propiedad cosolvente. Sin embargo, para la mayoría de los solventes debido a su grado de polaridad, no es fácil que atraviesen la barrera cutánea puesto que no poseen una buena afinidad por la capa lipídica del estrato córneo, no obstante, presentan diferentes mecanismos para interactuar con la piel incrementando su permeación. Por ejemplo, el alcohol, es capaz de retirar el manto ácido que cubre la piel logrando que aumente su permeabilidad [87] y gracias a la afinidad de algunas sustancias hacia éste, es capaz de permitir la incorporación de aquellas no solubles en agua, como el mentol, facilitando la introducción de ingredientes, en formulaciones con alto contenido de agua. El alcohol bencílico es un compuesto con un coeficiente de reparto ideal para permear la piel presentando cierta afinidad hacia los lípidos del estrato córneo [24], esta capacidad, puede influir en la permeación de las sustancias que lo acompañan. La glicerina y el propilenglicol son solventes a los que se les atribuye acción humectante [88], por lo que tienen la capacidad de retener la humedad de la piel creando una capa que evita la pérdida de agua transepidérmica. Esta 'protección' puede aumentar la permeabilidad al crear condiciones adecuadas para que los compuestos hidrofílicos puedan atravesar la barrera cutánea, puesto que a mayor hidratación las células del estrato córneo se hinchan favoreciendo el paso de las sustancias polares [89].

Tabla 4-7: Características fisicoquímicas de los solventes presentes en los productos comerciales [90]–[94]

Solvente	log P	Polaridad	Constante dieléctrica (25°C)
Alcohol	-0,31	Ligeramente polar	27,5
Glicerina	-1,76	Ligeramente polar	42,5
Propilenglicol	-0,92	Ligeramente polar	32
Alcohol bencílico	1,1	Débilmente polar	11,9
Agua	-1,38	Polar	81

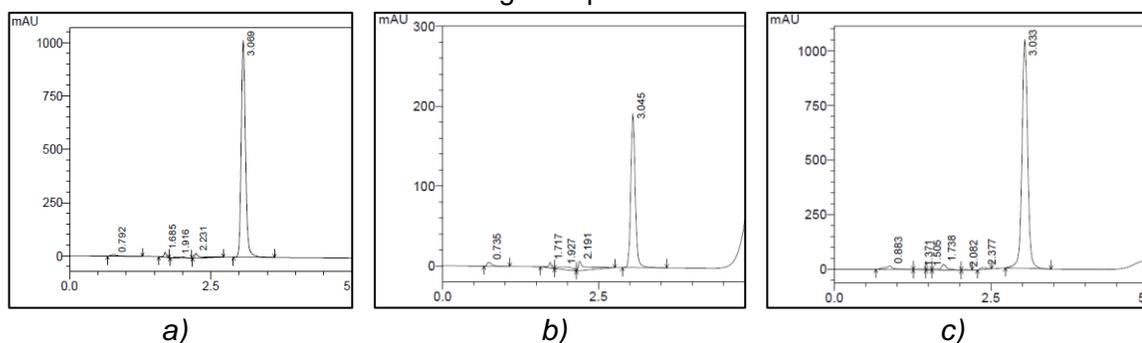
4.1.4.1 Desarrollo de la metodología de extracción de la cafeína

Para desarrollar el método de extracción de cafeína de los productos, en primera instancia se aplicaron tres metodologías, dos basadas en extracción con metanol y agua en diferentes proporciones y durante diferentes tiempos de contacto en ultrasonido y centrifugación (métodos A y B), y una que involucra disolución en etanol, precipitación de polímero con hidróxido de amonio y extracción en fase sólida [71]–[73], aplicadas a un gel de prueba fabricado con un contenido conocido de cafeína del 0,5%w/w. La cuantificación analítica fue realizada con una curva de calibración producto del ensayo preliminar para cafeína disuelta en agua: etanol 80:20 (**Figura 4-10**) en el rango de 0,5 a 50µg/mL.

Figura 4-10: Curva de calibración preliminar de cafeína en agua: etanol (80:20).

Aplicando las tres metodologías, sin la extracción en fase sólida en la metodología C, se obtuvieron los resultados mostrados en la **Figura 4-11**, en los que se detectó el pico característico de cafeína a los tres minutos. Con la ecuación de la curva de calibración preliminar fue posible obtener un estimado del porcentaje de cafeína extraído y cuantificado por HPLC. Se encontró que para la metodología A, la cantidad de cafeína cuantificada es inferior a la mitad de la cafeína puesta en el gel, mientras que para las metodologías B y C, el porcentaje es cercano al 0,5%w/w que fue incluido en la formulación.

Figura 4-11: Cromatogramas correspondientes a las extracciones a) A, b) B, y c) C para el gel de prueba



* Resultados en concentración de cafeína [%w/w] a) 0,21%, b) 0,38% y c) 0,51%

Los resultados para el gel de prueba permitieron decidir que la metodología A es la menos eficiente por lo que fue descartada. Por otro lado, teniendo en cuenta que cada gel a evaluar presentaba particularidades en cuanto a su fórmula y preparación, se realizó un primer acercamiento de las metodologías B y C (ensayo preliminar) para todos los geles y de esta forma se determinó la metodología que ofrecía un mejor resultado.

En la **Figura 4-12** y en la **Figura 4-13** se muestran los resultados de las extracciones B y C para los siete productos cosméticos lipolíticos tipo gel y emulgel adquiridos del mercado local 01AZ, 02EB, 03NA, 04HV, 05CA, 06AD, 07AR. Los cromatogramas permiten observar que para algunos geles el contenido de cafeína es muy bajo y que las metodologías necesitaban ser refinadas para obtener mejores resultados. Es posible observar que en la extracción de la metodología B, para dos geles no se detectó el pico de cafeína, mientras que para la metodología C el pico sí fue detectado, aunque fue muy pequeño; para el gel 07AR el pico detectado no es puro y puede no corresponder realmente al compuesto evaluado.

Figura 4-12: Cromatogramas de los ensayos preliminares del contenido de cafeína obtenido por la metodología B para los productos del mercado a) 01AZ, b) 02EB, c) 03NA, d) 04HV, e) 05CA, f) 06AD, y g) 07AR.

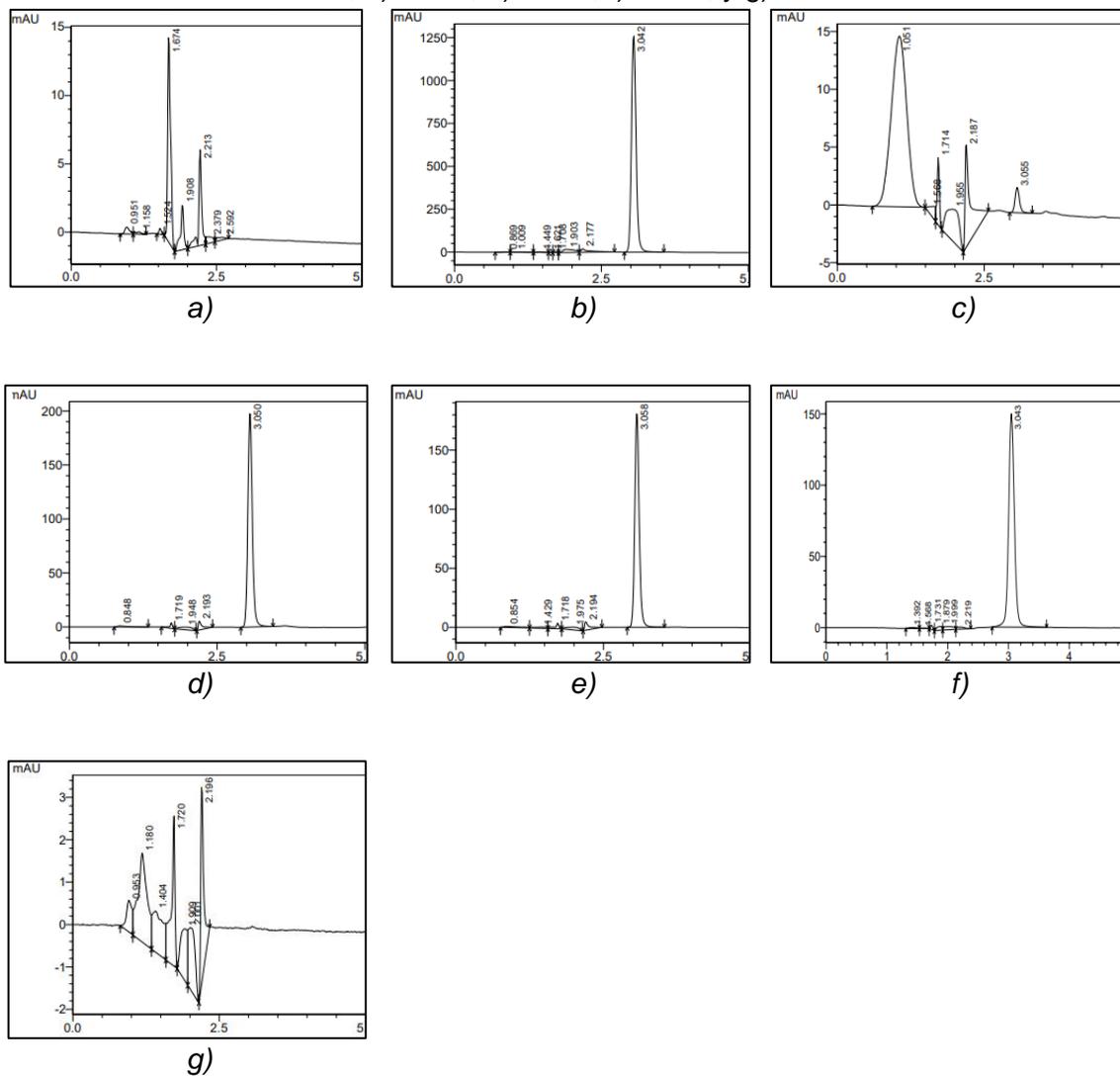
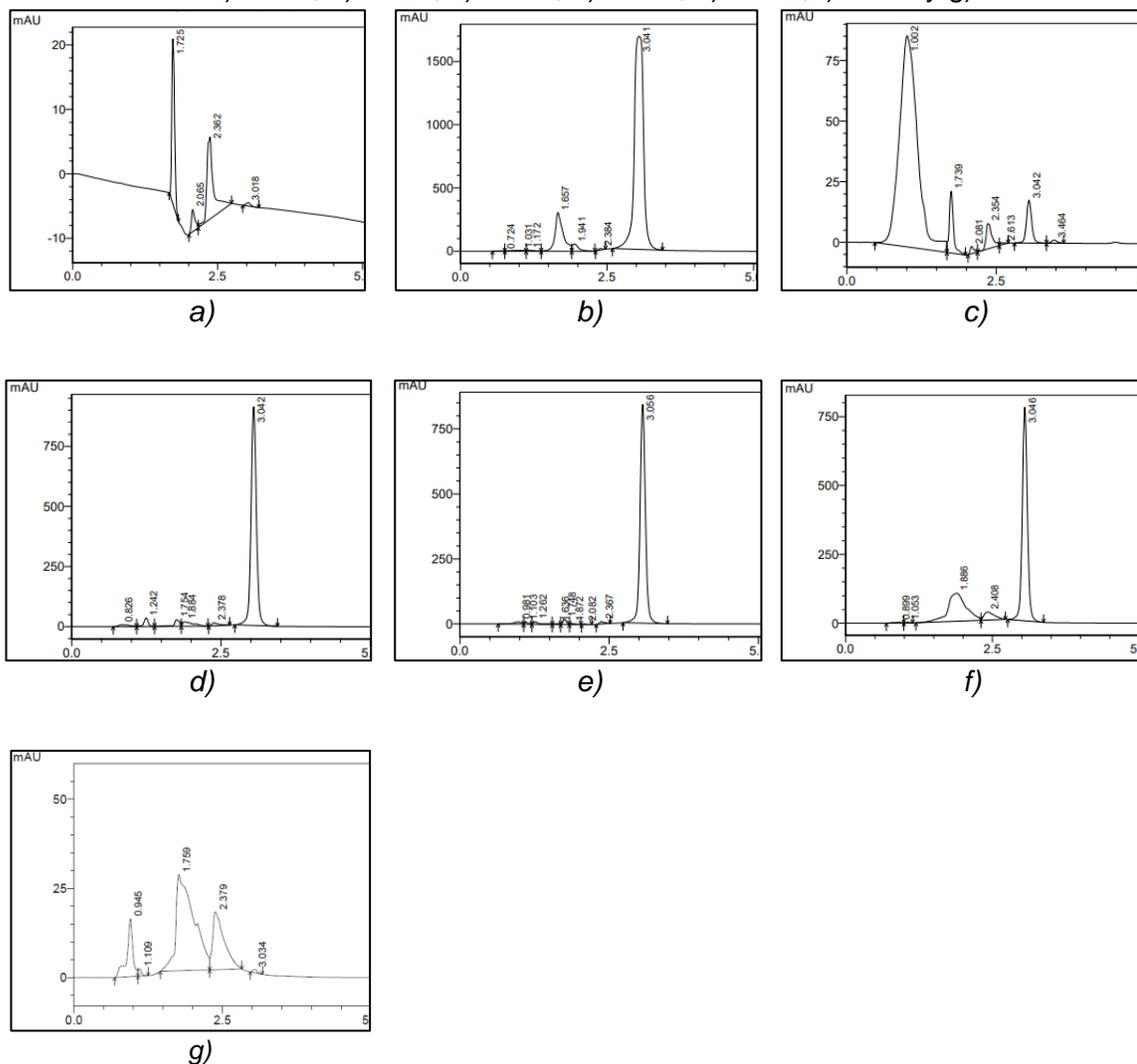


Figura 4-13: Cromatogramas de los ensayos preliminares del contenido de cafeína obtenido por la metodología C sin extracción en fase sólida (SPE) para los productos del mercado a) 01AZ, b) 02EB, c) 03NA, d) 04HV, e) 05CA, f) 06AD y g) 07AR.



En la **Tabla 4-8** se encuentra la compilación de resultados del porcentaje peso a peso (%w/w) de cafeína obtenido de las extracciones de prueba encontrados bajo ambas metodologías. Se puede ver que la extracción B ofreció un mejor resultado para el 02EB que la extracción C, mientras que para los otros geles esta última funciona de manera más adecuada, tal y como se observó con el gel de prueba donde los resultados fueron más cercanos al valor real. Cabe resaltar que, para tres de los siete geles evaluados el porcentaje de cafeína encontrado fue bajo, no superando el 0,009 %w/w por la metodología C y prácticamente nulo para la metodología B.

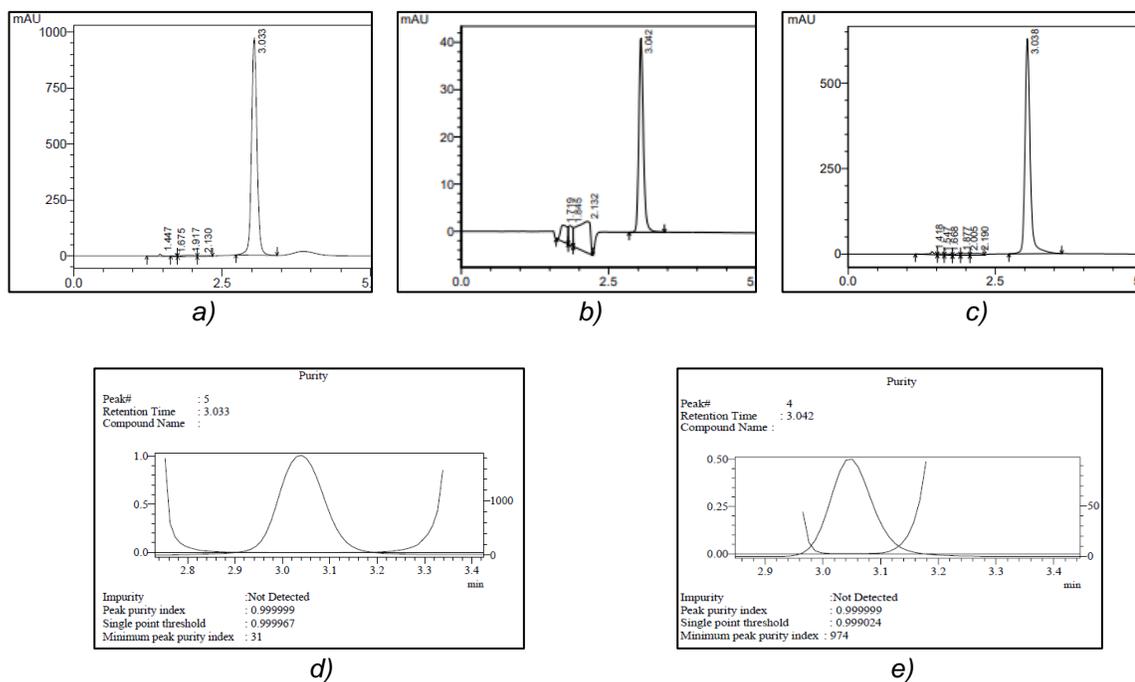
Tabla 4-8: Concentración en peso a peso de cafeína encontrada para los geles comerciales para el ensayo preliminar con las metodologías B y C.

	Extracción B	Extracción C
Código	Cafeína extraída [%w/w]	Cafeína extraída [%w/w]
01AZ	0,0000	0,0010
02BE	2,6904	1,5015
03NA	0,0082	0,0090
04HV	0,4041	0,4644
05CA	0,3680	0,4301
06AD	0,3207	0,3884
07AR	0,0000	0,0012

Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos, los métodos de extracción B y C fueron ligeramente modificados. El método B se modificó prolongando el tiempo en el ultrasonido a 30 min. Para el método C se incluyó la disolución en ultrasonido por 10 minutos y se tuvo en cuenta que la adición de amonio provocaba un aumento de pH, que podía perjudicar la columna cromatográfica por lo que previo a la filtración se implementó un ajuste de pH. Así mismo, debido a la cantidad de ingredientes que se presentan en cada formulación, el incremento de la presión sufrido por el sistema cromatográfico y, teniendo en cuenta el aspecto de los cromatogramas obtenidos en los primeros ensayos donde se detectaron otras señales aledañas al pico del analito de interés, se decidió realizar pruebas con la extracción en fase sólida (SPE, de su sigla en inglés) recomendada en el procedimiento de Mladenov & Sunarić [71]. El procedimiento se aplicó con el cartucho que ofreció el mejor resultado en términos de extracción de cafeína de acuerdo con la publicación, cartucho HR-X (copolímero de poliestirendivinilbenceno hidrofóbico) y siguiendo los pasos propios de la extracción en fase sólida que involucró cuatro fases: fase 1, acondicionamiento y activación del sorbente con metanol; fase 2, equilibrio del sistema con agua purificada; fase 3, carga del extracto; y fase 4, elución del analito. Este procedimiento se implementó para el gel de prueba, al cual después de aplicar la metodología de extracción C (metodología que ofreció un resultado más cercano al real), se encontró que la cafeína no se retenía totalmente en el cartucho y que menos de la mitad era cuantificada en la fase de elución como se muestra en la **Figura 4-14**. Por otro lado, los cromatogramas

antes y después de la extracción fueron similares presentando señales aledañas al pico de cafeína y la misma relación de pureza.

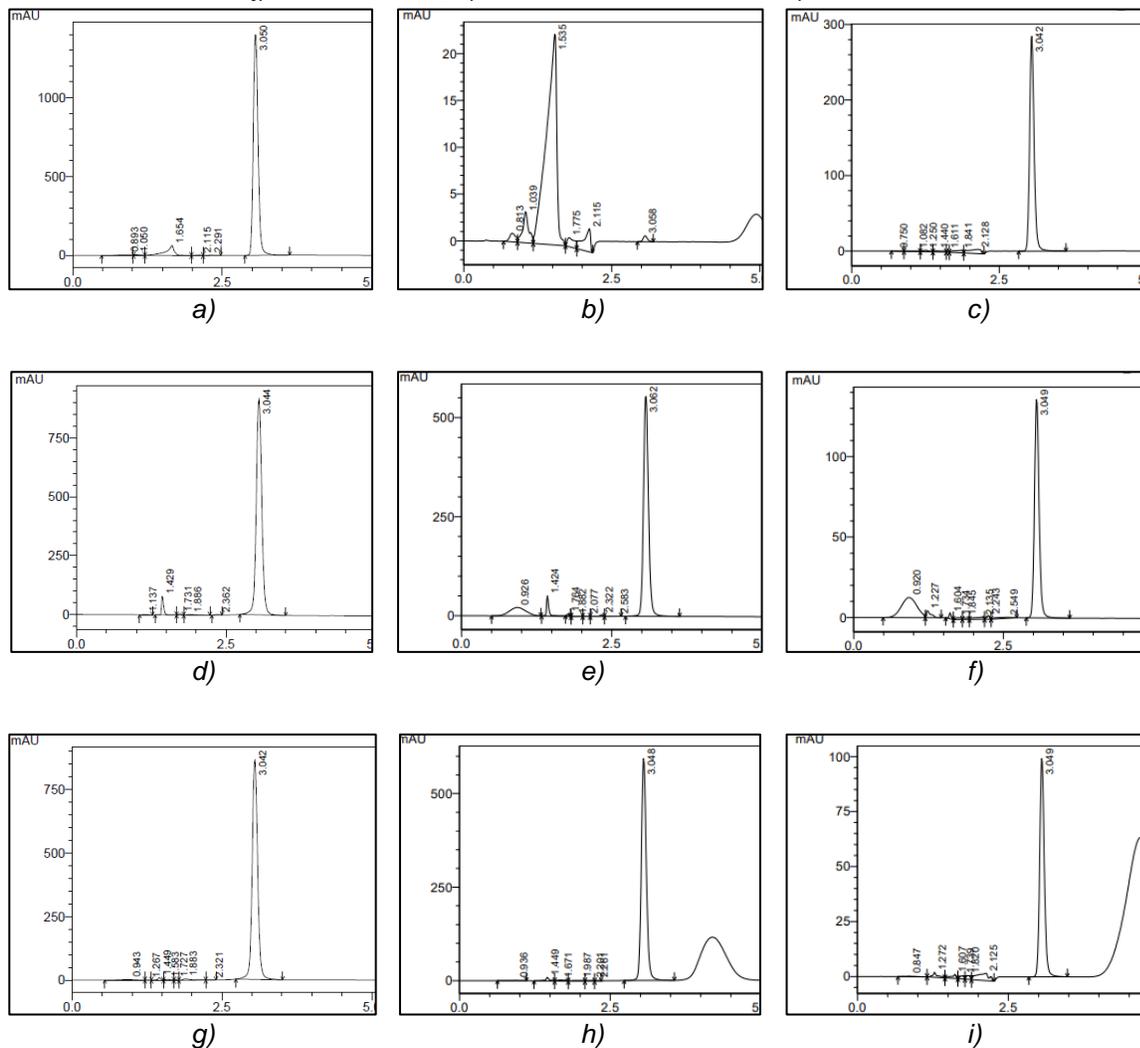
Figura 4-14: Cromatogramas para el gel de prueba: a) extracción C, b) extracción en fase sólida (SPE) fase 3 carga C) extracción SPE fase 4 elución d) pureza cromatográfica de la señal de cafeína extracción C y e) pureza cromatográfica para la señal de cafeína fase 4 de la extracción SPE.

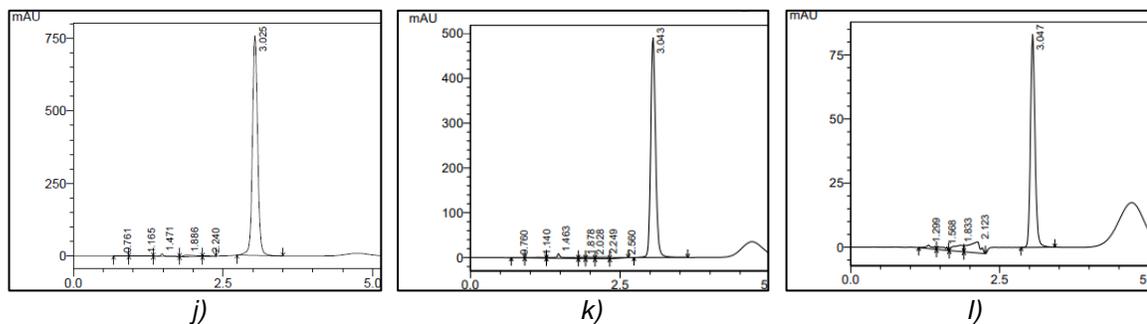


* Concentración de cafeína encontrada [%w/w]: a) 0,51 %; b) 0,316 %; c) 0,20 %.

Dado el comportamiento del gel de prueba al realizar la extracción SPE, se aplicó la metodología a los geles comerciales que presentaron un contenido de cafeína superior al 0,01 %w/w, de esta manera, después de realizar los procedimientos B para el 02EB y C para los geles 04HV, 05CA y 06AD con las modificaciones mencionadas, se tomó 1 mL del extracto y se cargó en el cartucho acondicionado a flujo de 1 mL/min, fase 3. Finalmente, se eluyó la cafeína retenida con metanol (4 mL para la extracción C y 5 mL para la extracción B), obteniéndose los resultados de la **Figura 4-15** que contemplan la cuantificación del analito previo a la extracción SPE y después de la extracción SPE en la fase 3 de carga y la fase 4 de elución.

Figura 4-15: Cromatogramas del ensayo de extracción para geles comerciales que demostraron un contenido de cafeína superior al 0,009%w/w. Producto 02EB a) extracción B, b) extracción en fase sólida (SPE) fase 3, c) extracción SPE fase 4. Producto 04HV d) extracción C, e) extracción SPE fase 3, f) extracción SPE fase 4. Producto 05CA g) extracción C, h) extracción SPE fase 3, i) extracción SPE fase 4. Producto 06AD j) extracción C, k) extracción SPE fase 3, l) extracción SPE fase 4.





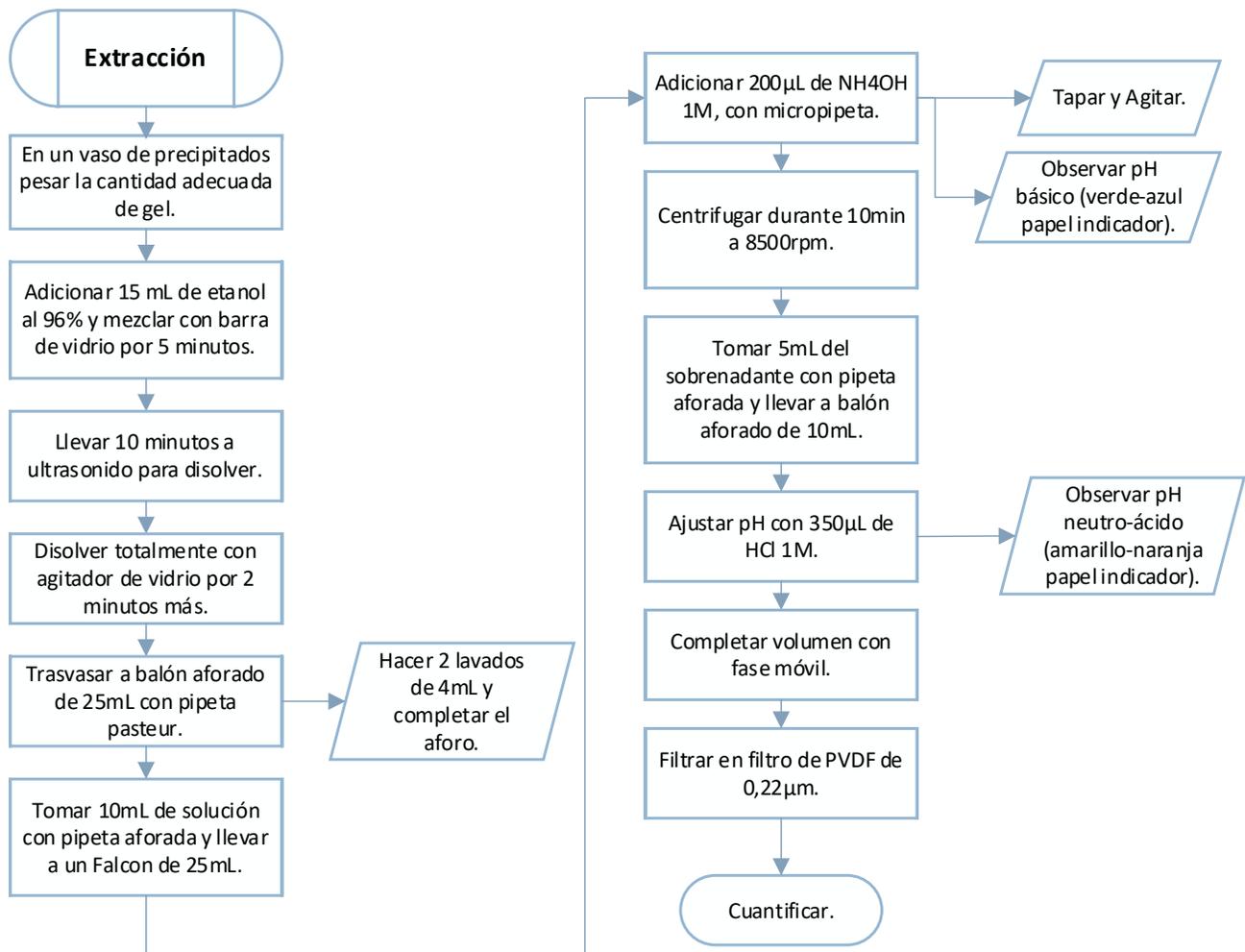
*Concentración de cafeína encontrada [%w/w] a) 3,02 %; b) 0,005 %; c) 2,94 %; d) 0,48 %; e) 0,25 %; f) 0,23 %; g) 0,45%; h) 0,27%; i) 0,17 %; j) 0,38 %; k) 0,21 %; l) 0,14 %.

La modificación de los métodos permitió obtener un contenido de cafeína superior para cada gel evaluado. Sin embargo, la implementación de la SPE no demostró ser una ventaja. El cromatograma después de esta extracción demostró ser visualmente similar al cromatograma previo a la SPE, es decir que además de la cafeína, el cartucho retenía también las sustancias que estaban en el gel y eluían con el metanol por lo que, al igual que con el gel de prueba no se notaron cambios significativos entre cromatogramas y al parecer incluso se evidenciaron más impurezas. Adicionalmente, la extracción no fue eficiente ya que, como sucedió con el gel de prueba, salvo para el gel 02EB se encontró que la cafeína retenida estuvo alrededor de la mitad de la cafeína total extraída y que la otra mitad de la cafeína presente en el extracto cargado no se retuvo en el cartucho y fue encontrada en el líquido de la fase 3. De esta manera, no se consideró que este paso adicional fuese necesario ya que no aportó una diferencia en cuanto a la mejora de la extracción y para aliviar la presión del sistema cromatográfico se tomó la decisión de realizar diluciones que disminuyeran el contenido de los compuestos.

Por otro lado, dado que la precipitación del polímero permitió obtener mejores resultados para la mayoría de los geles, se decidió refinar este procedimiento teniendo en cuenta las particularidades de cada producto. De esta manera, se realizaron ensayos para adecuar el contenido de los geles encontrado de acuerdo con la curva de calibración, definiendo la cantidad de gel a pesar y las diluciones a realizar. Se incluyó un paso extra de disolución manual, además de la disolución en ultrasonido que se había incluido previamente, para asegurar que el gel quedara totalmente disuelto en etanol. A su vez, se estandarizó la cantidad de hidróxido de amonio adicionada para la precipitación, así como la cantidad de ácido clorhídrico para ajustar el pH. Se definió 1g como cantidad máxima a pesar teniendo en cuenta el bajo contenido de cafeína que pudieran presentar algunos productos, así como el tiempo de disolución en ultrasonido y que a mayor cantidad de gel se podía

dificultar la disolución. Bajo estas consideraciones, se estandarizó el procedimiento de la **Figura 4-16** para todos los geles pesando diferentes cantidades de gel según el contenido encontrado en los ensayos preliminares. Respecto al gel que había obtenido mejores resultados por el procedimiento B, el gel 02EB, se encontró que, para una cantidad pesada de magnitud inferior (0,07 g) de producto, aplicando el procedimiento final el resultado es similar y cercano al 3 %w/w declarado en su etiqueta. Esta metodología y su correspondiente valoración analítica fueron sometidas a validación para poder ser aplicadas como metodología de extracción y cuantificación de cafeína en los productos comerciales considerados en el estudio.

Figura 4-16: Método desarrollado para la extracción de cafeína a partir de geles cosméticos.



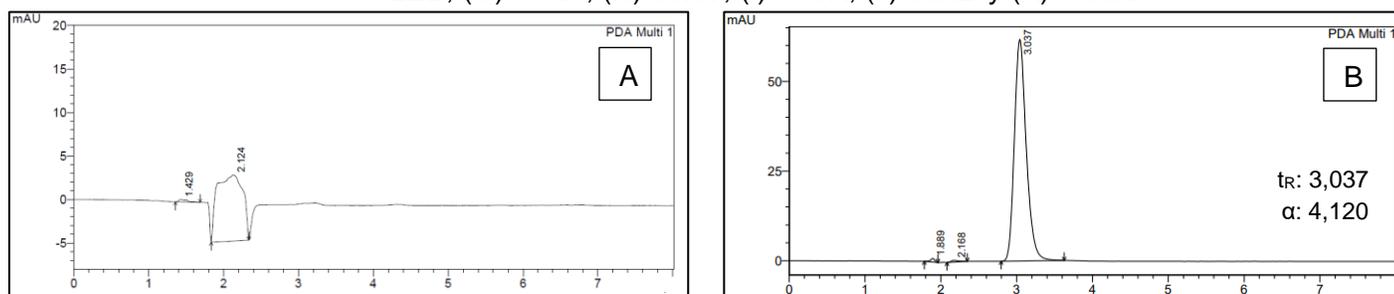
4.1.4.2 Validación de la metodología analítica para la determinación de cafeína en matrices tipo gel y emulgel

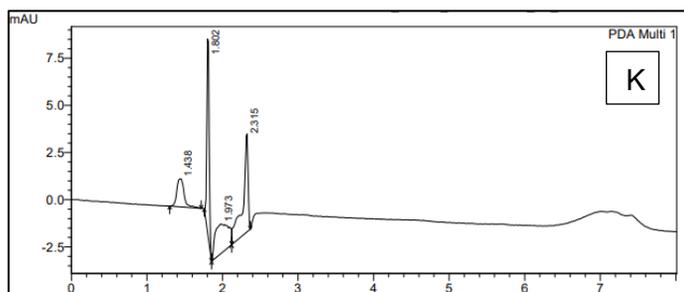
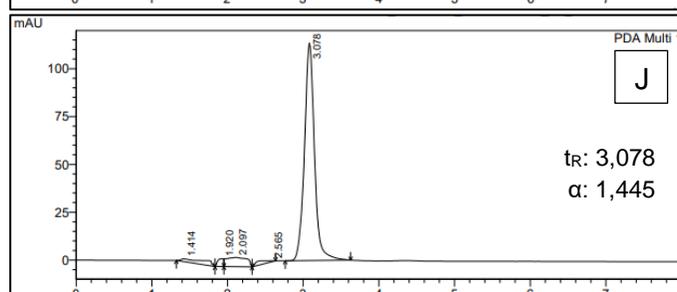
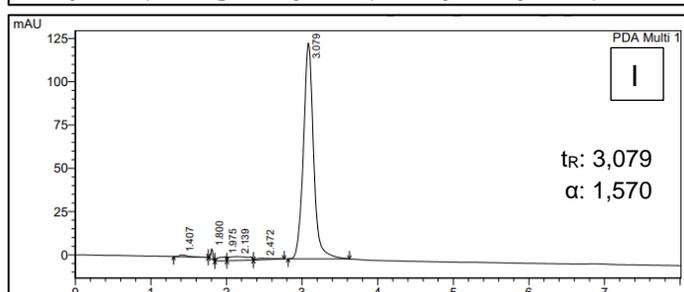
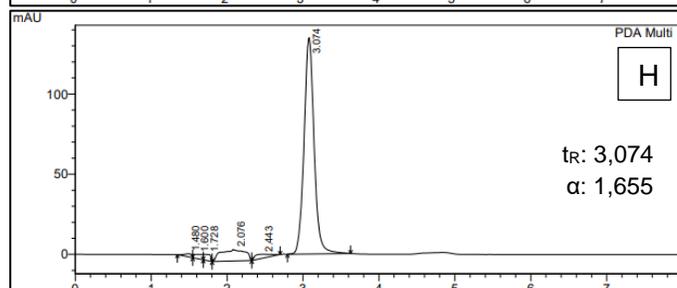
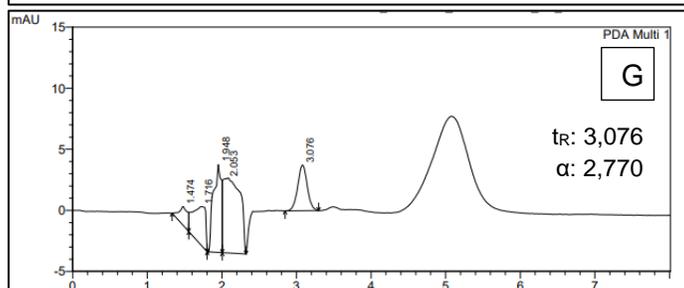
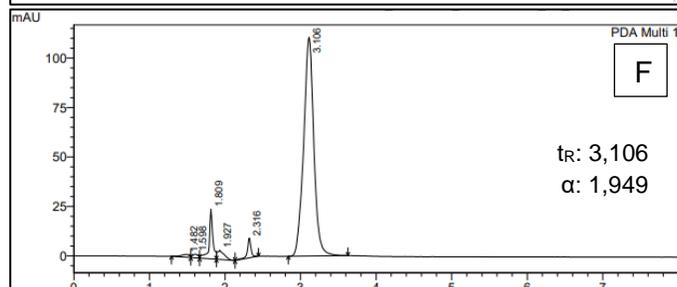
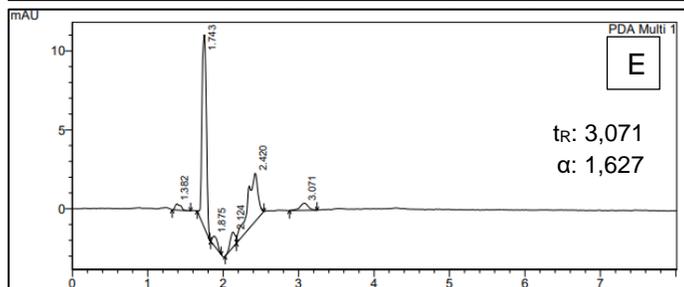
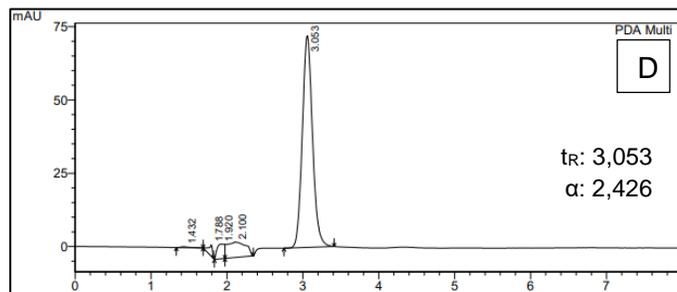
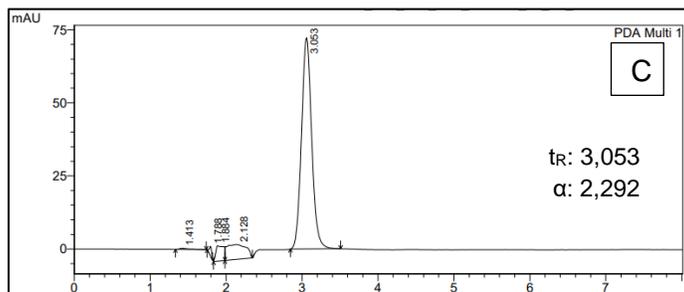
Para obtener los parámetros de validación se partió de tres geles (Geles madre, GM) que presentaban en común tanto el proceso de fabricación como los ingredientes. De acuerdo con el método de extracción desarrollado previamente fue posible conseguir la máxima extracción de cafeína modificando las cantidades del gel para obtener los puntos dentro del rango de calibración propuesto.

- **Selectividad**

Con el objeto de conocer si existían sustancias que pudieran interferir con la medición de cafeína, en la **Figura 4-17** se presentan los cromatogramas obtenidos para la solución de extracción de cada producto comercial evaluado, el gel blanco, un GM, el gel sometido a condiciones de estrés (ciclos de calentamiento $40 \pm 1^\circ\text{C}$ y enfriamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$) y el reactivo cafeína solo disuelto en etanol. Éste último muestra el pico de cafeína en un tiempo de retención de alrededor de los tres minutos coincidiendo con las características que fueron establecidas para el método analítico de cuantificación de cafeína por HPLC en investigaciones previas dentro del grupo de investigación.

Figura 4-17: Cromatogramas correspondientes a: (A) gel placebo, (B) solución de cafeína en etanol, (C) gel madre, (D) gel bajo condiciones de estrés, (E) 01AZ, (F) 02EB, (G) 03NA, (H) 04HV, (I) 05CA, (J) 06AD y (K) 07AR.

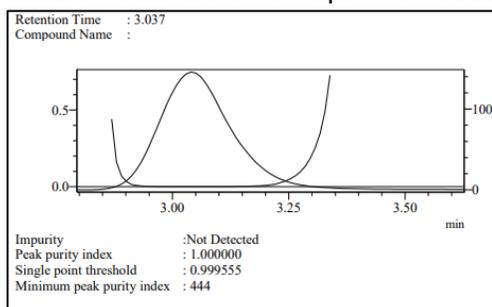




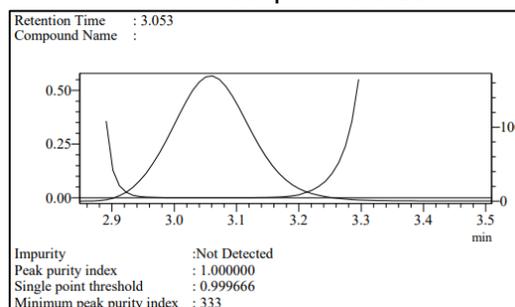
Como se puede observar, para todas las muestras se evidencia la señal de cafeína a los tres minutos al igual que para la muestra que solo contenía al analito disuelto. En este tiempo de retención, de manera visual se observa un único pico y la ausencia de picos adyacentes; esta falta de señales aledañas observables se puede interpretar como la no existencia de sustancias que puedan interferir con la cuantificación de la cafeína. En este sentido es posible observar tanto para el gel placebo y el GM fabricados en el laboratorio como para los geles comerciales que, pese a que existen otros ingredientes en la formulación su presencia a la longitud de onda establecida es apenas detectada. La premisa anterior puede confirmarse teniendo en cuenta que el factor de separación (α) entre la impureza más cercana siempre es mayor a 1. Es importante aclarar que la señal de cafeína fue menor, mayor o incluso inexistente para los productos de acuerdo con su concentración y que los cromatogramas mostrados pertenecen a muestras manejadas a condiciones de concentración similares para tener una mejor aproximación comparativa.

Para complementar los resultados anteriores se obtuvo para cada muestra evaluada la pureza de pico como se muestra en la **Figura 4-18**. En esta es posible observar que para cada gráfica el índice de pureza fue $\geq 0,9999$ un indicativo de que es posible obtener picos puros mediante la extracción de cafeína realizada de los productos. Además, se evidencia que no existen interferencias en la cuantificación del analito dado que la curva de similitud se encuentra por encima del umbral demostrando pureza espectral a lo largo del pico. Con estos resultados es posible concluir que la señal es pura y corresponde al analito evaluado sin la interferencia por co-elución de otros componentes de los productos.

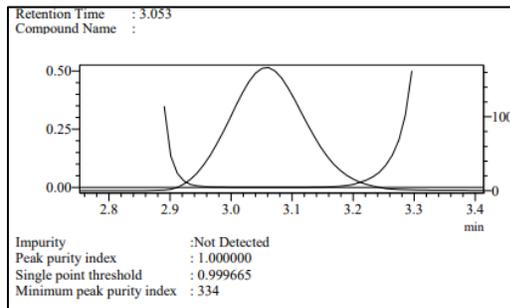
Figura 4-18: Gráficas de pureza de señal correspondientes a: a) solución de cafeína en etanol, b) solución extraída del gel madre, c) solución extraída del gel bajo condiciones de estrés, d) solución extraída del producto 01AZ, e) solución extraída del producto 02EB, f) solución extraída del producto 03NA, g) solución extraída del producto 04HV, h) solución extraída del producto 05CA, i) solución extraída del producto 06AD.



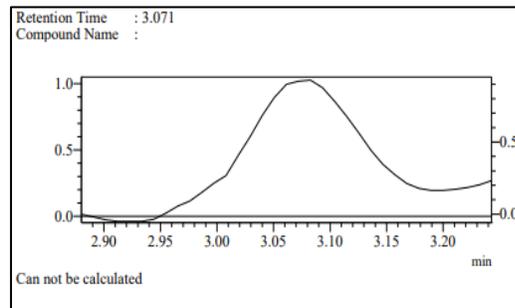
a)



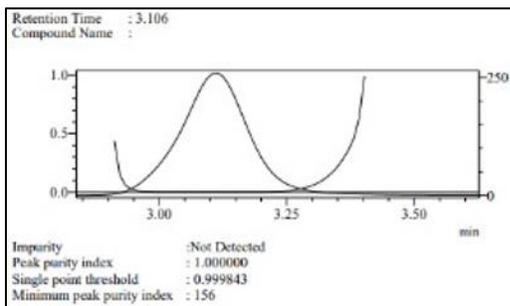
b)



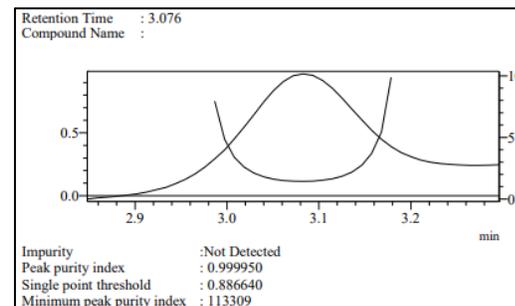
c)



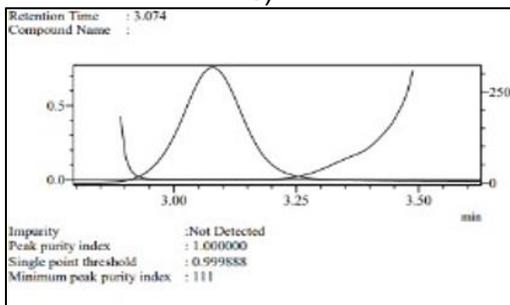
d)



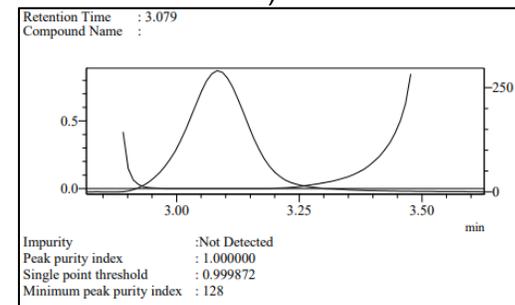
e)



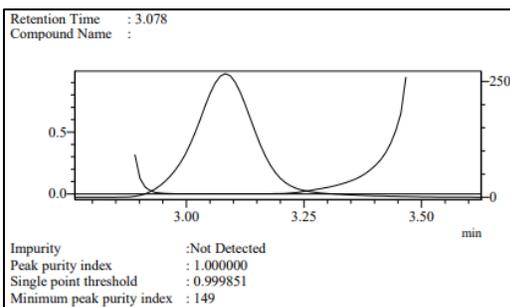
f)



g)



h)

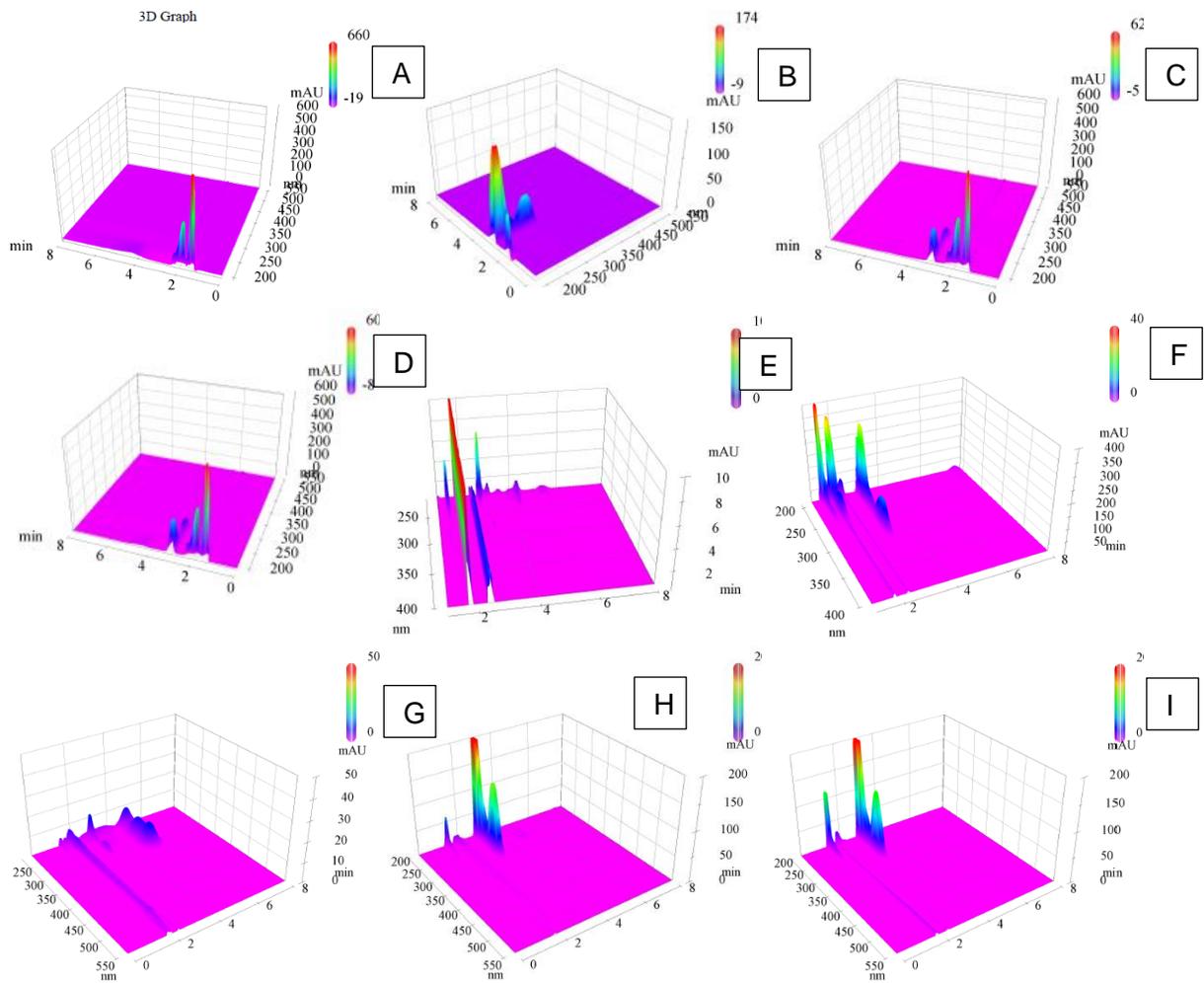


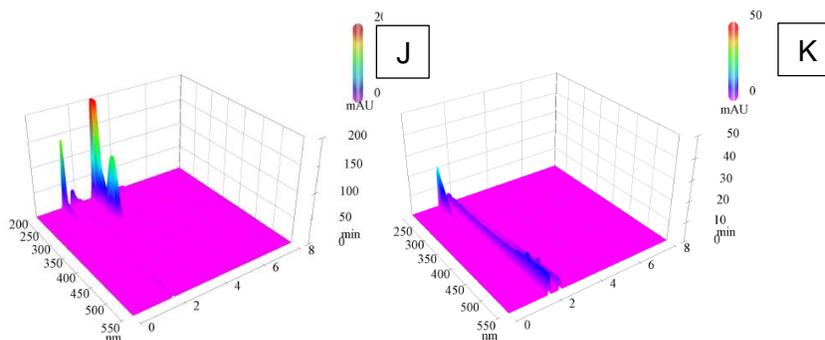
i)

Finalmente, se presentan los topogramas de cada muestra en la **Figura 4-19**, en los cuales se observa la similitud del relieve tanto para el analito disuelto en etanol como para el gel fabricado con cafeína (antes y después de someterlo a condiciones de degradación) y los

geles comerciales 02EB, 04HV, 05CA, y 06AD. Esto permite deducir que las muestras extraídas se comportan en todo el rango de longitudes de onda evaluado de la misma forma que cuando el analito se encuentra puro, lo que significa que, no hay sustancias que puedan eluir en el mismo tiempo de retención de la cafeína incidiendo en su cuantificación. Se observa también que para los geles 01AZ y 03NA por su bajo contenido de cafeína la apreciación del pico es casi nula, mientras que para el gel comercial 07AR, así como para el gel placebo el analito no es detectable a lo largo del espectro confirmando la ausencia de cafeína.

Figura 4-19: Topogramas correspondientes a: a) gel placebo, b) solución de cafeína en etanol y solución extraída de c) gel madre, d) gel bajo condiciones de estrés, e) producto 01AZ, f) producto 02EB, g) producto 03NA, h) producto 04HV, i) producto 05CA, j) producto 06AD, k) producto 07AR.



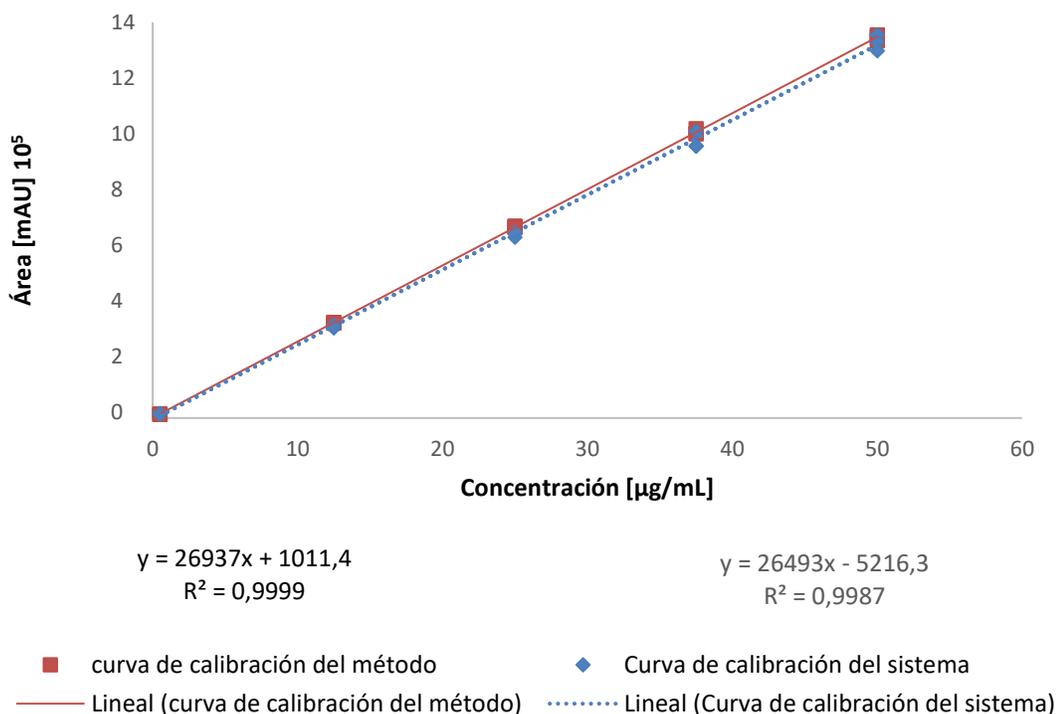


Bajo los criterios establecidos y analizados anteriormente en los resultados de las muestras evaluadas es posible concluir que el método es selectivo para la cuantificación de cafeína extraída de matrices tipo gel y emulgel.

- **Linealidad**

Se estudió la respuesta instrumental de cinco puntos equidistantes en el rango de concentración de 0,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$, rango establecido teniendo en cuenta la aplicación para la cuantificación de cafeína en geles comerciales. En el **Anexo C** se presentan los resultados del área bajo la curva integrados mediante el software LCsolution® para el sistema y el método de tres réplicas independientes de cada punto para la señal correspondiente a cafeína. Con el área bajo la curva fue posible mediante el método de mínimos cuadrados obtener la regresión lineal presentada en la **Figura 4-20** que muestra, tanto para el sistema como para el método un coeficiente de correlación mayor al 0,995, valor aceptado como adecuado para definir una relación existente entre la concentración y la respuesta instrumental.

Figura 4-20: Curvas de regresión para el sistema y método.



La linealidad del sistema y del método se evaluó estadísticamente a través de la prueba t de Student que determina si existe correlación entre las variables dependiente e independiente y si los parámetros intercepto y pendiente difieren de cero. A su vez, se realizó el análisis de varianza ANOVA con la finalidad de determinar si la regresión lineal es significativa y los datos se ajustan al modelo. Los resultados de las pruebas se describen en la **Tabla 4-9** y en la **Tabla 4-10** respectivamente indicando la aceptación o rechazo de la hipótesis nula.

Tabla 4-9: Prueba de significancia t de Student para evaluar la linealidad del sistema y método.

Parámetro	t estimado método	t estimado sistema	t tabla	Resultado
Correlación XY	306,5245	98,4654		Se rechaza H_0 , existe correlación entre (x) y (y).
Pendiente	306,5245	98,4654	2,1604	Se rechaza H_0 , la pendiente es significativamente diferente de cero.
Intercepto	0,3759	-0,6332		Se acepta H_0 , el intercepto no es significativamente diferente de cero.

De acuerdo con el análisis del estadístico t para el sistema y el método, tanto para el parámetro de correlación entre (x) y (y) como para la pendiente, el estadístico t calculado

es mayor al obtenido de la tabla con un 95% de confianza, lo que implica que se rechaza la hipótesis nula para ambos parámetros, demostrando para el primero, que existe una correlación entre la variable independiente 'concentración' y la variable dependiente 'área bajo la curva' y que para el segundo parámetro, conforme con el criterio de aceptación, las pendientes son significativamente diferentes de cero. Por otro lado, para el parámetro intercepto, se encontró que el valor estimado del estadístico t es menor que el valor tomado de la tabla, por lo que se acepta la hipótesis nula planteada, evidenciando que la recta presenta un intercepto con el eje Y que no difiere significativamente de cero.

Tabla 4-10: Resultados del análisis de varianza ANOVA para el sistema y el método.

Parámetro	F estimado método	F estimado sistema	F tabla	Resultado
Regresión	9695,4270	93957,2532	4,6672	Se rechaza H_0 , la regresión es significativa.
Desvío de linealidad	0,6413	0,1335	3,7082	Se acepta H_0 el desvío no es significativo la regresión lineal se ajusta.

Así mismo, en el análisis de varianza ANOVA tanto para el método como para el sistema, la prueba F demostró que los datos cumplen los criterios para los parámetros de regresión y falta de ajuste o desvío de linealidad. Para el primer parámetro, el F calculado a partir de los datos experimentales es mayor que el F obtenido de la tabla de Fischer para un alfa de 0,05, por lo que se rechaza la hipótesis nula indicando que la regresión es estadísticamente significativa. Por el contrario, para el parámetro de falta de ajuste, se encontró que el F estimado es menor que el F tomado de la tabla, por lo que se acepta la hipótesis nula, evidenciando que el desvío de la linealidad no es significativo y que por tanto la relación lineal se ajusta a los datos.

Estos resultados producto del tratamiento estadístico permiten concluir que los datos experimentales cumplen con los criterios de linealidad establecidos ajustándose al modelo de regresión lineal.

- **Precisión.**

Para evaluar la precisión instrumental se realizaron seis inyecciones de la concentración intermedia de la curva de calibración que corresponde a 25 µg/mL de cafeína en etanol.

Los valores del área bajo la curva obtenidos se consignan en la **Tabla 4-11**, así como el resultado de la desviación estándar relativa de las réplicas.

Tabla 4-11: Resultados de la respuesta instrumental de inyecciones sucesivas de cafeína.

Réplica	Áreas
1	646586
2	647561
3	640652
4	632977
5	633321
6	633315
Promedio	639069
Desviación	6847
RSD %	1,07

Como se muestra en la **Tabla 4-11**, la variación es inferior al criterio de aceptación, por lo que se considera que la variabilidad debida al instrumento no afecta estadísticamente en la obtención de la respuesta y que el funcionamiento del sistema cromatográfico es adecuado.

Por otro lado, la repetibilidad del método fue analizada a través del coeficiente de variación obtenido a partir del test de Cochran para tres réplicas de cinco concentraciones. En primer lugar, se evaluó la existencia de igualdad de varianzas para el porcentaje de recuperación correspondiente a cada concentración obtenido con una curva de calibración externa independiente como se muestra en la **Tabla 4-12**. Dado que se determinó que el valor de G experimental (0,4717) es menor al valor de G obtenido de la tabla (0,683), se aceptó la hipótesis nula de igualdad de varianzas determinando que son equivalentes y que la concentración no afecta en la varianza, por lo que fue posible calcular el coeficiente de variación ponderado RSDp.

Tabla 4-12: Resultados de la prueba de Cochran para repetibilidad del método.

<i>C</i> µg/mL	Área	C hallada (µg/mL) $Y = 26150x + 287,18$	% Recuperación promedio	RSD calculado
0,5	13250	0,5	98,61	0,5
	13687	0,5		
	13728	0,5		
12,5	338448	12,4	99,08	0,4
	336093	12,3		
	338284	12,4		
25	674433	24,8	99,29	0,4
	679388	24,9		
	674396	24,7		
37,5	1023616	37,6	99,08	1,0
	1005221	36,9		
	1006980	37,0		
50	1335115	49,0	98,89	0,8
	1355681	49,8		
	1348788	49,5		
			Gexp	0,472
			Gtab(0.05,5,3)	0,683
			RSDp	0,660

De acuerdo con los resultados, el valor del coeficiente de variación ponderado calculado es inferior al criterio de aceptación del 2%, por lo que se determinó que el método evaluado cumple los requisitos de validación de precisión a nivel de repetibilidad.

Finalmente, se evaluó la precisión intermedia del método a través del RSD global del porcentaje de recuperación para tres réplicas (R1, R2 y R3) de tres niveles de concentración, 0,5, 25 y 50 µg/mL (C1, C2 y C3), en tres días (D1, D2 y D3) con dos analistas diferentes (A y B), de acuerdo con lo explicado en la metodología. El porcentaje de recuperación fue obtenido a través de una curva de calibración independiente realizada cada día. La **Tabla 4-13** muestra los resultados obtenidos para los parámetros evaluados en precisión intermedia, promedio, desviación estándar, coeficiente de variación entre factores y coeficiente de variación global.

Tabla 4-13: Resultados de la precisión intermedia.

Factor/parámetro	Nivel	Promedio del % de recuperación	Desviación	RSD	RSD promedio
Días	D1	99,064	0,665	0,672	1,425
	D2	101,111	2,078	2,005	
	D3	99,383	1,539	1,549	
Analista	A	100,362	1,821	1,815	1,701
	B	99,344	1,576	1,587	
Réplica	R1	99,518	1,551	1,559	1,775
	R2	100,121	1,863	1,861	
	R3	99,920	1,903	1,905	
Concentración	C1	98,909	1,955	1,977	1,638
	C2	100,517	1,613	1,604	
	C3	100,132	1,335	1,333	
Promedio del % de recuperación global	99,853				
Desviación estándar global	1,747				
RSD global	1,750				

De acuerdo con el criterio de aceptación, valores del coeficiente de variación inferiores al 2% para métodos cromatográficos permiten demostrar que existe concordancia entre los resultados de los factores evaluados [95][96]. Teniendo en cuenta los resultados, el coeficiente de variación global es inferior al criterio al igual que los coeficientes individuales por factor, lo anterior implica que, para efectos prácticos, los factores, días, analista, réplica y concentración, no aportan variaciones al método obteniéndose resultados dentro del límite de aceptación.

El análisis realizado demuestra que el método es preciso en términos de repetibilidad y precisión intermedia bajo los criterios de aceptación propuestos.

- **Exactitud.**

Para la evaluación de la exactitud se determinó el porcentaje de recuperación de nueve muestras que cubren todo el rango de calibración obtenido con una curva de calibración independiente. Para cada concentración fueron determinados los intervalos de confianza, así como el promedio, el coeficiente de variación y los intervalos de recuperación globales como se muestra en la **Tabla 4-14**.

Tabla 4-14: Resultados del porcentaje de recuperación de tres niveles de concentración.

C µg/mL	Área	C hallada (µg/mL) Y = 27056x + 394,55	% Recuperación	S²	LI IC	LS IC
0,5	13519	0,485	96,280			
0,5	13863	0,498	98,803	3,316	92,260	101,307
0,5	13381	0,480	95,267			
25	676755	24,999	100,049			
25	665579	24,585	98,382	0,954	97,082	101,936
25	677181	25,014	100,097			
50	1356452	50,120	100,281			
50	1356907	50,137	100,315	0,019	100,036	100,718
50	1359871	50,247	100,534			
Promedio			99,943	Intervalo de confianza	98,889	101,987
Desviación			0,784			
CV (%)			0,785			

El porcentaje de recuperación promedio obtenido, así como los límites de confianza se encuentran dentro del rango de especificación recomendado para formas farmacéuticas terminadas 95% a 105%.

Por otro lado, se determinó la idoneidad estadística de la exactitud considerando la prueba de homogeneidad de varianzas de Cochran y la cercanía al 100% para el porcentaje de recuperación a través del estadístico t student obteniéndose los resultados mostrados en la **Tabla 4-15**.

Tabla 4-15: Resultados de la pruebas de Cochran y t Student.

Test de Cochran		Prueba de t	
G exp.	0,773	t exp	0,281
G tab. (α=0.05; r=3, n=3)	0,87	t tab (α=0.05, gl = 8)	2,306

En cada caso, se encontró que el estadístico calculado (t y G exp.) es inferior al estadístico obtenido de la tabla respectiva con el 95% de confianza, por lo cual se acepta la hipótesis nula que, para la prueba de Cochran indica que las varianzas no son significativamente diferentes, es decir, que existe homogeneidad de varianzas. A

su vez, para el estadístico t, se determina que la recuperación es satisfactoria y no difiere significativamente del 100%. De esta manera se puede concluir que la metodología evaluada cumple el parámetro de exactitud bajo los lineamientos propuestos.

- **Estabilidad.**

Se evaluó la estabilidad para conocer el porcentaje de degradación del analito durante el tiempo de ensayo, en condiciones de almacenamiento y al someter las muestras a condiciones de estrés. Las muestras fueron analizadas en diferentes días por un periodo de dos semanas obteniendo el porcentaje de pérdida/ganancia mostrado en la **Tabla 4-16**, calculado respecto al valor de concentración obtenido para la muestra recién preparada. De manera similar tres concentraciones diferentes fueron sometidas a condiciones de refrigeración y evaluadas en el mismo periodo obteniéndose los resultados que se muestran en la **Tabla 4-17**.

Tabla 4-16: Porcentaje de pérdida/ganancia de muestras sometidas a condiciones de trabajo.

Concentración inicial µg/mL	% Pérdida (-) /Ganancia (+)				
	12h	6 días	8 días	13 días	15 días
12,426	0,062	-2,978	-2,312	-2,455	-2,077
22,862	0,444	-0,489	0,886	-0,088	1,754
0,729	0,614	-0,703	-3,238	-1,192	-2,943

Tabla 4-17: Porcentaje de pérdida/ganancia de muestras sometidas a condiciones de refrigeración.

Concentración inicial µg/mL	% Pérdida (-) /Ganancia (+)			
	6 días	8 días	13 días	15 días
0,622	-1,902	-3,598	-1,705	-3,007
24,117	-3,018	-3,125	-0,238	-0,118
44,524	-2,857	-2,839	-2,706	-2,622

En la **Tabla 4-16** es posible notar que para el tiempo que las muestras permanecen en el automuestreador mientras la duración del ensayo, la variación es despreciable y puede ser atribuida a las condiciones de repetibilidad del instrumento. A su vez, para el periodo de tiempo evaluado en ambas condiciones, se observa que el porcentaje de pérdida es inferior al 10% considerado como criterio de aceptación para la degradación del analito [80]. Estas variaciones mínimas fueron constantes en el tiempo siendo la variación a los seis días la

misma variación obtenida para dos semanas, por lo que se podría afirmar que el analito no fue degradado en el tiempo de evaluación y el pequeño porcentaje de variación pudo ser debido a las condiciones de estudio de cada día particular, así como a la variabilidad que puede aportar el instrumento. Los resultados obtenidos se asemejan a los reportados por Sanabria L. en su trabajo de maestría [78], en el que se reporta para la estabilidad de la cafeína en condiciones de almacenamiento a cuatro semanas un porcentaje de degradación inferior al 3%.

Finalmente, tres réplicas de una misma concentración fueron sometidas a los ciclos de calentamiento y enfriamiento descritos en la sección de métodos. Las muestras evaluadas después de las condiciones de estrés presentaron un ligero aumento en la concentración del analito, es decir, la cafeína detectada después de someter el gel a condiciones de estrés fue superior a la detectada recién preparado el producto como se muestra en la **Tabla 4-18**. Lo anterior puede ser debido a que el sometimiento de las muestras a estas condiciones extremas puede causar la evaporación del agua y los solventes que contienen la formulación causando una concentración de los sólidos. Por otro lado, al observar los cromatogramas, como se puede notar en los resultados del parámetro selectividad de este apartado, se determina que no existen productos de degradación que puedan interferir con la cuantificación analítica de cafeína.

Tabla 4-18: Resultados de estabilidad al someter las muestras a condiciones de estrés.

Concentración inicial $\mu\text{g/mL}$	Concentración final $\mu\text{g/mL}$	% Pérdida (-) /Ganancia (+)
24,117	25,836	7,128
	25,860	7,227
	25,082	3,998

En cuanto a la estabilidad, es posible decir que después de someter las muestras a diferentes condiciones de tiempo y temperatura el analito evaluado mantiene su concentración de acuerdo con el criterio propuesto de porcentaje de degradación.

- **Sistema de idoneidad.**

El sistema de idoneidad fue evaluado con seis inyecciones sucesivas de una misma concentración de cafeína presentando los resultados que se muestran en la **Tabla 4-19**.

De acuerdo con los criterios de aceptación propuestos, el tiempo de retención presenta una variación inferior al 10%, la eficiencia medida en platos teóricos es superior a 2000, el coeficiente de variación relativo para la respuesta del instrumento entre inyecciones es inferior a 2% y el pico obtenido es simétrico con un valor de asimetría de 1,2. De esta manera, se puede afirmar que la metodología analítica cumple con la idoneidad cromatográfica.

Tabla 4-19: Resultados del sistema de idoneidad.

Concentración 25 µg/mL	Tiempo de retención (min)	Platos teóricos	Factor de asimetría As	Área
Inyección 1	3,059	2034,392	1,227	633882,000
Inyección 2	3,065	2084,793	1,242	645260,000
Inyección 3	3,062	2051,083	1,250	645563,000
Inyección 4	3,061	2080,937	1,244	640170,000
Inyección 5	3,069	2090,636	1,241	636201,000
Inyección 6	3,068	2078,371	1,243	633113,000
Promedio	3,064	2070,035	1,241	639031,500
Desviación estándar	0,004	22,182	0,008	5519,214
%RSD	0,131	1,072	0,614	0,864

4.1.4.3 Extracción de cafeína de los productos comerciales

Los productos seleccionados del mercado fueron sometidos al proceso de extracción desarrollado y validado previamente. Los análisis preliminares realizados permitieron obtener la cantidad a pesar de cada producto para conseguir resultados cuantificables siendo 1 g la máxima cantidad pesada. En principio, se pesó 1 g de gel de cada producto, refinando la cantidad hasta conseguir la más adecuada a la curva de calibración. Se determinó que la cantidad adecuada era 0,07 g para el gel 02EB, 0,5 g para los geles 04HV, 05CA y 06AD y 1 g para los geles 01AZ, 03NA y 07AR que permitieron obtener el área bajo la curva mostrada en la **Tabla 4-20** cuyos coeficientes de variación relativos entre muestras fueron inferiores al 1 % indicando reproducibilidad en los resultados.

Tabla 4-20: Área bajo la curva obtenida para cada muestra evaluada

	01AZ	02EB	03NA	04HV	05CA	06AD	07AR
R1	2325	1006460	32693	1228468	1151309	1050488	0
R2	3429	1010394	35088	1213774	1150548	1062011	0
R3	3407	1009374	33264	1219385	1141661	1043517	0
PROMEDIO	3054	1008743	33682	1220542	1147839	1052005	0
%RSD	0,207	0,002	0,037	0,006	0,005	0,009	0,000

Dentro del proceso preliminar se encontró una particularidad para el gel 07AR, del que se adquirieron dos tubos de 400 g, (tubo de prueba y tubo de ensayo final) cada tubo fue muestreado y analizado encontrando inconsistencias en el contenido de cafeína según el sitio y el tubo de donde se tomara la muestra. Para el tubo de prueba se encontró en el primer ensayo un contenido nulo de cafeína, y en el segundo un contenido cercano al 1 %. Por lo que se decidió realizar análisis por el método A y B con el tubo de prueba para determinar si el método no era el adecuado. Los resultados mostraron que por esto dos métodos no se encuentra cafeína, así como sucedió con las tres muestras analizadas al final con el método desarrollado.

La extracción y cuantificación de cafeína se realizó por triplicado obteniendo los resultados que se muestran en la **Tabla 4-21**. Se evidencia que el gel 02EB presentó el contenido de cafeína más alto de los geles evaluados con un 3,09 %w/w de cafeína cuantificada, seguido por los geles 04HV, 05CA y 06AD que presentan un contenido de cafeína similar e inferior al 0,5 %w/w, mientras que los geles 01AZ, 03NA y 07AR presentan un contenido inferior al 0,009 %w/w que puede ser catalogado como un contenido demasiado bajo. Para este tipo de cosméticos el porcentaje de cafeína recomendado es entre 1-3 %w/w y en cosméticos comerciales se han encontrado valores entre el 0,03–5,6%w/w [72].

Tabla 4-21: Resultados del contenido de cafeína en los siete productos evaluados.

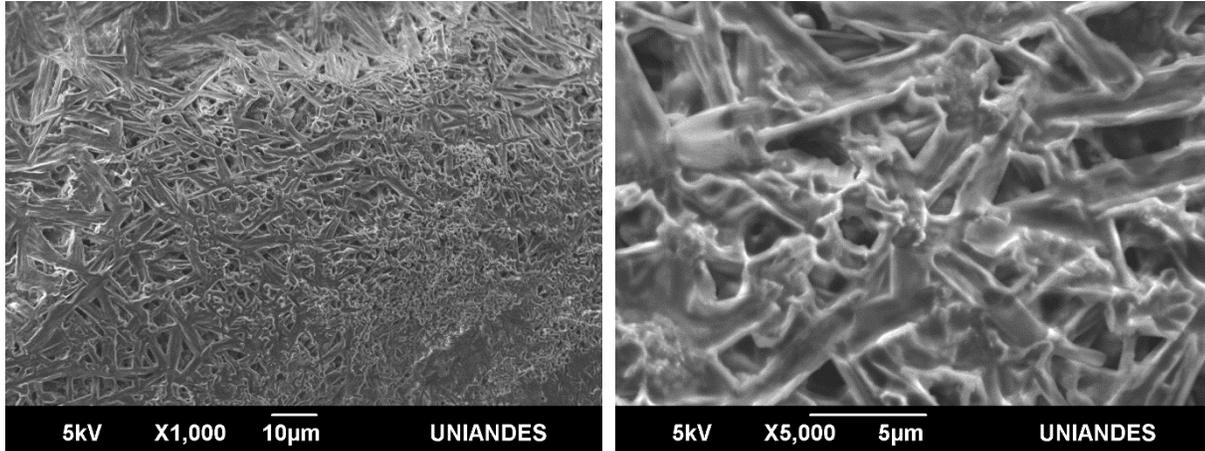
	CONTENIDO DE CAFEÍNA [%w/w]						
	01AZ	02EB	03NA	04HV	05CA	06AD	07AR
R1	0,0002	3,0848	0,0059	0,4550	0,4265	0,3891	-0,0002
R2	0,0004	3,1175	0,0063	0,4493	0,4259	0,3934	-0,0002
R3	0,0004	3,0785	0,0060	0,4518	0,4227	0,3866	-0,0002
PROMEDIO	4,E-04	3,094	6,E-03	0,452	0,425	0,390	0,000
DESVESTA	0,000	0,021	0,000	0,003	0,002	0,003	0,000

Teniendo en cuenta los resultados se decide que los productos con un contenido de cafeína inferiores al 0,009 % no serán tenidos en cuenta para los ensayos en celdas de difusión ni para la toma de imágenes con microscopía electrónica de barrido (SEM). El gel 07AR, que como se explicó presentó inconsistencias durante los primeros ensayos, en algunos casos no encontrando cafeína por ninguna de las metodologías exploradas, y en otro de los ensayos realizados cuantificando cafeína equivalente al 1 %w/w, podría indicar problemas de homogeneidad en la producción. Por esta razón, se incluyó también este gel para la evaluación de los ensayos de liberación para determinar si en realidad cuenta o no con cafeína y si se puede evidenciar en función del tiempo, o si la metodología de extracción aplicada no se adecuaba a este producto.

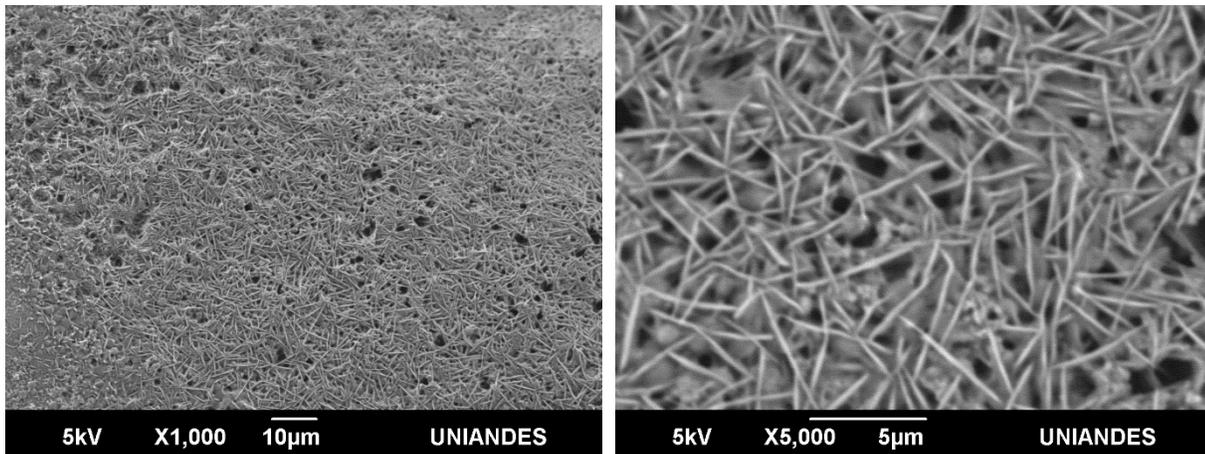
4.1.5 Caracterización de microestructura por microscopía electrónica de barrido

Con el fin de realizar una caracterización morfológica de los productos, se realizó la toma de imágenes mediante SEM con platina de enfriamiento. Como se mencionó anteriormente, las imágenes fueron realizadas para los geles que presentaron un porcentaje de cafeína superior a 0,009 %w/w de acuerdo con el método de extracción desarrollado. La **Figura 4-21** muestra las micrografías obtenidas para los productos evaluados en las que se evidencia la estructura tridimensional de la red polimérica particular para cada gel. Como se observa, tanto el producto 02EB como el 04HV muestran una estructura de red fibrosa irregular mientras que el gel 06AD parece formar una estructura cavernosa tipo panal con paredes gruesas; el gel 05CA corresponde a una estructura no definida que tiende a ser una mezcla entre fibrosa y cavernosa. Estas estructuras rígidas explican el comportamiento para el módulo de pérdida en los ensayos de barrido de frecuencia donde ante un aumento de frecuencia, la rigidez provoca un aumento del módulo previa a su caída por exceso de deformación. Comportamiento que es mucho más marcado para el producto 05CA que parece tener paredes más gruesas seguido por el gel 06AD y el 04HV.

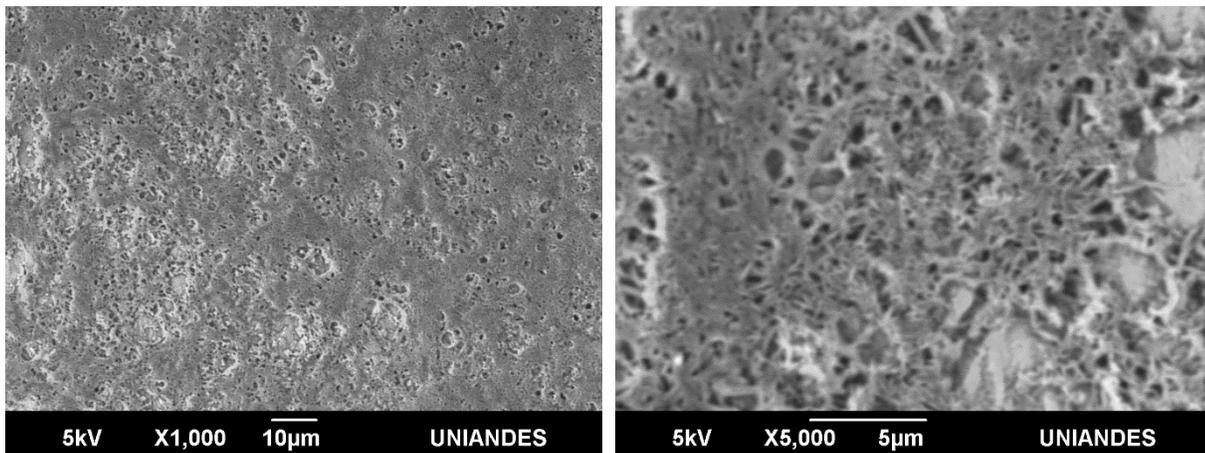
Figura 4-21: Micrografías a 1000 y 5000 aumentos para los productos a) 02EB, b) 04HV, c) 05CA; d) micrografías a 500 y 1000 aumentos para el gel 06AD.



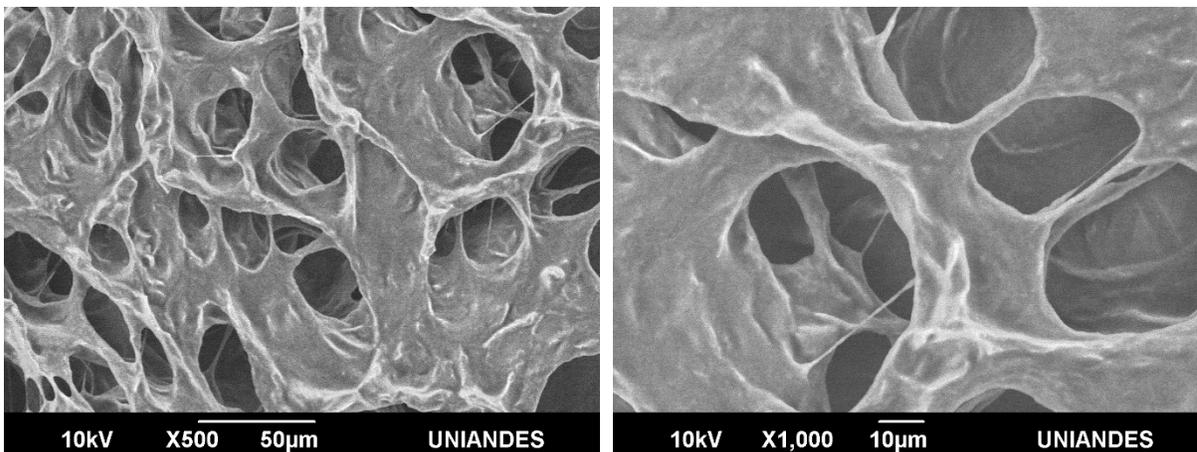
a)



b)



c)



d)

Así mismo, las estructuras pueden ser correlacionadas con la cantidad de polímero que posee cada producto, como fue demostrado por Kim J. et al [70], quienes señalaron que la cantidad de polímero se encuentra conforme con la estructura de red formada, encontrando que concentraciones de polímero bajas (alrededor del 0,1 %) generan estructuras fibrosas que se entrelazan físicamente, como sucede en primer lugar con el producto 02EB y, a medida que la concentración de polímero aumentaba así mismo lo hacía la densidad de reticulación (como sucede con el gel 04HV) hasta formar estructuras tipo panal con formación de pared, vistas en los productos 05CA y 06AD.

Por otro lado, teniendo en cuenta la disponibilidad de los compuestos en la estructura de red y, suponiendo que los espacios entre la red fuesen ocupados por agua y sustancias hidrofílicas, las estructuras cavernosas podrían presentar una mayor disponibilidad de estos ingredientes para ser absorbidos por la piel, de forma que, dada la hidrofilia de la cafeína, para productos como el gel 06AD y 05CA, se espera que la permeación sea un poco más efectiva que para los geles con estructuras del tipo fibrosas.

4.2 Ensayos en celdas de difusión

Los ensayos en celdas de difusión fueron realizados para los geles cuyo contenido de cafeína obtenido bajo la metodología de extracción desarrollada fuera superior al 0,009 %w/w, aquellos con porcentaje inferior no fueron tomados en cuenta puesto que la cantidad de cafeína en el compartimento receptor no era detectable. A su vez, el gel 07AR que presentó inconsistencias en el contenido también fue estudiado en los ensayos para confirmar su contenido del analito y su comportamiento.

4.2.1 Condiciones de ensayo

De acuerdo con la disponibilidad de celdas de difusión, se determinó usar celdas de Franz verticales con área de difusión promedio de $1,75 \pm 0,02 \text{ cm}^2$ y 7 mL de volumen de receptor, por poseer una relación área/volumen adecuada a la naturaleza del ensayo puesto que permite una justa dosificación en el compartimiento dador y una adecuada recuperación del analito del medio receptor de acuerdo con los ensayos preliminares. Esta selección también tuvo en cuenta que, las celdas más pequeñas presentaban un área difusión inferior que dificultaba la dosificación y las celdas de tamaño superior presentaban una mayor dilución del analito en el medio dificultando su cuantificación. La cantidad muestreada y la frecuencia de muestreo fue establecida respetando las condiciones del ensayo, por lo que se determinó tomar una cantidad de 500 μL a 15 min, 30 min y luego cada hora hasta la finalización del ensayo. Se encontró que la alícuota tomada era suficiente para realizar la cuantificación y además adecuada para evitar el ingreso de burbujas al medio que impidieran la difusión. A su vez, la frecuencia de muestreo fue establecida para evitar que la concentración en el medio fuese alterada con una frecuencia de muestreo superior puesto que, a mayor duración del ensayo, la cantidad de analito encontrada en el medio disminuía.

Para el establecimiento de la dosificación, de acuerdo con el área de difusión la dosis necesaria para una condición finita es $17,5 \pm 1 \text{ mg}$. Este valor fue obtenido para cada producto individual pesando las cantidades tomadas con una micropipeta de 20-200 μL de capacidad con puntas recortadas en 5 mm. El procedimiento fue estandarizado para cada producto considerando sus características reológicas particulares, por lo que, para cada producto se determinó un valor en el instrumento que permitiera en la liberación de la muestra, la dosis equivalente a 10 mg/cm^2 . De esta forma, cada gel fue muestreado con un valor de volumen diferente establecido en la micropipeta a un tiempo de espera de un minuto para permitir el ingreso completo del gel en la punta. La dosis fue verificada previo al inicio de cada ensayo pesando la cantidad tomada en la punta bajo el valor de volumen establecido. Una vez la dosis se tiene en la punta, es aplicada sobre la membrana en la cámara dadora.

- **Condiciones particulares para el estudio de liberación**

Se realizaron ensayos preliminares con dos productos por triplicado, el gel con mayor contenido de cafeína 02EB y el de menor contenido dentro de los que se consideraron con contenido aceptable 06AD. De acuerdo con los ensayos preliminares se estableció que según el contenido hallado en el gel era necesario diluir la alícuota para establecer el rango de calibración. Éste, fue planteado en concordancia con los ensayos de permeación determinando un rango desde el límite de detección hasta una respuesta instrumental cercana a 30000 mAU. Debido al tamaño minúsculo de las celdas, cada alícuota muestreada fue pesada en un balón aforado para corregir el volumen tomado por peso, realizando diluciones de 10 mL para el gel 02EB y de 5 mL para los demás geles (04HV, 05CA, 06AD, 07AR) por poseer un contenido similar. Los balones fueron llevados a volumen con medio fresco.

La duración del ensayo fue planteada a 4 h con una frecuencia de muestreo a 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h. Sin embargo, como producto de las evaluaciones preliminares fue posible encontrar que, para ambos productos, la cafeína era liberada en su totalidad antes de la tercera hora del ensayo, por lo que el tiempo de duración se estableció en tres horas. Así mismo, los ensayos permitieron establecer la temperatura del baño de calentamiento en 33 °C que permitía después de 15 min alcanzar una temperatura de membrana de 32 ± 1 °C y mantenerla durante el tiempo de la prueba.

- **Condiciones particulares para el estudio de permeación**

Se realizaron ensayos preliminares con los dos espesores de piel establecidos para el estudio de permeación, membrana dermoepidérmica completa (DE) y membrana con 3mm de tejido hipodérmico (DEH). El tejido utilizado fue tejido no íntegro con el objetivo de establecer las condiciones particulares para el estudio. De esta forma, se estableció la temperatura, el rango de cuantificación, la duración del ensayo y el tratamiento de la piel. En primera instancia, fue necesario una temperatura específica para cada espesor puesto que lo que se requiere es, que la superficie de la membrana mantenga la temperatura de las condiciones *in vivo*, para esto, la temperatura del baño se estableció en 35 °C para los ensayos con membrana dermoepidérmica y en 37 °C para los ensayos con membrana hipodérmica.

El ensayo preliminar fue realizado para los dos productos considerados en el ensayo preliminar de liberación a 5 h de duración. Debido a que la membrana no era íntegra la permeación alcanzada fue alta en ambos, por lo que fue necesario realizar un ensayo con piel íntegra. De esta forma fue posible notar diferencias entre la piel íntegra y no íntegra que se discutirán más adelante en la sección de resultados del estudio de permeación. También, fue posible establecer que en general al manejar una membrana con tejido hipodérmico la cantidad permeada es mucho menor que al usar una membrana dermoepidérmica, por lo que ésta última marcó el rango máximo encontrándose en una respuesta instrumental cercana a 30000 mUA. La cantidad del analito que permaneció en el compartimiento dador se determinó con el método desarrollado para extracción de cafeína. Debido a que en los ensayos fue posible notar que después de la cuarta hora el contenido que se encontraba en el compartimiento receptor descendía, se decidió establecer 5 h como la duración del ensayo, además, se consideró un tiempo adecuado conforme a las condiciones de uso previsibles de los productos cuya aplicación es por un periodo corto.

Por otro lado, respecto al tratamiento de la piel, se decidió emplear la técnica de corte con bisturí quirúrgico considerado seguro y adecuado para la obtención del espesor de membrana requerido [78], así mismo, la piel fresca fue almacenada en una solución refrigerada de NaCl 1 M por un máximo de una semana, medio recomendado por Martínez et Al.[76]. La integridad fue comprobada y medida bajo estas condiciones para determinar que no hubiese variación por el tratamiento implementado. Se comprobó que los valores para la TEWL obtenidos antes y después del almacenamiento de la piel, se mantuvieron cercanos al valor inicial lo que indica que en efecto este tratamiento de la piel no afecta su integridad.

4.2.2 Validación de la metodología de cuantificación

La cuantificación de cafeína para los ensayos en celdas de difusión fue validada en términos de selectividad, linealidad, exactitud y precisión, idoneidad, LOD, estabilidad de las soluciones, recuperación y arrastre. Se utilizó muestras de analito disuelto en medio receptor y en medio que fue sometido a condiciones de ensayo con tejido cutáneo denominado 'extracto de piel'. La **Tabla 4-22** ilustra los resultados de los parámetros de

validación, y el **Anexo D** los presenta con más detalle de acuerdo con la metodología propuesta.

Tabla 4-22: Resumen de resultados obtenidos para la validación de la metodología de cuantificación para los ensayos en celdas de difusión.

Parámetro evaluado	Criterio de aceptación	Resultados	Conclusión
Selectividad	<ul style="list-style-type: none"> - No existe interferencia. - Pureza superior a 0,99. 	<ul style="list-style-type: none"> - Interferencia con la señal de caféina: los cromatogramas e isogramas demuestran que ningún compuesto interfiere con la señal a 2,9 min para los seis especímenes evaluados y el buffer de fosfatos. - Pureza de pico: superior a 0,9999. 	El método es selectivo.
Linealidad	<ul style="list-style-type: none"> - Coeficiente de correlación (R^2) superior a 0,99. - Linealidad estadística a través de t de student y ANOVA. 	<ul style="list-style-type: none"> - Coeficiente de correlación: Cada curva obtenida en tres días diferentes presentó un R^2 superior a 0,999. - La prueba t de Student indicó que, para cada curva de calibración en tres días diferentes, existe correlación entre X y Y, la pendiente es significativamente diferente de cero y, el intercepto no es diferente de cero. <p>La prueba de varianza ANOVA demostró que la regresión es significativa y que la regresión lineal se ajusta a los datos.</p>	El método es lineal.
Exactitud	<ul style="list-style-type: none"> - Recuperación entre 95-105%. - Coeficiente de variación inferior a 15%. 	<p>El porcentaje de recuperación promedio para cinco repeticiones de los cuatro niveles evaluados fue 100,939 % con un coeficiente de variación de 4,187%.</p>	El método es exacto.

Precisión	<ul style="list-style-type: none"> - Coeficiente de variación inferior a 15 % para repetibilidad y precisión intermedia. 	<ul style="list-style-type: none"> - Repetibilidad: la prueba de Cochran realizada para el porcentaje de recuperación de las determinaciones de un mismo día y un analista estableció que existe igualdad de varianzas, permitiendo obtener el coeficiente de variación ponderado con un valor de 1,068%. - Precisión intermedia: el coeficiente de variación global obtenido para el porcentaje de recuperación de las determinaciones de tres días, dos analistas, cinco réplicas y cuatro niveles de concentración fue 4,856%. 	El método es preciso.
Idoneidad	<ul style="list-style-type: none"> - Platos: superior a 2000. - Tiempo: variación \pm 10 %. - Asimetría: entre 0,8 – 2. - Separación: superior a 1. 	La variación en el tiempo de retención para seis inyecciones de una misma muestra fue de 0,163%, los platos teóricos promedio 5936,312, el factor de asimetría 1,272, y el coeficiente de separación 1,767.	Se comprueba sistema de idoneidad bajo los criterios propuestos.
LOD	Mínimo valor con señal visible y cuantificable.	La mínima concentración para la cual el instrumento generó señal fue de 0,05 μ g/mL, con un área de 1405, una eficiencia de 4805,296 y un factor de asimetría 1,041.	LOD: 0,05 μ g/mL
Estabilidad de las soluciones	Porcentaje de degradación inferior a 15 %.	Las muestras sometidas a condiciones de almacenamiento y de trabajo presentaron un porcentaje de pérdida/ ganancia inferior al 15%. La pureza de pico es superior a 0,9999.	No sufre degradación significativa a las condiciones de estudio.

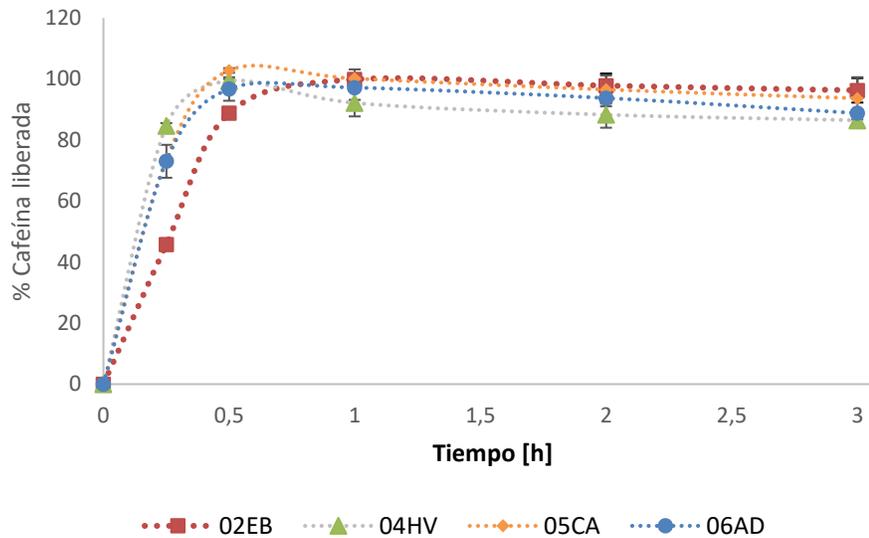
Recuperación	<ul style="list-style-type: none"> - Recuperación entre el 80 al 120%. - Coeficiente de variación inferior a 15%. 	<ul style="list-style-type: none"> - El coeficiente de variación promedio obtenido para el porcentaje de recuperación de las muestras control y de recuperación es 3,326% y 3,512% respectivamente. - Se obtuvo un intervalo de confianza de recuperación de 96,924 a 102,787%. 	<p>El método permite obtener un porcentaje de recuperación dentro del rango establecido.</p>
Arrastre	<p>El arrastre en las muestras de solvente es inferior al 20% del LOD</p>	<p>No se presenta señal en el tiempo de retención del analito para dos inyecciones sucesivas de diluyente después de una inyección del nivel más alto.</p>	<p>No se presenta efecto de arrastre.</p>

Los resultados de los parámetros evaluados permitieron establecer que el método de cuantificación validado posibilita la determinación de la cafeína en el compartimiento receptor durante la realización de los ensayos de difusión.

4.2.3 Ensayos de liberación

Los ensayos de liberación fueron realizados para los geles 02EB, 04HV, 05CA y 06AD que demostraron poseer un contenido de cafeína superior al 0,009 %. La **Figura 4-22** muestra el perfil de liberación obtenido para los geles evaluados, es decir, la cantidad de cafeína que fue liberada en el medio durante el ensayo. Se resalta que, como se mencionó, también se realizó el ensayo para el gel 07AR, sin embargo, no se obtuvo ninguna clase de señal ni en el medio receptor ni en el gel que permaneció sobre la membrana en el compartimiento dador. Estos resultados permiten afirmar que ninguno de los procedimientos aplicados permitió encontrar cafeína en este gel y que, la que posiblemente se encontró en los ensayos preliminares pertenecía solamente a la parte del recipiente de donde se tomó la muestra, por lo que se podría pensar que existe una pobre homogeneidad en la producción de este producto.

Figura 4-22: Perfil de liberación de cafeína para los geles 02EB, 04HV, 05CA y 06AD. Se representan los valores medios \pm desviación estándar con $n=3$



Los perfiles de liberación demuestran que antes de la primera hora los productos 02EB, 04HV, 05CA y 06AD han liberado prácticamente la totalidad de la cafeína que fue cuantificada en la extracción, encontrando en el compartimento receptor hasta el 100 % del compuesto respecto a la dosis aplicada en este lapso de tiempo, de hecho, los productos 04HV y 05CA presentan una liberación máxima en los primeros 30 minutos del ensayo, hecho que implica que los geles tienen la capacidad de liberar el analito de la matriz en un corto tiempo de contacto con la membrana. Como se puede observar en la **Figura 4-22**, el perfil de liberación no es constante en su fase final, dado que se continúa sacando y reponiendo medio bajo una dosis finita que liberó casi la totalidad del contenido del compuesto por lo que la concentración desciende a medida que se continúa extrayendo medio. La evaluación con este tipo de membrana permite obtener una aproximación de la cantidad de cafeína que podría encontrarse en el compartimento receptor al ser liberada desde el producto, pero no simula el comportamiento de la piel al ser tan porosa y permitir sin dificultad el paso del analito, por lo que únicamente permite afirmar que efectivamente la cafeína es liberada del producto.

Por otro lado, se implementó el modelo del factor de similitud f_2 que realiza una comparación punto a punto en los tiempos de muestreo de los ensayos realizados bajo las mismas condiciones para cada producto. Este modelo permitió establecer las diferencias

entre cada perfil comparando por pares el valor promedio de liberación en cada punto de muestreo obteniendo los resultados que se muestran en la **Tabla 4-23**. Bajo el modelo de similitud, los perfiles se consideran similares con valores de f_2 entre 50 y 100, de manera que, al determinar el factor para los perfiles de liberación de un producto respecto a otro se encontró, que el perfil del producto 02EB no presenta similitud con el de ningún otro producto, y así mismo, los perfiles de los geles 05CA y 04HV no son similares entre ellos, sin embargo, se determinó que el producto 06AD presenta similitud con el 05CA y con el 04HV con valores de f_2 de 64 y 54 respectivamente.

Tabla 4-23: Resultados para el factor de similitud f_2 comparando por pares los perfiles de liberación de los productos.

Productos comparados	f_2
06AD vs 05CA	64
06AD vs 04HV	54
06AD vs 02EB	38
05CA vs 04HV	45
05CA vs 02EB	37
04HV vs 02EB	30

Desde la óptica visual, los geles presentaron un comportamiento similar liberando prácticamente la totalidad de cafeína que fue cuantificada en el producto, de forma que, los productos efectivamente permiten que el compuesto sea liberado (aunque sus perfiles no sean estadísticamente similares en todos los casos), lo que significa que la matriz no retiene el analito, sino que al contrario lo vehiculiza y libera en la superficie de contacto, dejándolo disponible para su penetración en la piel. Estos resultados no son comparables con la literatura por el objetivo del ensayo en que se espera una liberación máxima bajo una dosis finita, mientras que, reportes de investigaciones precedentes presentan una liberación prolongada bajo una dosis infinita o una baja liberación con diferentes tipos de membrana.

4.2.4 Ensayos de permeación

Los ensayos de permeación se llevaron a cabo con dos espesores de membrana, con y sin hipodermis (**Figura 4-23**), para los geles 02EB, 04HV, 05CA y 06AD, que demostraron un contenido de cafeína superior a 0,009 % considerado apreciable y cuyo comportamiento

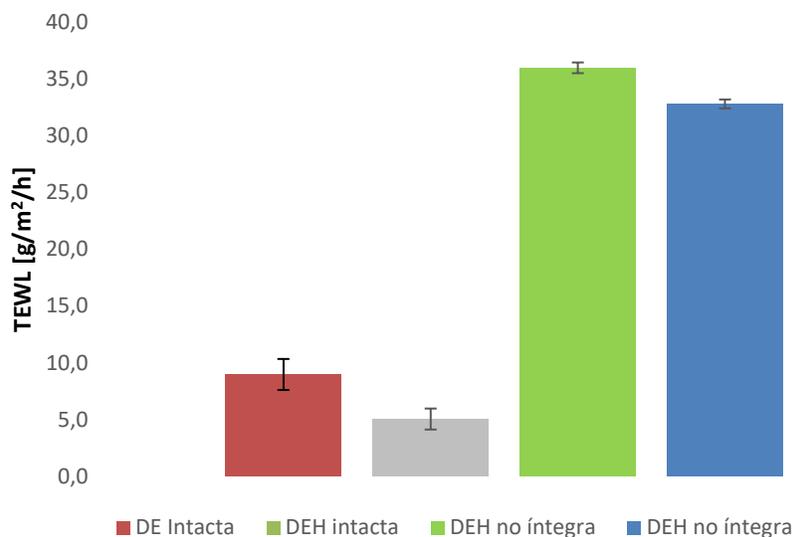
de liberación asegura que el compuesto puede estar disponible para la realización de este estudio.

Figura 4-23: Celdas de difusión de Franz con dos espesores de membrana a) membrana con tejido hipodérmico (DEH) y b) membrana dermoepidérmica (DE).



El tejido cutáneo fue acondicionado para obtener los espesores de trabajo descritos en la metodología. Previo a cada ensayo la piel fue equilibrada y termostata en la cámara receptora con el medio a las condiciones de ensayo, y su integridad fue valorada tomando la medida de TEWL con la sonda Courage+Khazaka® a 3 mm sobre la superficie. Para evaluar el tejido íntegro se consideró que los valores de TEWL deberían estar alrededor de 2-12 g/m²/h para la piel joven en condición saludable [97], de esta forma se determinaron las membranas con condiciones aceptables de TEWL para realizar los ensayos por triplicado de cada espesor. A su vez, se efectuaron mediciones de TEWL para una muestra de tejido no íntegro que fue empleado para los ensayos preliminares. La **Figura 4-24** muestra valores representativos obtenidos para la TEWL de piel con ambos espesores. Los datos promedio de cada tipo de membrana medida se encuentran en el **Anexo E**.

Figura 4-24: Valores medidos de TEWL para membranas: dermoepidérmica (DE), y dermoepidérmica con tejido hipodérmico (DEH) en estado intacto y no íntegro.

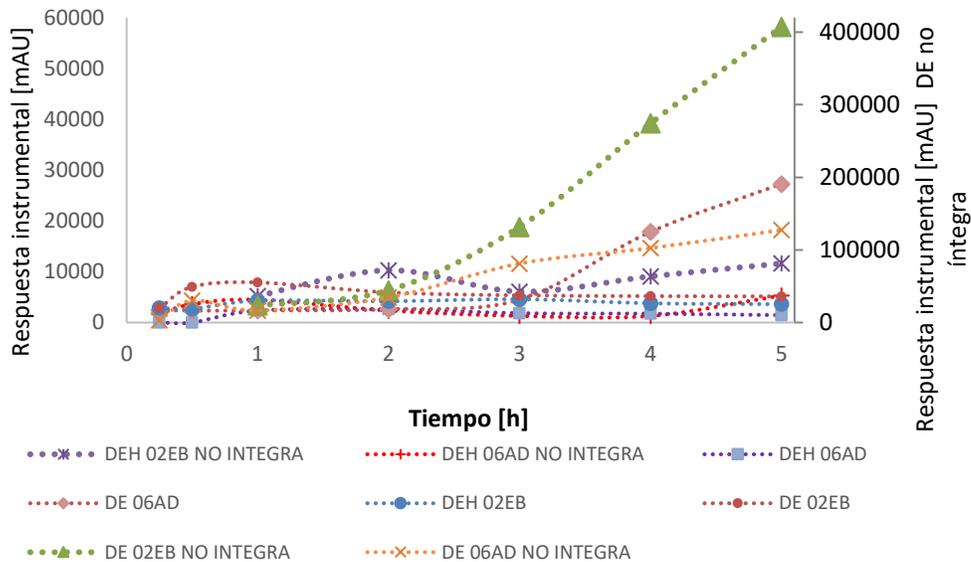


Los datos obtenidos para las mediciones de integridad de membrana demuestran que existe una diferencia de más de 20 g/m²/h entre la piel considerada íntegra y utilizada para los ensayos de permeación y la piel no íntegra utilizada en los ensayos preliminares, lo que da cuenta de su mayor permeabilidad. Pese a que el modelo animal puede presentar valores superiores a los de la piel humana, el tejido cutáneo porcino evaluado presentó niveles similares a los valores de referencia, encontrándose adecuado para uso en ensayos de permeación *in vitro*. Esto se encuentra conforme con lo reportado por Jacques-Jamin et al. [98] quienes compararon la piel intacta humana y porcina, y las mismas sometidas a condiciones de daño a través del pelado con cinta, determinando valores inferiores a 10g/m²/h para la piel intacta y valores de hasta 50g/m²/h para piel sometida al daño.

La piel no íntegra fue empleada en ensayos de permeación preliminares para los productos 06AD y 02EB con ambos espesores de membrana. La **Figura 4-25** muestra el perfil de la respuesta instrumental de cafeína en el medio receptor durante el tiempo de evaluación para ambos geles con piel intacta y con piel no íntegra. Como se observa, la piel intacta no permite el paso del compuesto con la facilidad que lo permite la piel no íntegra. En la misma figura se presentan los resultados de los ensayos con membrana que posee tejido hipodérmico, para la cual la señal del analito es baja, mostrando una diferencia entre piel intacta y no íntegra de cuatro veces para ambos productos. Por otro lado, para la

membrana dermoepidérmica se obtuvieron valores distantes y diferentes entre piel no íntegra y la piel íntegra, encontrando que para la piel no íntegra la señal de la cafeína obtenida es superior en 79 veces a la encontrada en piel íntegra para el 02EB y en 19 veces para el 06AD. Esto concuerda con lo reportado por Jacques-Jamin et al. [98] quienes encontraron que la cantidad de cafeína permeada era significativamente mayor para una membrana no íntegra, con valores de hasta 80 veces en comparación con la piel íntegra.

Figura 4-25: Valor de la respuesta instrumental para los ensayos preliminares y finales de permeación de cafeína de los productos 02EB y 06AD con los dos tipos de membrana evaluados dermoepidérmica (DE) y con hipodermis (DEH).



* Los valores de la membrana DE no íntegra se especifican en eje secundario para poder observar claramente las diferencias entre los demás perfiles.

Los resultados con piel no íntegra permitieron confirmar que los ensayos de permeación no pueden realizarse con este tipo de membrana ya que, el tejido que ha sufrido deterioro presenta una permeabilidad mayor concibiendo resultados que pueden ser erróneos, justificando la importancia de llevar a cabo los ensayos con piel que presenta su barrera íntegra.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, los productos 02EB, 04HV, 05CA y 06AD fueron evaluados en ensayos de permeación con piel íntegra, cuantificando la concentración de cafeína encontrada en el compartimiento receptor para cada producto en el tiempo y la que permaneció sobre la membrana al finalizar el ensayo aplicando una dosis finita de $17,5 \pm 1$ mg de producto. La **Tabla 4-24**, muestra los resultados obtenidos en

porcentaje peso a peso (%w/w) de cafeína máxima que fue capaz de alcanzar el fluido receptor en los ensayos al emplear membrana dermoepidérmica (DE) y membrana con tejido hipodérmico (DEH). A su vez, se muestra la concentración %w/w de cafeína que permanece sobre la membrana después de cinco horas de ensayo, la que fue encontrada previamente en el producto y la cafeína que, se podría encontrar retenida en cada tipo de membrana cuando la concentración en el receptor es máxima.

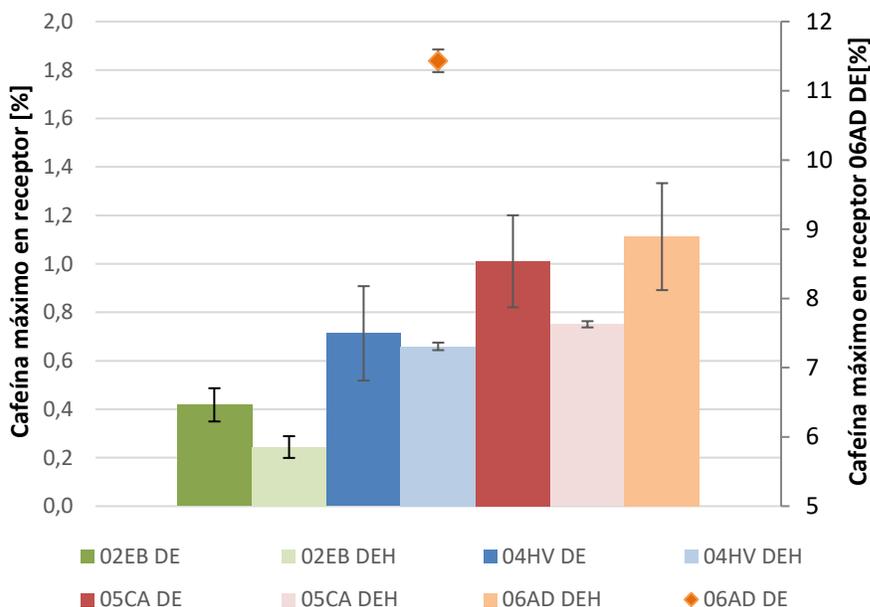
Tabla 4-24: Resultados promedio de permeación de cafeína para los cuatro productos evaluados expresados como concentración de cafeína en % w/w y su desviación para n=3

Producto	02EB		04HV		05CA		06AD	
	DE	DEH	DE	DEH	DE	DEH	DE	DEH
Cafeína retenida en dador al final del ensayo [%w/w]	3,0293 ± 0,1113	3,0048 ± 0,0515	0,4478 ± 0,0228	0,4457 ± 0,2368	0,4159 ± 0,0067	0,4151 ± 0,0171	0,3370 ± 0,0413	0,3245 ± 0,0368
Cafeína máxima en receptor [%w/w]	0,0129 ± 0,0022	0,0075 ± 0,0015	0,0032 ± 0,0010	0,0030 ± 0,0001	0,0043 ± 0,0009	0,0032 ± 0,0001	0,0446 ± 0,0007	0,0043 ± 0,0009
Cafeína en producto [%w/w]	3,0936 ± 0,0209		0,4520 ± 0,0029		0,4250 ± 0,0021		0,3897 ± 0,0034	

Como se observa en la **Tabla 4-24**, se encontró que la cafeína que permanece sobre la piel al finalizar el ensayo corresponde casi en su totalidad a la que se encuentra en el producto. En efecto, teniendo en cuenta los valores promedio de tres réplicas, la cantidad recuperada de cafeína en el compartimiento dador respecto a la dosis aplicada corresponde en más del 98 % indicando que, menos del 2 % de la cafeína aplicada permeó para tres de los cuatro productos evaluados. Para el producto 06AD la cantidad encontrada sobre la membrana al finalizar el ensayo fue menor que para los demás, con una recuperación de cerca del 86 % para ambas membranas, lo que implica que, cerca del 14% de la cafeína presente en el gel pudo haber permeado. Teniendo en cuenta que para ambos tipos de membranas evaluados la cantidad recuperada en el compartimiento dador es similar para cada producto, se deduce que la presencia de tejido hipodérmico en la membrana no influye en la cantidad de cafeína que puede ser suministrada a la piel. Estos resultados demuestran que la capa epidérmica es quien actúa como barrera limitante de la penetración, en concordancia con los resultados de Bolzinger et al. [51] quienes encontraron que, el tener esta capa hipodérmica no influye en la cantidad total de material penetrado.

Respecto a la concentración máxima de cafeína encontrada en el fluido receptor, fue posible notar que en el ensayo con membrana dermoepidérmica (DE), para el gel 06AD es superior a la de los demás productos siendo tres veces la encontrada para el 02EB y, 14 y 10 veces superior a la encontrada para los productos 04HV y 05CA, respectivamente. Sin embargo, es necesario considerar que para cada producto fue encontrado un contenido de cafeína diferente por lo que, bajo esta óptica, puede ser más o menos apreciable el porcentaje de cafeína obtenido en el compartimiento receptor respecto a la dosis aplicada. En este sentido, en la **Figura 4-26** se expresa el porcentaje de cafeína máxima permeada respecto a la dosis aplicada, donde es posible notar que, para la membrana DE, el gel 06AD es quien cuenta con un mayor porcentaje alcanzando un valor de más del 11%. Sin embargo, éste fue el único producto que presentó un porcentaje tan alto, ya que, para los demás productos con el mismo espesor de membrana se encontró que menos del 1% de la cafeína aplicada alcanzaba el fluido receptor, de hecho, para el gel 02EB se encontró menos del 0,4%. Respecto a los ensayos con membrana con tejido hipodérmico (DEH), la cantidad de cafeína encontrada fue particular para cada gel, siendo alrededor del 1% para el gel 06AD, es decir cerca del 10% podría encontrarse en la capa hipodérmica; del 0,1% para el gel 04HV, siendo prácticamente la misma para ambos espesores; y para los productos 02EB y 05CA la diferencia entre cada membrana fue del 0,2% permitiendo considerar que, aunque bajo, existe cierto porcentaje de cafeína que podría ser retenido en la hipodermis.

Figura 4-26: Porcentaje máximo de cafeína respecto a la dosis aplicada encontrado en el fluido receptor durante el ensayo para los cuatro productos con los dos tipos de membrana evaluados dermoepidérmica (DE) y con hipodermis (DEH).



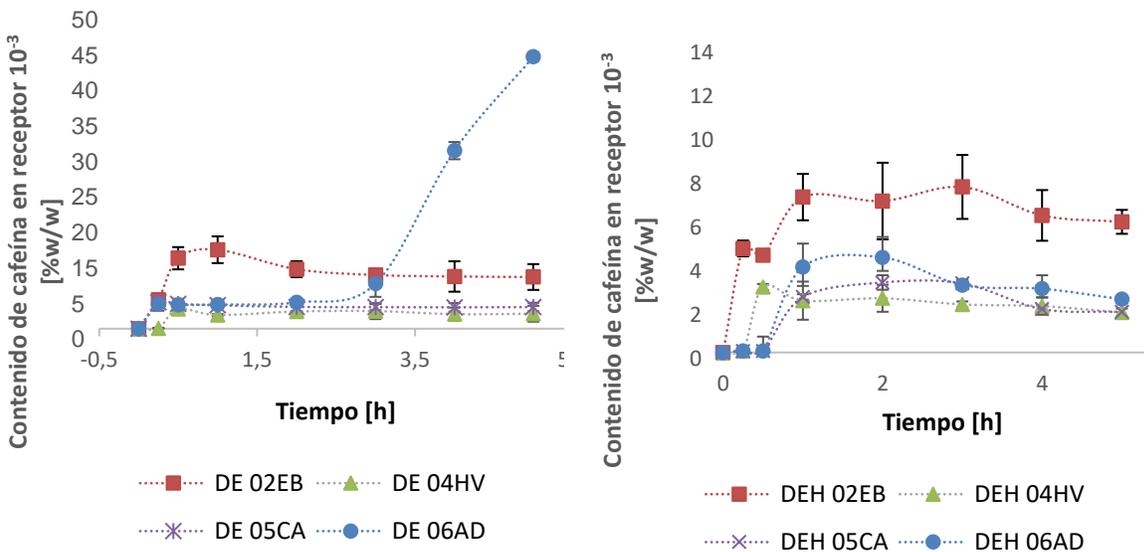
* En el eje secundario se encuentra la cantidad máxima para el gel 06AD en el ensayo con membrana DE para apreciar con mayor claridad los resultados de los demás productos.

Los resultados anteriores consideraron la concentración máxima de cafeína encontrada en el compartimiento dador para cada ensayo realizado, ya que, por efecto de dilución, al tomar una muestra y reemplazar el volumen retirado por medio fresco en el tiempo la cantidad de cafeína encontrada disminuye como se observa en la **Figura 4-27**. En el caso de los ensayos con membrana dermoepidérmica (**Figura 4-27 a.**), antes de la primera hora de ensayo la concentración de cafeína encontrada tiende a disminuir, excepto para el producto 06AD que presenta un aumento de concentración con la duración del ensayo obteniéndose una cantidad máxima al final. Por otro lado, para los ensayos con membrana que presenta tejido subcutáneo (**Figura 4-27 b.**) el tiempo en que se encuentra la concentración máxima se prolonga a la segunda hora para los productos 05CA y 06AD y a la tercera hora para el producto 02EB. Esto es coherente con el espesor de membrana que por ser mayor puede retrasar el tiempo en que se encuentra la concentración máxima, aunque, para el gel 04HV el tiempo de concentración máxima con ambas membranas es el mismo y equivalente a los primeros 30 minutos de ensayo. En general, el

comportamiento de los perfiles es similar para todos los productos evaluados con la membrana con tejido hipodérmico, y para la mayoría con la membrana dermoepidérmica. Las particularidades en los perfiles de cada gel pueden deberse a las características individuales y a las estrategias de penetración que pueda presentar cada producto y serán relacionadas más adelante en el presente documento.

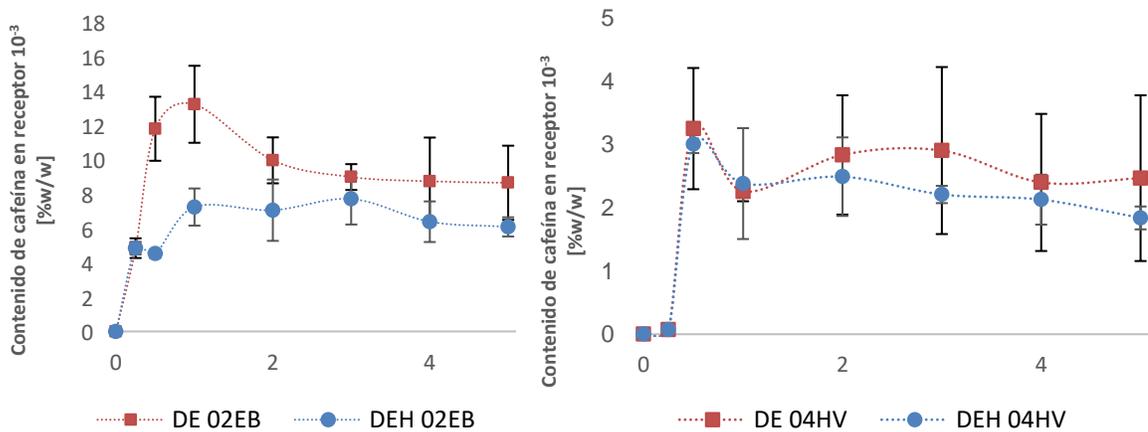
Al considerar la concentración inicial de cafeína que presenta cada producto se podría analizar lo siguiente. El gel 02EB que presenta un mayor contenido de cafeína, aunque evidencia un perfil que tiende a ser más alto que el de los demás, la concentración encontrada respecto a la dosis aplicada es en realidad baja e inferior, comparada con la de los otros productos; incluso, para los geles con contenido de cafeína similar, las concentraciones tienden a semejarse. No obstante, este hecho evidencia que entre más cafeína contenga el producto mayor será la concentración encontrada en el receptor por efecto del gradiente como también lo demostraron Mustapha et al. [56], quienes determinaron que para una misma dosis aplicada, el gel con una mayor concentración del analito presenta a su vez una mayor concentración depositada del mismo en el compartimiento receptor.

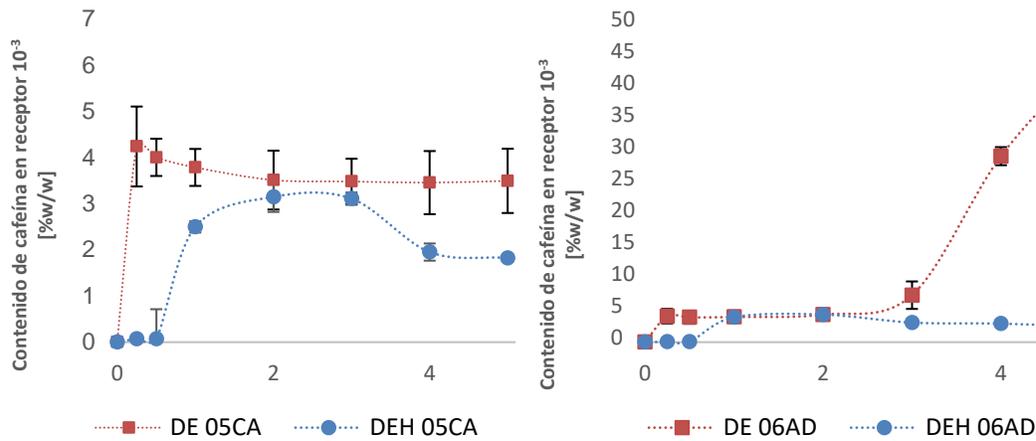
Figura 4-27: Perfil de permeación para los productos evaluados, concentración de cafeína encontrada en receptor [%w/w] respecto al tiempo del ensayo para, a) membrana dermoepidérmica (DE), b) membrana con tejido hipodérmico (DEH).



En la **Figura 4-28** se estudió el comportamiento de permeación de cada producto para los dos tipos de espesores evaluados. Cada gel presentó un comportamiento particular, aunque, la cantidad de cafeína encontrada en el compartimiento receptor fue siempre menor en los ensayos con la membrana hipodérmica. Sin embargo, al tener en cuenta las barras de error, la diferencia entre perfiles se minimiza, como es el caso del producto 04HV, en el que los perfiles aparentan tener una diferencia entre ellos, pero es contrarrestada por la desviación entre réplicas. Por otro lado, los productos 02EB y 05CA presentan un perfil diferenciado en las primeras dos horas del ensayo que tiende a semejarse con el tiempo de duración. Los perfiles del gel 06AD, como se mencionó anteriormente, presentan comportamientos diferentes: para la membrana epidérmica, un comportamiento que tiende a aumentar con el tiempo de duración y para la membrana con tejido graso un comportamiento opuesto, esta tendencia es única para este producto y demuestra que para ensayos paralelos con diferentes espesores de membrana la cafeína podría retenerse en esa capa adicional.

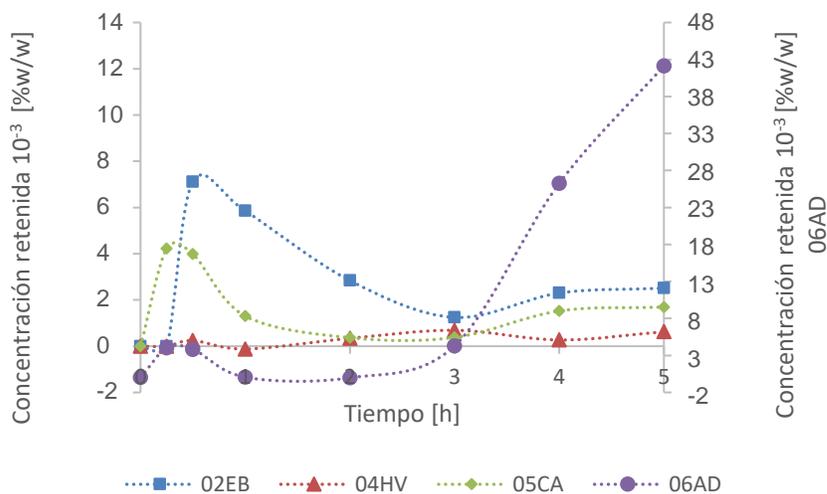
Figura 4-28: Perfil de permeación individual para cada producto evaluado en ensayos paralelos con dos espesores de membrana, membrana dermoepidérmica (DE) y membrana con tejido hipodérmico (DEH). a) 02EB, b) 04HV, c) 05CA y d) 06AD.





La cantidad encontrada en cada punto de muestreo en los ensayos paralelos con ambos espesores de membrana permite, por diferencia, determinar la cafeína que puede llegar a la hipodermis y la que al final del tiempo de ensayo podría retenerse en esta capa. Estas diferencias obtenidas para los cuatro productos evaluados se muestran en la **Figura 4-29**. Se encontró que la cantidad de cafeína que podría llegar a la capa hipodérmica para la mayoría de los geles es prácticamente insignificante respecto a la encontrada para el gel 06AD, el cual presenta una concentración máxima retenida al final del ensayo de 0,042 %w/w que equivale a más del 10% de la dosis aplicada. Así mismo, la concentración máxima de cafeína que puede alcanzar la hipodermis para los geles 02EB, 04HV y 05CA fue 0,0071; 0,0007 y 0,0042 en %w/w respectivamente, que equivale a menos del 0,3 % de la dosis aplicada encontrada antes de la tercera hora de ensayo. El hecho de encontrar cantidades máximas previas a la culminación del ensayo, permite afirmar que la cafeína que puede alcanzar la hipodermis no tiene la capacidad de permanecer en la capa en el tiempo. Además, teniendo en cuenta dichas concentraciones máximas que alcanzaron la hipodermis, se encontró que estos tres productos presentaron un contenido bajo respecto al 06AD, puesto que la concentración encontrada para éste es 6 veces la máxima encontrada para el 02EB, 10 veces la del 05CA y 60 veces la del 04HV.

Figura 4-29: Cafeína retenida en la capa hipodérmica para cada tiempo de muestreo de los productos evaluados en %w/w. En el eje secundario se encuentra la concentración de cafeína encontrada para el gel 06AD en la capa hipodérmica.



Resumiendo, el producto 06AD presentó la capacidad de depositar el 10 % de la dosis aplicada en la capa hipodérmica, y los demás productos menos del 0,3 %. El hecho anterior reafirma la capacidad que presenta este compuesto para atravesar la piel justificando su uso como activo de administración tópica. No obstante, la cantidad que ingresa depende del producto y las estrategias para lograr su correcta liberación y entrega en la piel, puesto que, el comportamiento de cada gel es particular e independiente del porcentaje presente en la formulación, como se demostró para los productos 02EB, 04HV y 05CA, para los cuales, a pesar de poseer una cantidad en fórmula mayor que el gel 06AD, el porcentaje de cafeína encontrada en la hipodermis fue inferior. Esto fue particularmente evidente para el producto 04HV, para el que la entrega a la capa objetivo fue la menos eficiente, encontrándose que en el compartimento dador se recuperó el 99 % de la dosis y en el compartimento receptor se obtuvo la misma cantidad de cafeína para ambos espesores, es decir que, la poca cafeína que logra permear no se retiene en la hipodermis.

Discutiendo en términos de eficacia, la concentración de cafeína máxima que fue encontrada en la capa hipodérmica para cada producto equivale a $0,1659\mu\text{g/mL}$ para el 02EB, $0,0161\mu\text{g/mL}$ para el 04HV, $0,0986\mu\text{g/mL}$ para el 05CA y $0,9831\mu\text{g/mL}$ para el gel 06AD, cantidades que pueden no ser adecuadas para lograr el resultado cosmético deseado. Para entender mejor el significado de estos valores de concentración determinados, a continuación, se relacionan varios estudios que han investigado la acción de la cafeína en células adiposas cultivadas. En primer lugar, Kong L. et al [99]

determinaron en ensayos *in vitro* en adipocitos cultivados y diferenciados por ocho días, es decir, adipocitos maduros, que el tratamiento por cuatro días de 160 µg/ml de cafeína en combinación con CGA (ácido clorogénico) redujo el contenido de triglicéridos y mejoró la actividad de la HSL (enzima reguladora de la lipólisis). Por otra parte, el estudio realizado por Sugiura S. et al. [47] trató adipocitos cultivados por 60h con 48 h de diferenciación, durante ocho días con 50 µg/mL y 100 µg/mL de cafeína combinada con catequinas, encontrando que el tratamiento combinado suprimió significativamente la acumulación de grasa intracelular en los adipocitos. La investigación realizada por Nakabayashi et al. [100] en adipocitos cultivados y diferenciados por ocho días determinó que la cafeína, suprimió la acumulación de lípidos intracelulares después de su diferenciación completa, redujo la cantidad de lípidos e inhibió la captación de glucosa estimulada por insulina, de forma dependiente de la dosis, de 49 a 194 µg/mL. Finalmente, el estudio realizado por Su S. et al. [101] determinó que la cafeína en baja concentración (19,4–58,2 µg/mL) puede inhibir eficazmente la adipogénesis de forma dependiente de la dosis, reducir el número de gotitas de lípidos y la expresión de genes adipogénicos, pero concentraciones más altas podría causar efectos citotóxicos. Teniendo en cuenta los estudios previos llevados a cabo con cultivos celulares de adipocitos, se estableció que la mínima concentración de cafeína probada que genera un efecto liporeductor por algún mecanismo es 19 µg/mL, por lo que, aunque la concentración encontrada para los productos evaluados en el presente trabajo no ha sido desafiada en cultivos celulares, la más alta que corresponde a la obtenida del gel 06AD, es 19 veces inferior, contemplando la posibilidad de que la cantidad de cafeína que logra permear de los productos evaluados sea muy baja para tener un resultado cosmético efectivo, pero esta premisa es necesario profundizarla.

Por otro lado, considerando el tema de seguridad, es necesario entender que, aunque es mínima, sí existe una cantidad de cafeína que pasa la membrana dermoepidérmica e incluso pasa la capa de tejido graso evaluada, lo que podría tener algunas implicaciones. En primera instancia, solo el hecho de pasar la dermoepidermis significa que existe la posibilidad de llegar a torrente sanguíneo, puesto que, a partir de la dermis, las capas profundas de la piel son altamente vascularizadas. Esto supone una ambigüedad respecto a nuestra legislación en materia de cosméticos, que indica que los ingredientes cosméticos no deben pasar a circulación sanguínea porque podrían generar efectos sistémicos o terapéuticos que van más allá de la definición de cosmético [5], [6], y efectivamente, la

cafeína como fármaco podría generar efectos sistémicos al tener la capacidad de estimular diferentes receptores del sistema nervioso. Por este motivo, se pone en tela de juicio este tipo de productos clasificados como cosméticos, puesto que considerando su objetivo de eficacia, podrían ser manejados dentro de otra categoría, como en efecto, es considerado en algunos países que los clasifican dentro de la categoría de medicamentos de venta libre [102]. Por otro lado, aunque la concentración encontrada en el presente estudio fue baja, investigaciones previas han determinado que dosis de cafeína superiores a 60 $\mu\text{g/mL}$ inducen la muerte celular de células madre [101], por lo que el tratamiento con altas concentraciones no se considera fisiológicamente aplicable al cuerpo humano; también se ha determinado que concentraciones plasmáticas por encima de 15 $\mu\text{g/mL}$ provocan leves efectos en el individuo [9], y concentraciones sanguíneas de alrededor de 80 $\mu\text{g/mL}$ causan efectos adversos [103]. De esta manera, considerando que una taza de café que contiene 150 mg de cafeína (expreso, latte y otras presentaciones de Starbucks [9][8]) puede representar una concentración de cafeína de alrededor de 19 $\mu\text{g/mL}$ y que el consumo diario de más de 300 mg de cafeína a través del café puede exceder los 60 $\mu\text{g/mL}$ [101], sumado a nuestra cultura de alto consumo de café, se estaría frente a una exposición de cafeína desde múltiples fuentes (alimentos, bebidas y productos cosméticos). Este hecho, presenta una preocupación de seguridad para los productos cosméticos que contienen cafeína, considerando que en productos como los evaluados, ésta logra atravesar la barrera cutánea y podría contribuir al aumento de las concentraciones plasmáticas, por lo que se resalta que, es quizá necesario que las casas cosméticas compartan mayor información con los consumidores al respecto de este componente de forma que ellos puedan tomar mejores decisiones, pensando sobre todo en consumidores que son susceptibles a la cafeína.

4.3 Relación entre el comportamiento de permeación y las propiedades del vehículo

A pesar de que los productos evaluados presentan una base de ingredientes similar conformada por agua, carbómero y TEA, cada producto posee propiedades fisicoquímicas particulares que pueden afectar la permeación del activo, de esta forma, se estableció una relación entre las propiedades estudiadas y la cantidad de cafeína que fue encontrada en el compartimiento receptor en los ensayos en celdas de difusión. Se aclara que, a lo largo del documento se fue construyendo una relación entre las características determinadas

por lo que no es necesario redundar entre aquellas que se complementan. Así mismo, se evidenció que el aspecto más importante para la permeación de la cafeína desde la matriz cosmética es la interacción del vehículo con la piel, ya que como se encontró en los ensayos de liberación con membrana sintética, los cuatro productos lograron una liberación de casi el 100 % de la cafeína encontrada en la fórmula en un corto periodo de tiempo (antes de la primera hora de ensayo).

De esta manera, se estableció una relación entre el valor de pH de cada producto y el comportamiento de permeación de la cafeína. De acuerdo con los resultados el gel 06AD es el producto más alcalino con un pH de alrededor de 8, seguido por el 05CA, el 04HV y finalmente el 02EB que es el más ácido y cuyo valor es cercano a 6. La superficie de la piel presenta un pH ácido y a valores de pH alcalinos su permeabilidad aumenta [13]. En este sentido, la aplicación de sustancias con valores de pH superiores al de la superficie de la piel tienden a alterar la barrera cutánea provocando un aumento de permeabilidad por lo que es posible relacionar el valor de pH del producto con el comportamiento de permeación de la cafeína. En efecto, el orden de alcalinidad de los productos corresponde con el porcentaje de cafeína permeada respecto de la dosis aplicada, siendo para el gel 06AD mayor, seguido por el 05CA, el 04HV y por último el 02EB. De esta manera, se encontró una relación directamente proporcional del pH del producto con respecto a la cantidad de cafeína permeada. Lo anterior puede deberse no solo a la compatibilidad entre la piel y el producto, sino al estado de disociación de la cafeína (pK_a 14,5). Esta, es una molécula ligeramente básica que presenta mayor proporción de especie disociada cuando el pH de la matriz que la contiene es menor que su pK_a . No obstante, a pH más alcalino, la proporción de la especie no disociada es mayor, y, cuanto más se encuentra en forma no disociada más probable es que sea soluble en lípidos [104], por lo que tiene más facilidad de interactuar con la matriz lipídica del estrato córneo y presentar una mejor permeabilidad. En efecto, como se determinó en los ensayos, los productos con pH más alcalino, es decir, con menor proporción de especie disociada presentaron una mayor permeabilidad.

La evaluación del comportamiento reológico permitió establecer algunas relaciones entre el comportamiento de permeación y el vehículo. En primera instancia, el conjunto de propiedades reológicas de los productos indicó que el gel 05CA es quien presenta una

mayor viscosidad, un comportamiento de módulos y extensibilidad que podría indicar una mayor consistencia y una probable mayor concentración de polímero que los demás productos evaluados en los ensayos de difusión. A su vez, el perfil reológico para el producto 04HV y el 06AD fue similar, presentando el gel 04HV una posible mayor rigidez dado el comportamiento del módulo de almacenamiento y valores ligeramente mayores en cuanto a viscosidad, con una menor pérdida de la misma con el esfuerzo. Finalmente, el producto 02EB presenta propiedades marcadamente diferentes, siendo el que posee una menor viscosidad y una pérdida más rápida de la misma con el esfuerzo, módulos más bajos, una mayor extensibilidad y menor consistencia, y una probable estructura menos rígida con menor concentración de polímero. Ahora bien, respecto al comportamiento de permeación, se considera que la reología de la formulación influye en la exposición local del compuesto en el sitio requerido, presentando una mejor disposición del compuesto a menor viscosidad, ya que un vehículo con menor contenido de agente gelificante permite que los compuestos en la red se encuentren más disponibles para su deposición en la superficie cutánea. A su vez, una viscosidad más alta retarda la penetración en la piel puesto que implica una resistencia a la difusión, en este caso, el coeficiente de difusión es más bajo y por tanto la permeación se hace menor [105]. En este sentido, los productos 05AC y 04HV que presentaron tanto una mayor viscosidad como un mayor módulo de almacenamiento, presentaron un pobre comportamiento de permeación. Por otro lado, aunque el producto 02EB presentó la menor viscosidad, su capacidad de entrega de la cafeína fue inferior al del gel 06AD cuya viscosidad es más alta, por lo que podrían considerarse otros aspectos como el tipo de forma cosmética del producto y su adherencia. En primer lugar, se considera la forma cosmética del producto 02EB que como se ha descrito antes, es de emulgel, por lo que por su composición puede ser posible que parte de la cafeína en la fase acuosa sufra un reparto con la fase oleosa, a pesar de que el valor es bajo ($\log P: -0,07$). Esto retardaría la salida de la cafeína del producto afectando su permeación, lo que fue evidenciado en su comportamiento de liberación cuyo perfil presentó una menor pendiente, siendo más lento que el de los otros productos. A su vez, se esperaría que una mejor adherencia a la superficie cutánea permitiera que la cafeína se encontrara más disponible en la piel para su absorción [53]; en este contexto, todos los geles presentaron una capacidad de adherencia similar excepto el producto 02EB contribuyendo a explicar el bajo comportamiento de permeación por parte del producto.

Adicionalmente, los productos 02EB y 04HV fueron unos de los percibidos con menor capacidad de *absorción*, entendida como la persistencia del producto sobre la piel después de la aplicación, por parte de los encuestados en la evaluación sensorial, mientras que el gel 06AD fue posicionado como uno de los productos de más rápida absorción y el 05CA con absorción intermedia. Esta implicación permitió señalar que podría también existir una relación entre la percepción del usuario en la aplicación del producto respecto al comportamiento de permeación, correspondiendo con los resultados obtenidos; se podría suponer una correlación directa, ya que el gel con mayor capacidad de *absorción* fue aquel también con mayor capacidad de permeación, lo que estuvo conforme a su vez con los demás productos, siendo el 05CA el de *absorción* y permeación intermedia, y los otros dos con los comportamientos más bajos.

Los ensayos de microscopía electrónica de barrido permitieron establecer el tipo de microestructura presentada en los productos evaluados, encontrando que los productos 02EB y 04HV presentaron una estructura fibrosa característica de productos con bajo contenido de carbómero, mientras que los productos 05CA y 06AD presentaron una estructura cavernosa que puede asociarse con una mayor disponibilidad de los compuestos hidrofílicos sobre la superficie. En este sentido, los ensayos de permeación confirmaron la hipótesis planteada, puesto que los productos con estructuras del tipo fibrosa presentaron una pobre permeación, mientras que aquellos con estructura tipo cavernosa o panal presentaron una mayor cantidad de cafeína en el compartimiento receptor respecto a la dosis aplicada. En efecto, el producto 06AD que exhibió este último tipo de estructura más definida y con poros más formados, fue el que presentó una mayor capacidad de permeación del compuesto.

Finalmente, resaltando los ingredientes propios de cada producto, se extrajo del etiquetado, que tanto el producto 06AD como el 04HV presenta tres ingredientes considerados promotores de la penetración, el alcohol, la glicerina y el alcohol bencílico. A su vez, el producto 05CA contiene alcohol, glicerina y propilenglicol y el 02EB presenta propilenglicol, alcohol y alcohol bencílico. El producto 06AD presenta alrededor de 16 ingredientes, mientras que el 05AC menos de 15, el 04HV poco más de 20 y el 02EB alrededor de 30. Dado que no se conoce su concentración exacta en cada formulación, se puede suponer que la combinación de promotores y otros ingredientes para el gel 06AD

es mucho más efectiva que para los otros productos. Esto podría redundar en una mayor capacidad de permeación, ya que, a pesar de que el gel 04HV presenta los mismos solventes que el 06AD, el comportamiento de permeación fue el más bajo de todos los productos evaluados. Este resultado podría deberse también, a que el contenido de estos promotores fuera inferior considerando la complejidad de la formulación, ya que, al presentar un número mayor de ingredientes podría disminuir el porcentaje de los otros compuestos; adicionalmente, las interacciones entre ingredientes podrían ser mayores entre más numerosos sean, por lo que, conforme con los resultados obtenidos, las formulaciones con mayor número de ingredientes presentaron una permeación del activo más baja, mientras que para las formulaciones más simples, el contenido de cafeína encontrado respecto a la dosis aplicada es mayor.

Como producto de la discusión del presente trabajo se resalta la importancia de llevar a cabo un enfoque sistemático de diseño del producto cosmético. Cada etapa del desarrollo del producto es crucial e impacta directamente en la calidad del mismo. Un buen estudio de preformulación puede ser la clave que permita entender las interacciones entre los componentes y las propiedades del vehículo. De esta manera, se espera que en la etapa de formulación se llegue a una composición que permita que el ingrediente funcional alcance la capa objetivo a pesar de su concentración en la fórmula, como se pudo observar en los productos evaluados en el presente estudio, en donde el gel con concentración inferior de los cuatro evaluados fue aquel que presentó un mejor comportamiento de permeación y entrega del compuesto activo. Así mismo, se resalta la importancia de emplear herramientas que permitan analizar la calidad y el desempeño del producto como son los estudios *in vitro*, que deberían ser el primer paso para definir si este cumple con el propósito para el que fue diseñado, y si es seguro para su aplicación en humanos, complementando la información científica que pueda recopilarse sobre el activo y avalando la futura aplicación de estudios clínicos. Estos resultados también demuestran la importancia de los programas de cosmetovigilancia, de forma que se implementen acciones que aseguren la confiabilidad de los productos cosméticos que se comercializan, puesto que se encontró que, de los siete productos seleccionados, tres no mostraron un contenido apreciable del ingrediente funcional, uno presentó inconvenientes en la homogeneidad del lote, y los cuatro que fueron evaluados en ensayos de permeación, demostraron por un lado, que la cafeína podría encontrarse en el fluido sistémico y por

otro, que lo que realmente alcanzaría la capa hipodérmica, podría no ser suficiente para generar un efecto cosmético.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se estableció un método de extracción de cafeína de matrices cosméticas tipo gel y emulgel validado junto con la metodología de cuantificación analítica que demostró ser selectivo, preciso, exacto, lineal en el rango de concentraciones de 0,5 a 50,0 $\mu\text{g/mL}$, que permitió obtener un porcentaje de recuperación del 95 al 105% de la cafeína presente en una matriz cosmética compleja y proteger la integridad del sistema cromatográfico. A través de este método, se encontró que tres de los siete productos comerciales seleccionados presentaron un contenido de cafeína inferior al 0,009 %w/w uno de los cuales presentó un contenido inconsistente que finalmente fue nulo, tres presentaron contenido que oscila entre los 0,39 y 0,45 %w/w y otro alcanzó un porcentaje cercano al 3 %w/w.

Producto de la caracterización se encontró que los productos comerciales manejan un rango de pH de ~ 5 a ~ 8 que es un poco más amplio del que presenta la piel siendo el producto 06AD el de pH más alcalino. A su vez, todos mostraron un comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento propio de los fluidos viscoelásticos con un módulo de pérdida mayor al módulo de almacenamiento. Presentaron perfiles de flujo ligeramente diferentes y valores de viscosidad que variaron entre los 4000 y 30000 cPs, lo que puede relacionarse probablemente con el contenido de agente gelificante que podrían presentar, siendo mayor para los productos 05CA, 03NA y 01AZ y menor para el producto 02EB. En cuanto a la percepción sensorial de las personas encuestadas, esta fue similar y evidente en atributos como *consistencia*, *transparencia* y *viscosidad* cuyos resultados se encuentran conforme con los de la caracterización, estableciendo que el 02EB fue el gel que careció de intensidad en los atributos mencionados. La microestructura de los cuatro productos evaluados 02EB, 04HV, 05CA y 06AD presentó principalmente dos conformaciones diferentes, la primera del tipo fibrosa, relacionada con una baja concentración de polímero

y la segunda cavernosa que podría presentar una mayor disponibilidad de ingredientes hidrofílicos en los espacios de la red. Las propiedades relacionadas anteriormente evidenciaron que a pesar de que los productos contienen ingredientes en común, el vehículo que porta el ingrediente funcional es particular y puede influir directamente en el comportamiento de permeación.

Se establecieron y estandarizaron las condiciones para llevar a cabo los ensayos en celdas de difusión teniendo en cuenta las particularidades del presente estudio. A través de estos ensayos, se determinó que la aplicación tópica de los productos cosméticos tipo gel y emulgel evaluados conduce a la liberación y permeación de la cafeína y a su aparición en el fluido sistémico, lo que contradice la definición de producto cosmético de acuerdo con la legislación nacional. Se estableció que los productos tienen la capacidad de liberar la cafeína contenida antes de la primera hora de estudio. En general los productos presentaron una permeación de cafeína baja respecto a la dosis aplicada, siendo inferior al 1 %, excepto para el gel 06AD que presentó la capacidad de depositar el 10 % de la dosis suministrada en la capa hipodérmica.

Se estableció que para el gel 06AD la cafeína que logra permear se mantiene en su mayoría en la capa hipodérmica, mientras que para los demás productos no se retiene en el tiempo, a pesar del carácter hidrofílico de la misma. No obstante, la cafeína que llega a la capa hipodérmica es baja en comparación con la concentración que se ha estudiado en la bibliografía que puede causar un efecto sobre las células adiposas, por lo que se desconoce si la concentración encontrada puede generar el efecto cosmético deseado.

Se determinó una relación directa entre la concentración de cafeína presente en el producto y la que es encontrada en el compartimiento receptor. Aunque, los resultados sugieren que el vehículo y las estrategias de penetración influyen más que la concentración inicial en el producto puesto que se obtuvo que, de los productos evaluados, aquel con menor contenido de cafeína (06AD) alcanzó una mayor permeación y retención en la hipodermis que el de mayor concentración.

Se estableció una relación entre las características del vehículo y el comportamiento de permeación que fue evidenciado en la discusión y mostró que para el producto 06AD en conjunto, su pH más alcalino, su comportamiento reológico menos viscoso, con mayor

adherencia y buena extensibilidad, sus componentes y su microestructura cavernosa, logran que sea un vehículo adecuado para que la cafeína ingrese a la capa objetivo.

Se evidencia que el vehículo efectivamente influye en la cantidad de material penetrado y aquel que puede ser entregado a la capa objetivo, puesto que a pesar de que los productos presentan ingredientes de base comunes como carbómero, agua y promotores de la penetración, la permeación es particular para cada formulación y a como ésta es estructurada.

En términos de eficacia, tres de los siete productos no contienen el mínimo de cafeína apreciable que pueda lograr una permeación; uno de estos productos no logra que la cafeína se retenga en la capa de tejido graso evaluado y para los demás productos, las concentraciones de cafeína halladas en hipodermis fueron bajas y aún no desafiadas en cultivos celulares para indicar que puedan cumplir su acción lipolítica, por lo se pone en duda la eficacia de estos productos.

El planteamiento de que la cafeína podría alcanzar el torrente sanguíneo establece que estos productos deberían cuestionarse un poco más, ya que no están cumpliendo con la definición de cosmético al permitir que sus ingredientes permeen a circulación sistémica generando una alerta de seguridad.

El presente estudio resalta la importancia de un programa de cosmetovigilancia, puesto que la información generada conduce a que, se ponga en evidencia que los productos comercializados (evaluados en este estudio), pueden no contener la cantidad de ingrediente funcional suficiente o no estar estructurados de manera adecuada para cumplir con su eficacia dentro de lo que se proclama en el producto, y a su vez, existe la preocupación de que este tipo de productos cosméticos facilite que la cafeína ingrese al torrente sanguíneo, contribuyendo al aumento de la concentración en sangre que una persona puede presentar, dada la cultura nacional de consumo de café y a la exposición de múltiples fuentes alimenticias y farmacéuticas. Sería importante reevaluar, por parte del ente regulador, si estos productos de acción en capa profunda deberían considerarse como cosméticos y, fortalecer los programas de cosmetovigilancia con el fin de proteger la integridad del consumidor a quien se le debe la veracidad de las proclamas y la certeza de que el producto es seguro bajo esta definición normativa de cosmético.

5.2 Recomendaciones

Como se ha descrito, en el presente trabajo se estudiaron en ensayos de permeación, algunos productos comercializados en el territorio nacional que presentan proclamas que prometen beneficios sobre la acumulación de grasa localizada. Se estableció una aplicación de producto bajo dosis finita considerando las condiciones de uso, sin embargo, dado que algunos productos sugieren en sus etiquetas el empleo de 'masaje' como complemento a la aplicación, se considera adecuado implementar y estudiar el efecto de este masaje y su influencia en la permeación del ingrediente funcional, de manera que se asemeje más a la aplicación real del producto sobre la piel.

Así mismo, podría ser adecuado ampliar la duración del ensayo de permeación ya que como se observó, uno de los productos logró obtener un perfil que aumentó con el tiempo, por lo que podría esperarse encontrar una concentración de cafeína mayor para productos como éste en el caso de que se prolongue el ensayo.

Es importante realizar un ensayo *in vitro*, en el que se evalúe en células adiposas el efecto de la concentración de cafeína encontrada en la capa de tejido hipodérmico, de forma que se establezca la influencia que esta dosis podría ejercer sobre la acumulación de grasa, determinando si el producto podría llegar a generar el efecto cosmético deseado.

Finalmente, con miras a fortalecer la cosmetovigilancia, se recomienda realizar un análisis sobre la factibilidad del uso de este tipo de herramientas *in vitro*, que podrían ser empleadas para determinar información sobre la posible aparición en sangre de ingredientes cosméticos en productos comerciales, y determinar si éstos pueden alcanzar la capa de la piel sobre la que se promete ejercer la acción cosmética.

A. Anexo A: Prueba de percepción sensorial

A continuación, se encuentra el modelo de prueba de percepción sensorial aplicado a los potenciales consumidores.

Prueba análisis sensorial tipo ranking - Sesión I

Gracias por su participación en la prueba. Por favor lea con detenimiento las instrucciones. Si tiene alguna duda puede consultar con el encargado si está presente o comunicarse al WhatsApp 3105851014. Se recomienda tener manos y brazos limpios e idealmente libres de algún producto que pueda interferir con la evaluación.

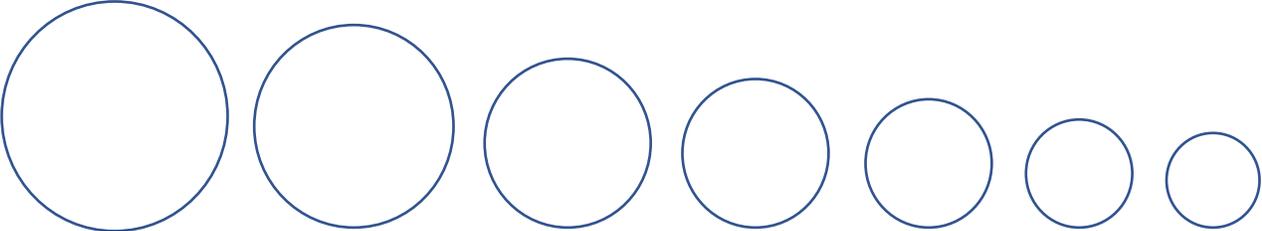
Esta prueba consiste en organizar las muestras de acuerdo con el grado de intensidad de percepción del atributo. Usted debe posicionar las muestras por la intensidad del atributo a evaluar, teniendo en cuenta que la mayor intensidad corresponde a la posición 1 y la menor intensidad corresponde a la posición 7 del atributo evaluado. La prueba se divide en 2 sesiones, en cada parte se evaluarán 3 atributos para las 7 muestras. Todas las muestras deben ser clasificadas en orden de intensidad escribiendo el número de la muestra en los círculos. La prueba tiene una duración estimada de 15 minutos por sesión.

Se incluyen imágenes ejemplo que pueden ser usadas como una referencia facilitando la ubicación de las muestras en la escala. Se incluyen también definiciones de los atributos que pueden ser una guía, recuerde que ninguna respuesta es errada y usted puede dejarse guiar por su propia definición y percepción. En esta sesión se evalúan los atributos, Consistencia, Transparencia y Pegajosidad.

Por favor llene los datos solicitados al final de la evaluación. Si tiene algún comentario puede escribirlo al final de la hoja.

ATRIBUTO 1: Por favor escriba los códigos de las muestras en orden decreciente de **CONSISTENCIA**. La consistencia es el atributo mecánico relacionado con la reacción del producto al esfuerzo y es percibido por la sensación al presionar. Calidad de la materia que resiste sin romperse ni deformarse fácilmente

1 2 3 4 5 6 7



La más consistente La menos consistente

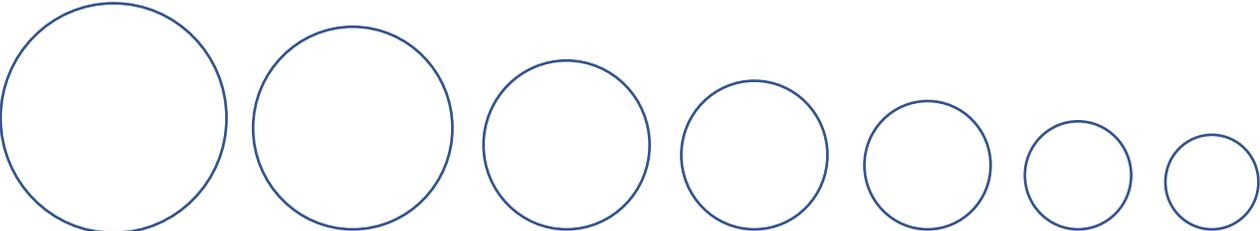



A la crema dental se le asocia una buena consistencia

Una consistencia baja puede percibirse en la leche condensada

ATRIBUTO 2: Por favor escriba los códigos de las muestras en orden decreciente de **TRANSPARENCIA**. Un producto transparente es aquel que permite que la luz pase y aparezcan imágenes nítidas y, uno opaco, no permite el paso de la luz.

1 2 3 4 5 6 7



Transparente

Opaco



El vidrio puede considerarse como un material transparente



el aluminio es un material opaco

ATRIBUTO 3: Por favor escriba los códigos de las muestras en orden decreciente de **PEGAJOSIDAD**. La pegajosidad es el grado en que los dedos se adhieren al producto. Cantidad de adhesividad, fuerza requerida para separar la muestra adherida en los dedos.

1

2

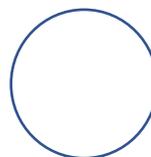
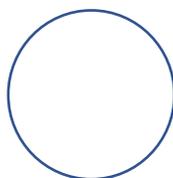
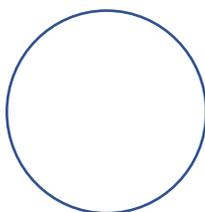
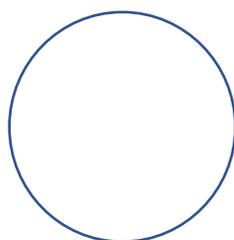
3

4

5

6

7



La más pegajosa

La menos pegajosa



La vaselina puede considerarse de alta pegajosidad.



El agua no se considera pegajosa

NOMBRE: _____

EDAD: _____

SEXO: _____

COMENTARIOS: _____

Prueba análisis sensorial tipo ranking - Sesión II

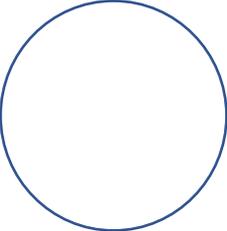
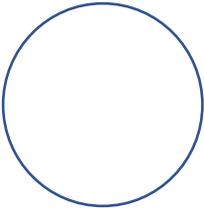
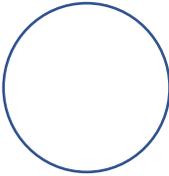
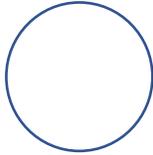
Gracias por su participación en la prueba. Por favor lea con detenimiento las instrucciones. Si tiene alguna duda puede consultar con el encargado si está presente o comunicarse al WhatsApp 3105851014. Se recomienda tener manos y brazos limpios e idealmente libres de algún producto que pueda interferir con la evaluación.

Esta prueba consiste en organizar las muestras de acuerdo con el grado de intensidad de percepción del atributo. Usted debe posicionar las muestras por la intensidad del atributo a evaluar, teniendo en cuenta que la mayor intensidad corresponde a la posición 1 y la menor intensidad corresponde a la posición 7 del atributo evaluado. La prueba se divide en 2 sesiones, en cada parte se evaluarán 3 atributos para las 7 muestras. Todas las muestras deben ser clasificadas en orden de intensidad escribiendo el número de la muestra en los círculos. La prueba tiene una duración estimada de 15 minutos por sesión.

Se incluyen imágenes ejemplo que pueden ser usadas como una referencia facilitando la ubicación de las muestras en la escala. Se incluyen también definiciones de los atributos que pueden ser una guía, recuerde que ninguna respuesta es errada y usted puede dejarse guiar por su propia definición y percepción. En esta sesión se evalúan los atributos, Viscosidad, Absorción y Esparcibilidad.

Por favor llene los datos solicitados al final de la evaluación. Si tiene algún comentario puede escribirlo al final de la hoja.

ATRIBUTO 1: Por favor escriba los códigos de las muestras en orden decreciente de **VISCOSIDAD**. La viscosidad es un atributo mecánico de textura, relacionado con la resistencia a fluir. Corresponde a la fuerza requerida para esparcir un líquido sobre un sustrato.

1	2	3	4	5	6	7
						
La más viscosa						La menos viscosa

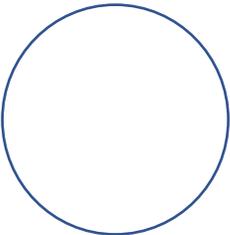
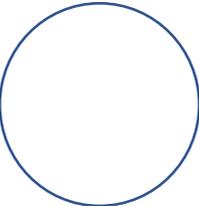
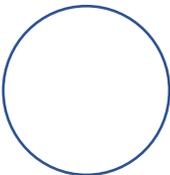
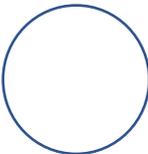


La miel puede considerarse un producto viscoso

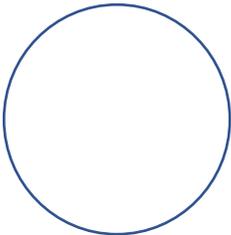
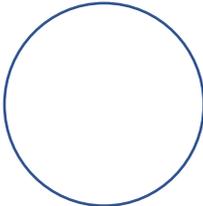
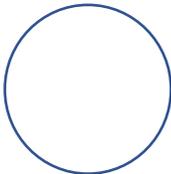
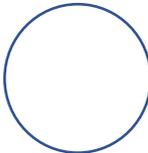


Una baja viscosidad se puede percibir en el agua

ATRIBUTO 2: Por favor escriba los códigos de las muestras en orden decreciente de **ABSORCIÓN**. La absorción o absorbencia es la persistencia del producto sobre la piel después de la aplicación.

1	2	3	4	5	6	7
						
La de más rápida absorción			La de absorción más lenta			

ATRIBUTO 3: Por favor escriba los códigos de las muestras en orden decreciente de **ESPARCIBILIDAD**. La esparcibilidad es la facilidad con la que se puede manipular el producto en la superficie del antebrazo.

1	2	3	4	5	6	7
						
Se esparce más fácil			Se esparce con mayor dificultad			



La crema chantilly se esparce fácilmente



El dulce de leche se esparce con mayor dificultad

NOMBRE: _____

EDAD: _____

SEXO: _____

COMENTARIOS: _____

B. Anexo B: Formulaciones de geles fabricados en el laboratorio

- **Formulación para el gel base utilizado en el desarrollo del método de extracción**

La **Tabla B-1** muestra la fórmula del gel de prueba preparado en el laboratorio. Se hace la salvedad, que este gel fue utilizado para el desarrollo del procedimiento de extracción y como comparador de los ensayos de caracterización. Es un gel independiente de los preparados para la validación que mantiene los mismos ingredientes, pero contiene 0,5% de cafeína. A su vez, fue realizado un gel blanco que no posee cafeína.

Tabla B-1: Fórmula gel de prueba utilizado en el desarrollo del método de extracción

Fase	Ingrediente	%
A	Agua	43,11
	Carbómero	0,5
	Glicerina	4
B	Agua	43,11
	cafeína	0,5
	PG	2
	Alcohol	5
	M.paraben	0,15
	P.paraben	0,05
	Mentol	0,03
C	PEG 40 aceite de ricino hidrogenado	0,6
	BHT	0,05
D	Extracto de alga fucus	0,05
	Extracto de centella asiática	0,05
	Extracto de hiedra	0,05
	TEA	0,75
	Total	100

- **Formulación del gel base desarrollado para la validación de la metodología de extracción.**

Tabla B-2: Fórmula, pesos y porcentaje [%w/w] final para los tres geles madre empleados en la validación de la metodología de extracción y cuantificación analítica.

Fase	Fórmula base gel		Peso real [g]			Recalculado [%w/w]			
	%	g	SM1	SM2	SM3	SM1	SM2	SM3	
A	agua	43,27	86,54	86,53	86,56	86,55	43,2263	43,2630	43,2537
	carbómero	0,5	1	1	1	1	0,4996	0,4998	0,4998
	Glicerina	4	8	8,003	8,0032	8,0009	3,9979	4,0000	3,9985
B	Agua	43,27	86,54	86,57	86,52	86,57	43,2463	43,2430	43,2637
	cafeína	0,18	0,36	0,3602	0,3602	0,3602	0,1799	0,1800	0,1800
	PG	2	4	4,022	4,0285	4,0199	2,0092	2,0135	2,0090
	alcohol	5	10	10,0036	10,0115	10,0049	4,9973	5,0038	5,0000
	M.parabeno	0,15	0,3	0,3003	0,3004	0,3004	0,1500	0,1501	0,1501
	P.parabeno	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0500	0,0500	0,0500
	mentol	0,03	0,06	0,06	0,0604	0,0601	0,0300	0,0302	0,0300
	PEG40	0,6	1,2	1,2009	1,2002	1,201	0,5999	0,5999	0,6002
C	BHT	0,05	0,1	0,102	0,1003	0,101	0,0510	0,0501	0,0505
	Extracto de alga fucus	0,05	0,1	0,12	0,11	0,1	0,0599	0,0550	0,0500
D	Extracto de centella asiática	0,05	0,1	0,15	0,11	0,11	0,0749	0,0550	0,0550
	Extracto de hiedra	0,05	0,1	0,16	0,12	0,12	0,0799	0,0600	0,0600
	TEA	0,75	1,5	1,497	1,4939	1,4999	0,7478	0,7467	0,7496
	total	100	200	200,179	200,0786	200,0983	100,0000	100,0000	100,0000

C. Anexo C: Datos asociados a la extracción de cafeína de los productos

- Datos correspondientes a la validación de la cuantificación de cafeína extraída de matrices cosméticas tipo gel y emulgel.

Tabla C-1 Respuesta instrumental para la curva de calibración preliminar utilizada en el desarrollo del método de extracción de cafeína.

Concentración (µg/ml)	Área
0,5	13358
0,5	11951
10,0	239184
10,0	252446
20,0	511710
20,0	486830
30,0	782345
30,0	758545
40,0	1007268
40,0	1009991
50,0	1305300
50,0	1292642

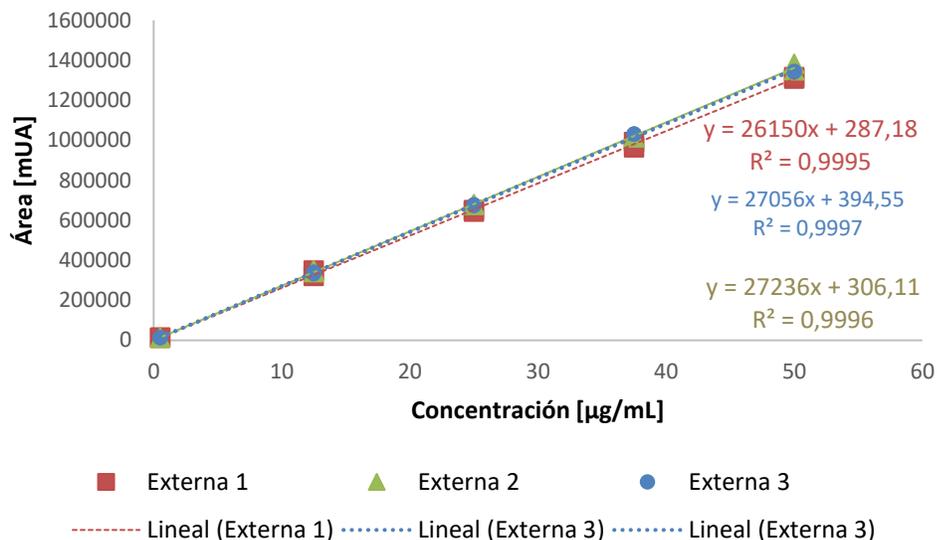
Tabla C-2: Respuesta instrumental obtenida mediante el software LCsolution® para la evaluación de linealidad del sistema y el método.

C µg/mL	Réplica	Área sistema	Área método
0,5	1	13651	13250
	2	15698	13687
	3	13550	13728

12,5	1	329583	338448
	2	319238	336093
	3	323211	338284
25	1	640170	674433
	2	657662	679388
	3	657758	674396
37,5	1	963171	1023616
	2	1014495	1005221
	3	961382	1006980
50	1	1355655	1335115
	2	1331029	1355681
	3	1299943	1348788

Tabla C-3: Respuesta instrumental de la evaluación de precisión intermedia

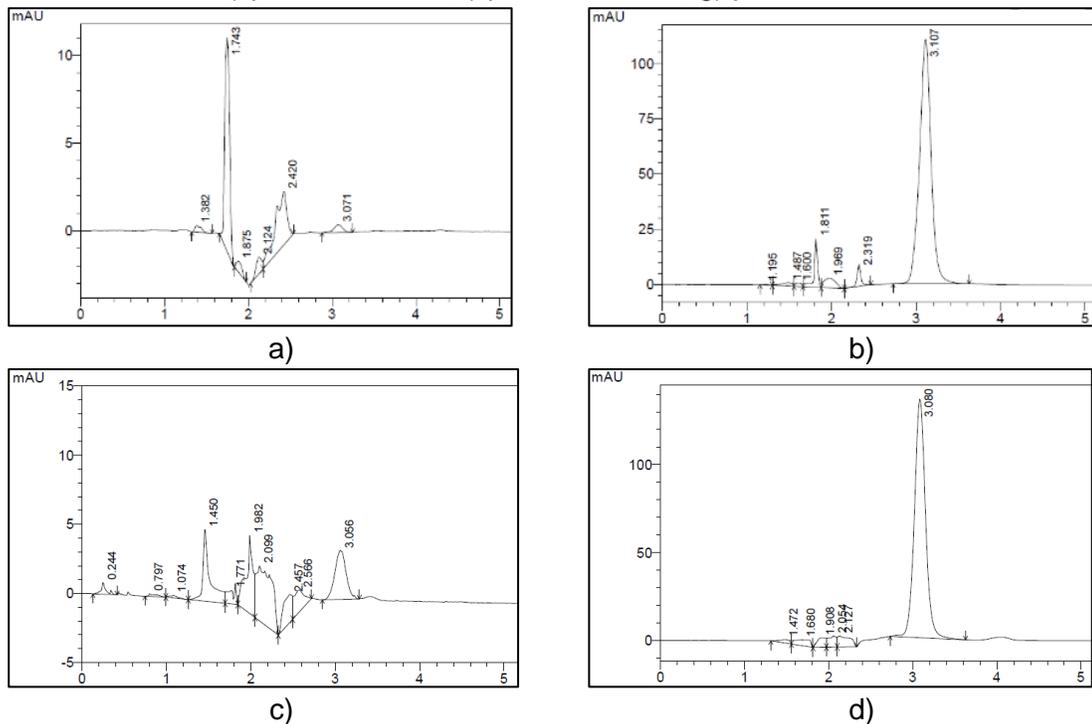
Analista	Concentración [$\mu\text{g/ml}$]	Área bajo la curva			
		Repetición	DIA 1	DIA 2	DIA 3
A	0,5	1	13250	13237	13772
		2	13687	13760	14153
		3	13728	13458	14216
	25	1	674433	674723	682016
		2	679388	682884	681157
		3	674396	675106	677293
	50	1	1335115	1312899	1361694
		2	1355681	1346421	1346421
		3	1348788	1352657	1359357
B	0,5	1	13986	13637	13519
		2	13781	13670	13863
		3	13584	14185	13381
	25	1	679397	679397	676755
		2	679819	679819	665579
		3	679083	679083	677181
	50	1	1351853	1351853	1356452
		2	1354269	1354269	1356907
		3	1347097	1347097	1359871

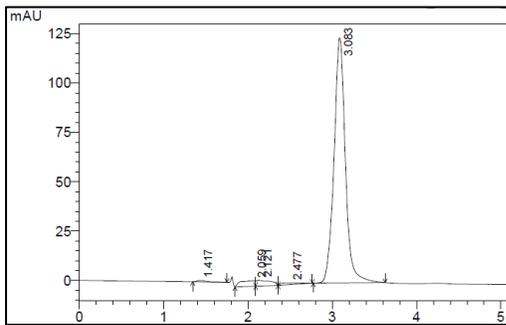
Figura C-1: Curvas externas para calcular porcentaje de recuperación

- **Extracción de cafeína de los productos comerciales**

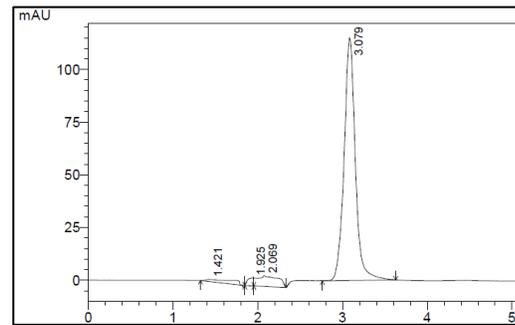
A continuación, se presentan los cromatogramas representativos de la cuantificación de la cafeína extraída por el método desarrollado para cada producto comercial.

Figura C-2: Cromatograma representativo de la extracción de cafeína de los productos comerciales a) producto 01AZ; b) producto 02EB; c) producto 03NA; d) producto 04HV; e) producto 05CA; f) producto 01AD; g) producto 01AR

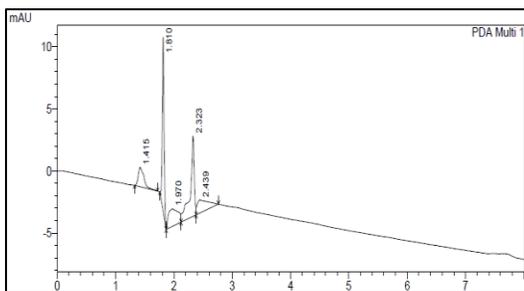




e)



f)



g)

D. Anexo D: Validación del método de cuantificación para los ensayos de difusión.

Para obtener los parámetros de validación se prepararon muestras del analito disuelto en el medio receptor y en el medio en el que fue sometido a condiciones de ensayo con tejido cutáneo denominado 'extracto de piel'. A continuación, se describe el detalle de los resultados para cada parámetro evaluado.

- **Análisis previo**

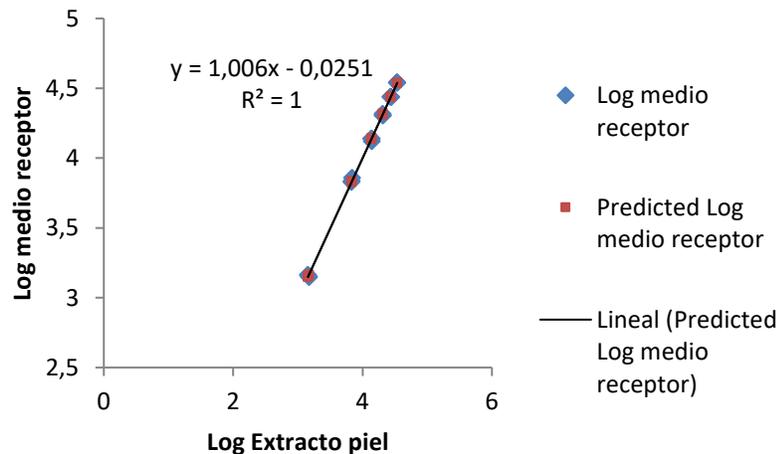
Se comparó la respuesta instrumental (**Tabla D-1**) obtenida para seis niveles y tres réplicas preparados con extracto de piel y con medio receptor fresco a través del análisis de homocedasticidad y normalidad en el software Excel Microsoft Office 2020®, en el que se obtuvo cumplimiento en ambos parámetros para la transformación logarítmica de los datos con una pendiente cercana a la unidad y un intercepto no diferente de cero (**Figura D-1**), demostrando que no hay diferencia entre las variables evaluadas.

Tabla D-1: Respuesta instrumental para la curva de análisis previo de la validación de los ensayos en celdas de difusión que compara la cafeína disuelta en medio receptor y la cafeína disuelta en extracto de piel.

nivel	Medio receptor	Extracto de piel
0,05	1439	1467
	1405	1490
	1458	1430
0,25	6776	6775
	6882	6803
	7229	6926
0,5	13269	13890
	13789	13697
	13778	13951
0,75	20272	20812
	20368	20576
	20827	20440
1	27643	27252
	27481	27282

	27455	27741
1,25	34847	34336
	34959	34348
	34694	34460

Figura D-1: Curva de ajuste para la respuesta del analito disuelto en medio receptor y en extracto de piel

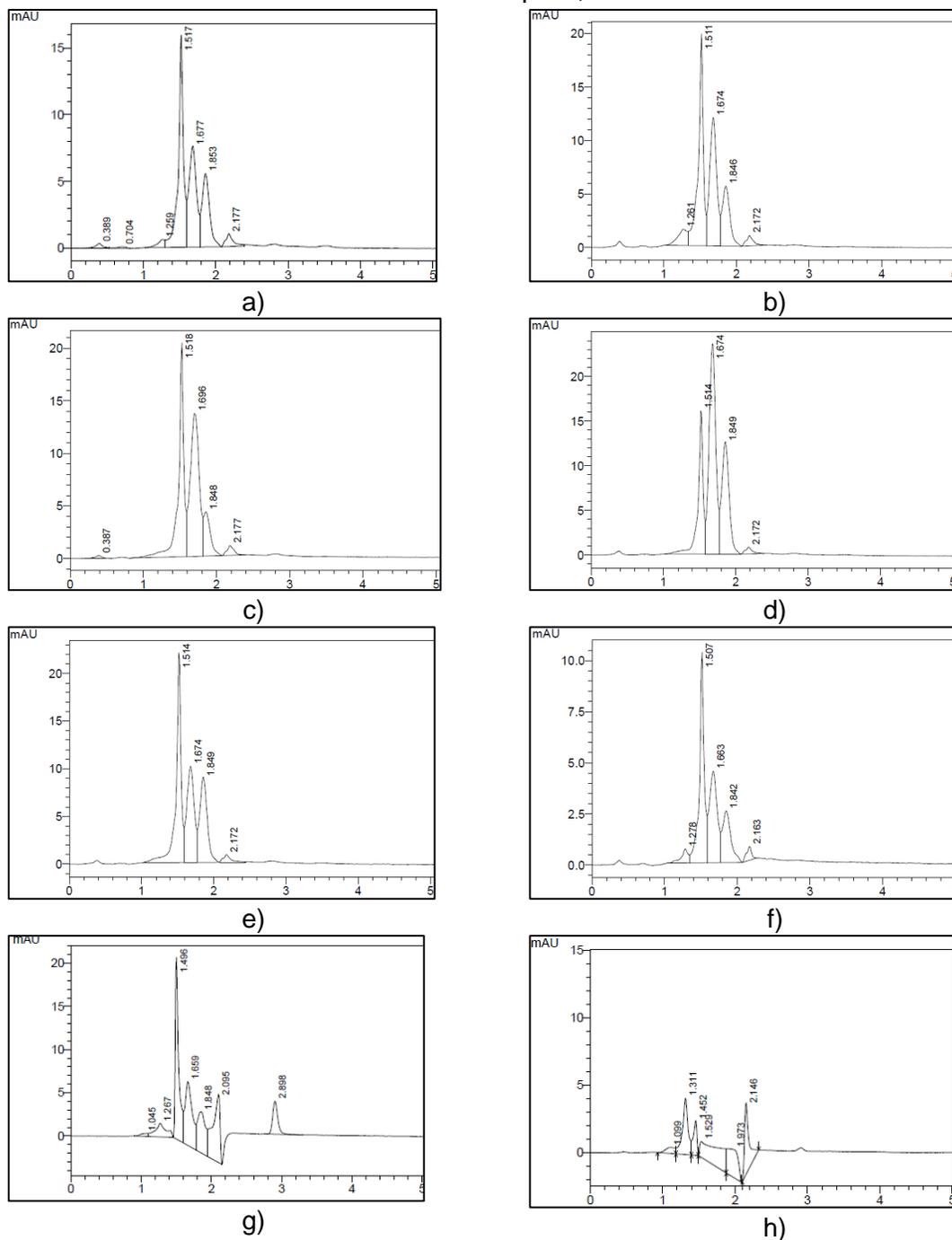


Teniendo en cuenta los resultados, se concluyó que es indistinto utilizar para la curva de calibración el extracto de piel o solo el medio receptor y debido a que el primero ocasiona aumento de presión del sistema cromatográfico se decidió trabajar la curva de calibración manejando las muestras con medio receptor, es decir con buffer de fosfatos pH 7,4.

- **Selectividad**

La selectividad se evaluó comparando los perfiles cromatográficos de muestras de medio receptor sometido a condiciones de ensayo para tejido cutáneo de seis especímenes animales diferentes y para el medio receptor fresco como se muestra en la **Figura D-2**. De acuerdo con los perfiles, no existe interferencia visual en el tiempo de retención del analito que corresponde a tres minutos como se observa para el perfil de la muestra control de concentración intermedia. De manera que, indistinto a la diversidad del espécimen empleado y al buffer de fosfatos fresco, ninguno de los elementos presentes en éstos puede llegar a interferir con la señal de cafeína a pesar de la existencia de algunas señales hacia la parte izquierda del perfil, que pueden ser debidas a las sustancias que forman parte del buffer y a los residuos del tejido al ser sometido a condiciones de ensayo.

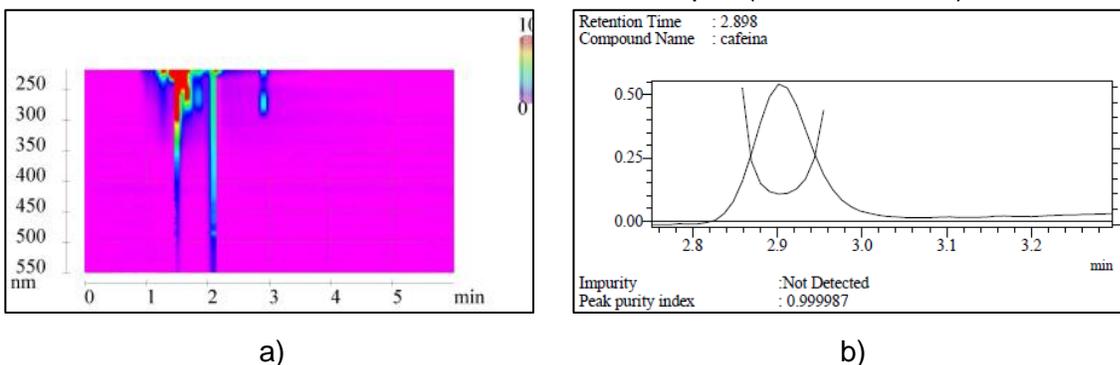
Figura D-2: Perfiles cromatográficos para el extracto de piel espécimen a) 1, b) 2, c) 3, d) 4, e) 5, f) 6. Perfil para g) muestra control nivel intermedio, h) medio receptor buffer de fosfatos pH 7,4.



Así mismo, se evaluó la pureza de pico para cada muestra control preparada encontrándose un índice de pureza superior a 0,9999 como se muestra en la **Figura D-3**.

A su vez, es posible observar en el isograma que para el tiempo de retención de la cafeína a lo largo del espectro de longitudes de onda solo se encuentra presente dicho compuesto y que, no existen sustancias aledañas que puedan coeluir y/o interferir con su determinación con una resolución superior a cinco y un factor de separación superior a la unidad respecto al pico más cercano.

Figura D-3: a) isograma y b) perfil de pureza de pico para el nivel intermedio de concentración de cafeína en extracto de piel (muestra control).

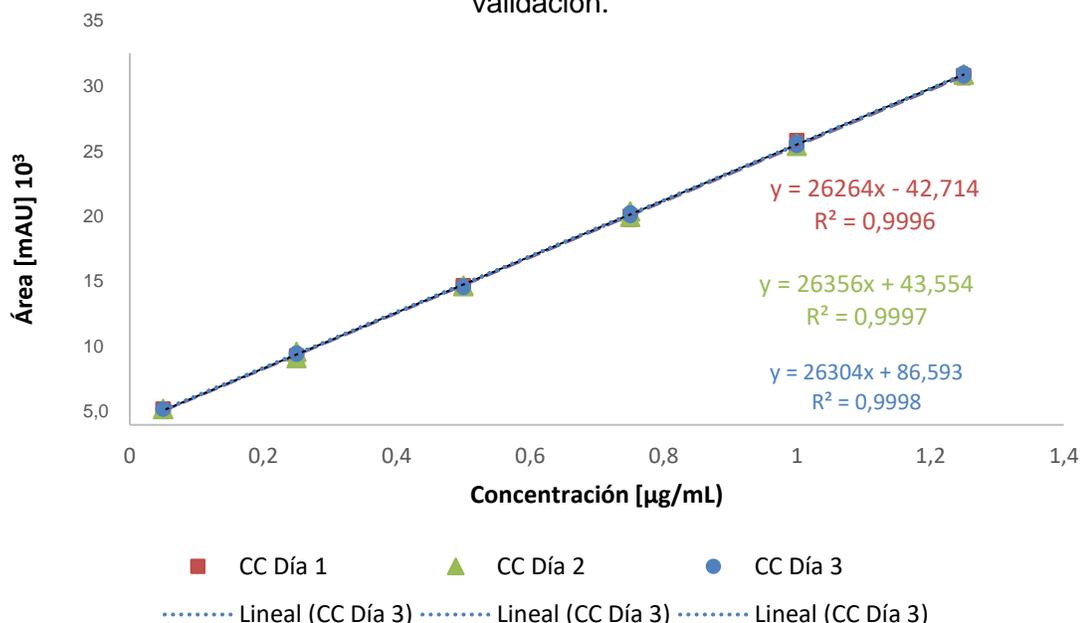


Teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos, se pudo establecer que el método es selectivo para la determinación de cafeína en el medio receptor y en el medio que fue sometido a condiciones de ensayo.

- **Linealidad**

La linealidad fue evaluada para tres días diferentes utilizando medio receptor fresco para la preparación de las muestras (denominadas muestras de curva de calibración CC) en concordancia con los resultados del análisis previo. Se realizó una regresión lineal para la respuesta instrumental de seis niveles de concentración por duplicado obteniendo un coeficiente de correlación superior al 0,999 para cada curva como se observa en la **Figura D-4** indicativo de una correlación apropiada entre las variables respuesta instrumental (área) y concentración del analito.

Figura D-4: Curvas de calibración independientes correspondientes a tres días de la validación.



Los resultados de la prueba de hipótesis con el estadístico t de Student se presentan en la **Tabla D-2** donde se evidencia que, para los parámetros de correlación y pendiente, el valor de t estimado es mayor que el valor de t obtenido de la tabla para las curvas realizadas en tres días independientes, esto indica que, se rechaza en ambos casos la hipótesis nula, implicando que la pendiente es diferente de cero y que, efectivamente existe correlación lineal entre la variable dependiente y la variable independiente evaluadas. Así mismo, para los tres días el valor de t calculado para el parámetro de intercepto es inferior al valor del t obtenido de tablas, por lo que, en este caso la hipótesis nula es aceptada admitiendo con un 95% de confianza que el intercepto no difiere de cero.

Tabla D-2: Resultados de la prueba t de Student para evaluar los parámetros de linealidad pendiente, intercepto y correlación de las curvas de calibración preparadas tres días independientes.

Parámetro	t estimado			t tabla	Resultado
	CC Día 1	CC Día 2	CC Día 3		
Correlación XY	180,337	196,872	252,777	2,16	Se rechaza H_0 , existe correlación entre (x) y (y).
Pendiente	158,166	172,669	221,7		Se rechaza H_0 , la pendiente es significativamente diferente de cero.
Intercepto	-0,34	0,377	0,964		Se acepta H_0 , el intercepto no es significativamente diferente de cero.

Con el fin de determinar la idoneidad de la regresión se realizó una prueba de varianza ANOVA cuyos resultados se muestran en la **Tabla D-3**. En el caso del parámetro de regresión, para las curvas realizadas los tres días independientes se encontró que el valor de F estimado es superior al valor de la tabla, por lo que se rechaza la hipótesis nula aceptando que la regresión es estadísticamente significativa. Por otro lado, para el desvío, el valor reportado de F en la tabla es superior al valor obtenido con el procesamiento de los datos experimentales, por lo que la hipótesis fue aceptada indicando que el desvío de la linealidad no es significativo, es decir, que estadísticamente los resultados no resultan ser dispersos y se ajusta al modelo de regresión lineal planteado.

Tabla D-3: Resultados del análisis de varianza ANOVA para las curvas de calibración realizadas en tres días independientes.

Parámetro	F estimado método			F tabla	Resultado
	CC Día 1	CC Día 2	CC Día 3		
Regresión	25016,5	29814,4	49150,8	4,965	Se rechaza H_0 , la regresión es significativa.
Desvío de linealidad	1,181	0,29	1,373	4,534	Se acepta H_0 el desvío no es significativo la regresión lineal se ajusta.

De acuerdo con el tratamiento estadístico realizado es posible afirmar que el método es lineal en el rango de concentraciones estudiadas.

- **Exactitud y precisión**

Para evaluar el parámetro de exactitud se determinó el valor experimental de la concentración obtenido a través de la respuesta instrumental y la ecuación de la curva de calibración, de esta forma, comparando con el valor teórico, se estimó el porcentaje de recuperación para cinco repeticiones de cuatro niveles que cubren el rango de trabajo como se muestra en la **Tabla D-4**, consiguiendo un porcentaje de recuperación promedio del 100,939 % con un coeficiente de variación inferior al 15 % que, de acuerdo con los criterios considerados, demuestra que el método es exacto.

Tabla D-4: Resultados para la evaluación del parámetro exactitud.

Nivel evaluado	C [µg/mL]	Área prom.	C hallada [µg/mL] prom. $y = 26356x + 43,554$	% Recuperación prom.	RSD [%]
n1	0,05	1466	0,054	107,911	0,676
n2	0,25	6560	0,247	98,905	1,488
n3	0,75	19396	0,734	97,902	0,236
n4	1,25	32672	1,238	99,040	0,355
Promedio				100,939	
SD				4,226	
RSD (%)				4,187	

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La primera, fue determinada analizando la respuesta instrumental de cinco repeticiones y cuatro niveles de concentración para un mismo día y analista para un total de 20 determinaciones (**Tabla D-5**). Se realizó la prueba de Cochran planteando la hipótesis nula como la existencia de igualdad de varianzas. Se encontró que el valor de G experimental (0,3686) es inferior al valor de G obtenido de la tabla (0,683), por lo que la hipótesis nula fue aceptada implicando igualdad de varianzas que permite deducir que la dispersión entre concentraciones es semejante. A su vez, la aceptación de igualdad de varianzas permite el cálculo del coeficiente de variación ponderado (RSDp) cuyo valor obtenido es inferior al 15 % por lo que se considera que cumple los requisitos de validación de precisión a nivel de repetibilidad.

Tabla D-5: Resultados de precisión en términos de repetibilidad.

Nivel evaluado	C [µg/mL]	Área prom.	C hallada prom. [µg/mL] $y = 26264x - 42,714$	% Recuperación prom.	S ²
n1	0,05	1459	0,057185	114,371	1,845
n2	0,25	6506	0,249342	99,737	1,590
n4	0,75	19430	0,74143	98,857	0,045
n6	1,25	32939,4	1,255792	100,463	1,525
Gexp.					0,369
Gtab ($\alpha=0.05$; $r=4$, $n=5$)					0,628
RSDp					1,068

La precisión intermedia fue evaluada mediante el análisis del coeficiente de variación. Por tal motivo, se analizó la respuesta obtenida del instrumento en términos de concentración y su consecuente porcentaje de recuperación respecto al valor teórico. Se determinó la

variación evaluando los factores días, analistas, réplica y concentración, considerando tres días, dos analistas, cinco réplicas y cuatro niveles de concentración (**Tabla D-6** de respuesta instrumental y la **Tabla D-7** de resultados y análisis estadístico). El resultado del coeficiente de variación global, así como de los coeficientes de variación entre factores es inferior al 15 %, que de acuerdo con los criterios de aceptación implica que el método es preciso.

Tabla D-6: Respuesta instrumental obtenida para cuatro niveles de concentración, tres días, dos analistas para precisión intermedia.

		<i>C</i> $\mu\text{g/mL}$	ANALISTA A			ANALISTA B		
			D1A <i>Área</i>	D2A <i>Área</i>	D3A <i>Área</i>	D1B <i>Área</i>	D2B <i>Área</i>	D3B <i>Área</i>
N1	R1	0,05	1441	1474	1472	1447	1458	1446
	R2	0,05	1449	1471	1487	1443	1468	1456
	R3	0,05	1488	1472	1480			
	R4	0,05	1461	1452	1485			
	R5	0,05	1457	1459	1477			
N2	R1	0,25	6616	6628	6602	6360	6413	6595
	R2	0,25	6386	6424	6642	6448	6475	6591
	R3	0,25	6527	6492	6502			
	R4	0,25	6486	6642	6488			
	R5	0,25	6515	6616	6667			
N4	R1	0,75	19378	19390	19662	19220	19240	19246
	R2	0,75	19402	19413	19438	19449	19292	19438
	R3	0,75	19461	19319	19590			
	R4	0,75	19481	19428	19695			
	R5	0,75	19429	19429	19671			
N6	R1	1,25	32903	32728	32950	32605	32537	32716
	R2	1,25	32825	32626	32787	32589	32586	32842
	R3	1,25	32687	32549	32800			
	R4	1,25	33640	32845	33060			
	R5	1,25	32642	32614	33009			

Tabla D-7:1 Resultados precisión intermedia evaluada para dos analistas, tres días, cinco réplicas y cuatro niveles de concentración.

Factor/parámetro	Nivel	Promedio del % de recuperación	Desviación	RSD promedio
Días	D1	103,060	6,571	4,578
	D2	100,874	4,481	
	D3	100,612	2,933	
Analistas	A1	101,727	4,937	4,943
	A2	100,985	5,082	
Réplica	R1	101,298	4,904	5,027
	R2	101,294	5,046	
	R3	101,636	5,793	
	R4	101,971	4,959	
	R5	101,814	4,834	
Concentración	C1	109,237	3,863	2,655
	C2	98,860	5,441	
	C3	98,344	0,713	
	C4	99,618	0,852	
Promedio global	101,515			
SD	4,930			
RSD global	4,856			

- **Idoneidad**

El sistema de idoneidad se evaluó para seis inyecciones sucesivas de una misma muestra de concentración intermedia (n4). Todos los parámetros se encuentran conformes con los criterios de aceptación. De acuerdo con los resultados, el tiempo de retención presenta valores que se encuentran dentro de una ventana del 10% respecto al tiempo de retención esperado del analito, la eficiencia medida a través de los platos teóricos es superior a 2000, el factor de asimetría se encuentra entre 0,8 y 2 y el factor de separación es superior a 1 (**Tabla D-8**). Estos resultados permiten concluir que el sistema cromatográfico cumple con los parámetros de idoneidad.

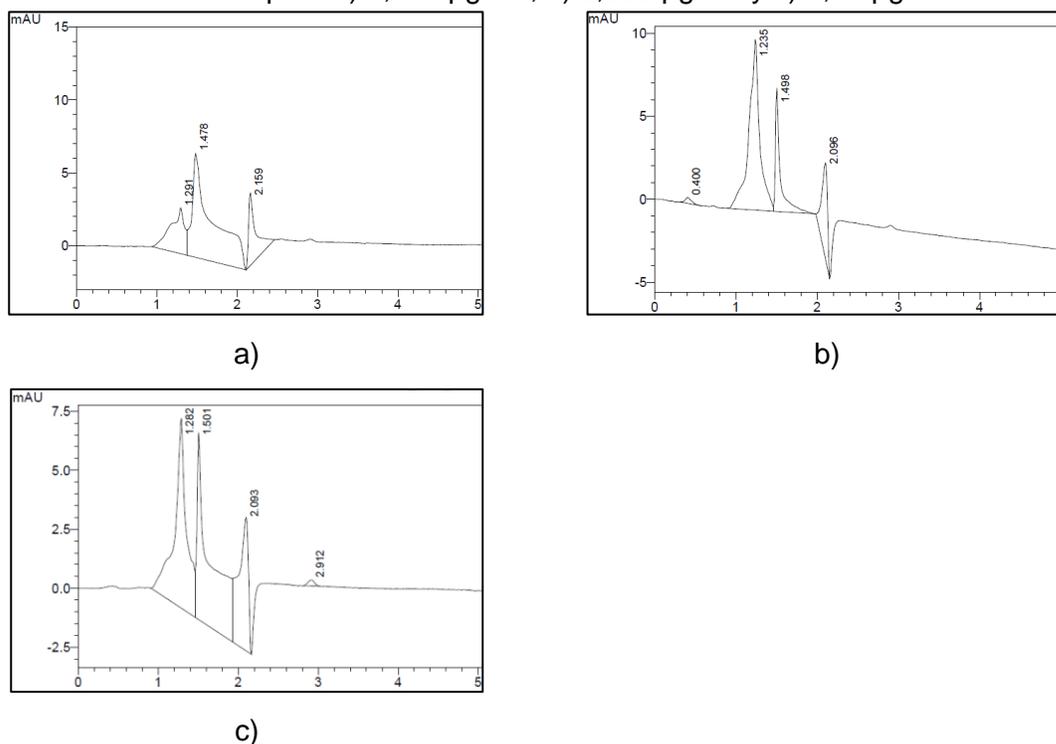
Tabla D-82: Resultados del sistema de idoneidad

Concentración 0,75 µg/ml	Áreas	Tiempo de retención (min)	Platos teóricos	Factor de asimetría As	Factor de separación n α
Inyección 1	19575	2,898	5945,246	1,285	1,777
Inyección 2	19304	2,892	6073,881	1,255	1,761
Inyección 3	19487	2,891	5818,662	1,255	1,749
Inyección 4	19631	2,894	6006,060	1,266	1,785
Inyección 5	19520	2,884	5939,257	1,281	1,760
Inyección 6	19653	2,889	5834,765	1,288	1,767
Promedio	19528,333	2,891	5936,312	1,272	1,767
%RSD	0,649	0,163	1,651	1,177	0,730

- Límite de detección

Se realizaron tres réplicas de tres concentraciones bajas diferentes de una misma solución madre. Se encontró que la mínima concentración para la cual el instrumento generaba una señal visible y cuantificable fue el valor de 0,05µg/mL (**Figura D-5**), valor que fue considerado como el límite de detección.

Figura D-5: Curvas representativas para las concentraciones de cafeína disuelta en medio receptor: a) 0,025 µg/mL, b) 0,035 µg/mL y c) 0,05 µg/mL



* Señal determinada: a) sin señal, b) sin señal, c) señal en tiempo de retención 2,912 con un área de 1405, una eficiencia de 4805,296 y un factor de asimetría 1,041

- **Estabilidad de las soluciones**

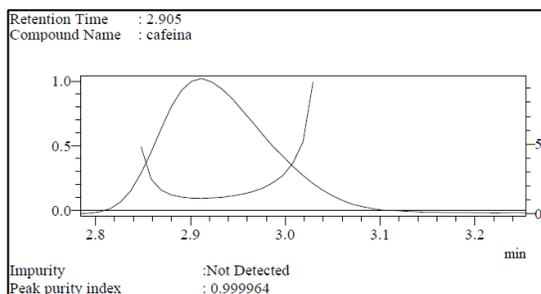
Las muestras de concentración alta y baja (n1 y n6) sometidas a condiciones de almacenamiento en refrigeración a 4 °C (REF) y a condiciones de trabajo a temperatura ambiente (AMB) para evaluar la estabilidad del analito, fueron cuantificadas el segundo y el tercer día de validación y a los 15 días, obteniendo los resultados mostrados en la **Tabla D-9**.

Tabla D-9: Resultados del porcentaje de degradación de cafeína en muestras control.

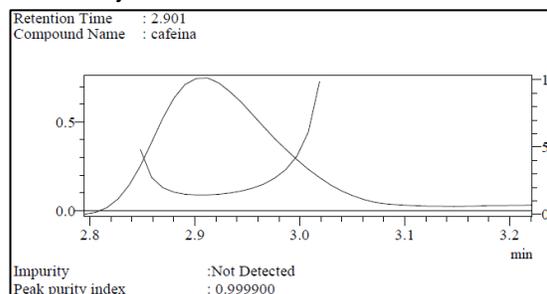
Muestra	% pérdida / ganancia			
	Inicial [µg/mL]	D2	D3	15 días
n1 REF	1441	-4,824	-9,661	-0,539
n6 REF	32903	-2,196	-1,441	-1,041
n1 AMB	1449	-6,470	-8,539	-2,681
n6 AMB	32825	-1,385	-0,560	-1,387

Los resultados obtenidos de la señal los subsecuentes días a las condiciones evaluadas permiten afirmar que el analito no sufre una degradación significativa siendo ésta inferior al 15 % como lo establecen los lineamientos [80]. A su vez, como se observa en la **Figura D-6**, la pureza del pico se mantiene respecto a la pureza inicial siendo esta superior a 0,9999.

Figura D-6: Pureza del pico nivel más alto (n6) después de 15 días en a) refrigeración b) condiciones de trabajo.



a)



b)

- **Recuperación**

Para evaluar este parámetro se realizaron muestras de recuperación que fueron comparadas con las muestras control para cuatro niveles (n1, n2, n4 y n6) obteniéndose los resultados de la **Tabla D-10**. El coeficiente de variación promedio obtenido para el porcentaje de recuperación de las muestras control y de recuperación es inferior al 15% indicando una recuperación semejante entre ambas muestras. A su vez, se obtuvo un intervalo de confianza de 96,924 a 102,787% que significa que con un 95% de seguridad la recuperación media se encuentra en ese intervalo, rango que se encuentra dentro de los límites aceptables del 80 al 120%.

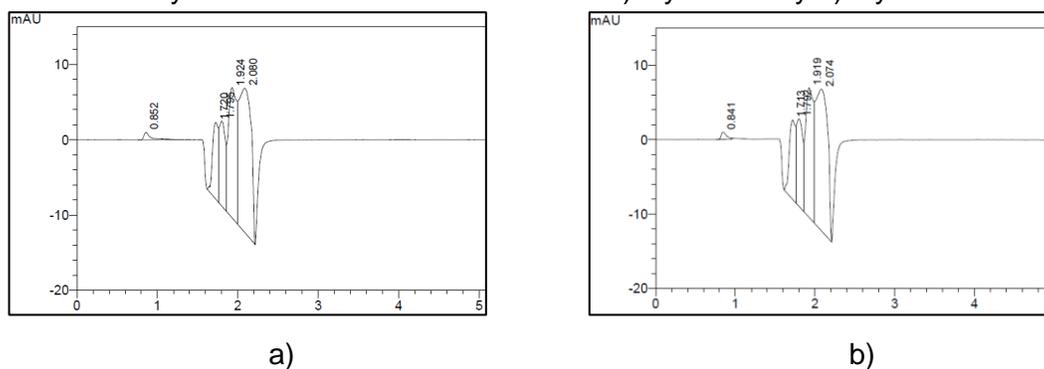
Tabla D-10: Resultados porcentaje de recuperación

Niveles evaluados	C $\mu\text{g/mL}$	Áreas Muestras de recuperación	C hallada ($\mu\text{g/mL}$) $y = 26304x + 86,593$	% Recuperación Muestras de recuperación	% Recup. Promedio Muestras de recuperación	% Recup. Promedio Muestras control	
N1	0,05	1451	0,052	103,741	105,110	105,962	
	0,05	1487	0,053	106,479			
N2	0,25	6462	0,242	96,950	96,653	98,747	
	0,25	6423	0,241	96,357			
N4	0,75	19413	0,735	97,964	98,165	98,969	
	0,75	19492	0,738	98,365			
N6	1,25	32659	1,238	99,064	99,495	99,862	
	1,25	32942	1,249	99,925			
Promedio %				99,856	LI IC	LS IC	RSD promedio
RSD (%)				3,512	96,924	102,787	3,326

- **Arrastre (Carry over)**

En la **Figura D-7**; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observa que no existe ninguna señal para el tiempo de retención del analito de interés luego de pasar dos inyecciones sucesivas de diluyente después de una inyección del nivel más alto, por lo que se determina que no hay arrastre de cafeína.

Figura D-7: Cromatogramas de evaluación del parámetro *carry over* para dos inyecciones sucesivas de diluyente. A) inyección 1 y b) inyección 2



Los resultados de los parámetros evaluados permitieron establecer que el método de cuantificación validado posibilita la determinación de cafeína en el compartimento receptor durante la realización de los ensayos de difusión.

E. Anexo E: Datos asociados a los ensayos de difusión

- **Resultados complementarios para los ensayos de permeación.**

A continuación, se encuentran datos complementarios a los ensayos de permeación realizados.

Tabla E-3: Valores promedio de TEWL [$\text{g/m}^2/\text{h}$] para las membranas utilizadas en los ensayos de permeación.

TEWL MEMBRANA CUTÁNEA [$\text{g/m}^2/\text{h}$]				
MEMBRANA	DE Intacta	DEH intacta	DE no íntegra	DEH no íntegra
1	10,5	3,4	35,2	33,3
2	10,5	4,1	35,8	32,4
3	5,4	4,3	35,9	32,3
4	8,3	6,8	36,3	32,9
5	9,1	6,2	36,5	32,9
6	10,3	5,3	36,3	33,1
7	9,1	4,9		
8	9,3	4,7		
9	9,0	4,6		
10	8,9	5,1		
11	8,7	5,5		
12	8,4	5,5		
PROMEDIO	9,0	5,0	36,0	32,8
DESVIACIÓN	1,4	0,9	0,5	0,4

Tabla E-4: respuesta instrumental cantidad de cafeína encontrada en compartimiento dador

Producto	02EB		04HV		05CA		06AD	
Membrana	DE	DEH	DE	DEH	DE	DEH	DE	DEH
R1	1363509	1438782	422135	408119	394068	382434	332127	286405
R2	1411883	1389907	412019	425692	388548	394678	295428	313762
R3	1469254	1423736	435298	429897	396619	399961	328742	320801
Promedio	1414882	1417475	423151	421236	393078	392358	318766	306989
S	52936	25032	11673	11553	4126	8991	20282	18171

Tabla E-5 Respuesta instrumental de la cafeína encontrada en el compartimento receptor en los ensayos de permeación con membrana dermoepidérmica y membrana con tejido hipodérmico para el producto 02EB.

Tiempo	Repeticiones	Membrana dermoepidérmica	Membrana con tejido hipodérmico
		Área mAU	
15min	1	3182	2659
	2	2825	2949
	3	2583	2984
30min	1	6433	2797
	2	8270	2628
	3	6386	2591
1h	1	8845	4059
	2	6404	4987
	3	8403	3849
2h	1	5325	3978
	2	6780	5305
	3	5678	3282
3h	1	4973	5431
	2	5782	4585
	3	5280	3730
4h	1	6874	3140
	2	4658	4470
	3	4056	3749
5h	1	4926	3818
	2	6491	3728
	3	4017	3274

Tabla E-6 Respuesta instrumental de la cafeína encontrada en el compartimento receptor en los ensayos de permeación con membrana dermoepidérmica y membrana con tejido hipodérmico para el producto 04HV.

Tiempo	Repeticiones	Membrana dermoepidérmica	Membrana con tejido hipodérmico
		Área mAU	
15min	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
30min	1	1343	1810
	2	2054	1734
	3	2402	1808

1h	1	1298	1160
	2	1301	1969
	3	1390	1085
2h	1	2012	1848
	2	1068	1209
	3	1960	1357
3h	1	2599	1288
	2	1301	1267
	3	1266	1345
4h	1	2126	1426
	2	1093	1037
	3	1028	1288
5h	1	2327	1004
	2	1042	1137
	3	1002	1083

Tabla E-7 Respuesta instrumental de la cafeína encontrada en el compartimento receptor de los ensayos de permeación con membrana dermoepidérmica y membrana con tejido hipodérmico para el producto 05CA.

Tiempo	Repeticiones	Membrana dermoepidérmica	Membrana con tejido hipodérmico
		Área mAU	
15min	1	2396	0
	2	3152	0
	3	2221	0
30min	1	2650	0
	2	2445	0
	3	2235	0
1h	1	2103	1713
	2	2306	1095
	3	2515	1717
2h	1	1739	1950
	2	2263	1901
	3	2411	1886
3h	1	1825	2037
	2	2199	1908
	3	2333	1719
4h	1	1663	1141

	2	2311	1216
	3	2337	1151
5h	1	1685	1174
	2	2277	1040
	3	2419	1058

Tabla E-8 Respuesta instrumental de la cafeína encontrada en el compartimento receptor de los ensayos de permeación con membrana dermoepidérmica y membrana con tejido hipodérmico para el producto 06AD.

Tiempo	Repeticiones	Membrana dermoepidérmica	Membrana con tejido hipodérmico
		Área mAU	
15min	1	1701	0
	2	2796	0
	3	2876	0
30min	1	1684	0
	2	2737	0
	3	2610	0
1h	1	2224	1684
	2	2489	2874
	3	2421	2490
2h	1	2599	2021
	2	2642	2792
	3	2557	3029
3h	1	3107	1979
	2	4672	1749
	3	5640	1791
4h	1	17232	2116
	2	18771	1616
	3	17491	1485
5h	1	27511	1477
	2	26814	1455
	3	27468	1404

Bibliografía

- [1] H. I. M. Raja K Sivamani, Jared R. Jagdeo, Peter Elsner, *Cosmeceuticals and Active Cosmetics*. 2016.
- [2] A. Benaiges, "Concepto, clasificación y tratamiento de la celulitis," *Dermofarmacia*, vol. 22. pp. 78–88, May 2003, Accessed: Nov. 09, 2020. [Online]. Available: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13047748>.
- [3] A. Herman and A. P. Herman, "Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use," *Skin Pharmacology and Physiology*, vol. 26, no. 1. pp. 8–14, Dec. 2012, doi: 10.1159/000343174.
- [4] N. Hasegawa; and M. Mori, "Effect of Powdered Green Tea and Its Caffeine Content on Lipogenesis and Lipolysis in 3T3-L1 Cell," *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 40, no. 6, pp. 1569–1572, 2000.
- [5] Comunidad Andina, "DECISIÓN 833. Actualización de la Decisión 516 'Armonización de Legislaciones en materia de Productos Cosméticos,'" *Gac. Of.*, 2018.
- [6] República de Colombia, "DECRETO NÚMERO 677 DE 1995 Por el cual se reglamenta parcialmente el Régimen de Registros y Licencias, el Control de Calidad, así como el Régimen de Vigilancia Sanitaria de Medicamentos, Cosméticos, Preparaciones Farmacéuticas a base de Recursos Naturales," vol. 246, no. abril 26, pp. 1–70, 1995.
- [7] G. Beauchamp, A. Amaducci, and M. Cook, "Caffeine Toxicity: A Brief Review and Update," *Clin. Pediatr. Emerg. Med.*, vol. 18, no. 3, pp. 197–202, 2017, doi: 10.1016/j.cpem.2017.07.002.
- [8] C. Willson, "The clinical toxicology of caffeine: A review and case study," *Toxicol. Reports*, vol. 5, no. November, pp. 1140–1152, 2018, doi: 10.1016/j.toxrep.2018.11.002.
- [9] A. S. Tolley, "Caffeine: Consumption, side effects and impact on performance and mood," *Caffeine Consum. Side Eff. Impact Perform. Mood*, no. January, pp. 1–217, 2014.
- [10] M. Gajewska *et al.*, "In vitro-to-in vivo correlation of the skin penetration, liver clearance and hepatotoxicity of caffeine," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 75, pp. 39–49, 2015, doi: 10.1016/j.fct.2014.10.017.
- [11] J. Michael, V. Nadine, K. Maiké, and B. Adolf, "Erratum: Caffeine and Its Pharmacological Benefits in the Management of Androgenetic Alopecia: A Review

- (Skin Pharmacol Physiol (2020) 33 (93-109) DOI: 10.1159/000508228),” *Skin Pharmacol. Physiol.*, pp. 153–169, 2020, doi: 10.1159/000511410.
- [12] M. Visconti, W. Haidari, and S. Feldman, “Therapeutic use of caffeine in dermatology: A literature review,” *J. Dermatology Dermatologic Surg.*, vol. 24, no. 1, p. 18, 2020, doi: 10.4103/jdds.jdds_52_19.
- [13] C. L. Petersen, V. Kalil, and V. Campos, *Drug Delivery in Dermatology*. Rio de Janeiro: Springer, 2021.
- [14] J. B. Wilkinson and R. J. Moore, *Cosmetología de Harry*, vol. 53, no. 9. 1990.
- [15] M. A. Bolzinger, S. Briançon, J. Pelletier, and Y. Chevalier, “Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 17, no. 3, pp. 156–165, 2012, doi: 10.1016/j.cocis.2012.02.001.
- [16] D. T. Ginat, *Neuroradiological imaging of skin diseases and related conditions*. Chicago: Springer, 2018.
- [17] K. S. Saladin, *Human Anatomy - Kenneth S. Saladin*. Mc Graw Hill, 2007.
- [18] W. Montagna, A. M. Kligman, K. S. Carlisle, W. Montagna, A. M. Kligman, and K. S. Carlisle, “Hypodermis,” in *Atlas of Normal Human Skin*, Springer New York, 1992, pp. 367–377.
- [19] J. A. Bouwstra and M. Ponc, “The skin barrier in healthy and diseased state,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1758, no. 12, pp. 2080–2095, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.bbamem.2006.06.021.
- [20] T. Agner, *Skin Barrier Function*. current problems in dermatology, 2016.
- [21] S. Singh and J. Singh, “Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: A review,” *Med. Res. Rev.*, vol. 13, no. 5, pp. 569–621, Sep. 1993, doi: 10.1002/med.2610130504.
- [22] SCCP, “SCCP/0970/06 Basic Criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients-update March 2006, European Commission,” no. March, 2006, [Online]. Available: https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_03.pdf.
- [23] J. Kielhorn, S. Melching-Kollmuß, I. Mangelsdorf, and World Health Organization, “Environmental health criteria 235 for dermal absorption,” *Environ. Heal. Criteria*, 2006.
- [24] A. Z. Alkilani, M. T. C. McCrudden, and R. F. Donnelly, “Transdermal drug delivery: Innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum,” *Pharmaceutics*, vol. 7, no. 4, pp. 438–470, 2015, doi: 10.3390/pharmaceutics7040438.
- [25] S. Trauer *et al.*, “Permeation of topically applied caffeine through human skin - A comparison of in vivo and in vitro data,” *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 68, no. 2, pp. 181–186, Aug. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2125.2009.03463.x.
- [26] B. J. Thomas and B. C. Finnin, “The transdermal revolution,” *Drug Discov. Today*,

- vol. 9, no. 16, pp. 697–703, 2004, doi: 10.1016/S1359-6446(04)03180-0.
- [27] R. Gutiérrez Fernández de Molina, “Estudios De Difusión A Través De Piel De Formulaciones Liposómicas De Aciclovir,” Universidad Computense de Madrid, 2011.
- [28] C. Ehrhardt and K.-J. Kim, *Drug Absorption Studies*. New York: Springer, 2008.
- [29] OECD, “OECD Test Guideline 428: Skin Absorption: in vitro method,” no. April. 2004.
- [30] V. Rogiers and M. Pauwels, “Critical Analysis of the Safety Assessment of Cosmetic Ingredients Performed at the European Level: the in vitro delmal absorption study,” in *Safety assesment of cosmetics in Europe*, KARGER, 2008, pp. 74–81.
- [31] D. Selzer, M. M. A. Abdel-Mottaleb, T. Hahn, U. F. Schaefer, and D. Neumann, “Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predictions,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 2, pp. 278–294, 2013, doi: 10.1016/j.addr.2012.06.010.
- [32] L. Luo and M. E. Lane, “Topical and transdermal delivery of caffeine,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 490, no. 1–2. Elsevier B.V., pp. 155–164, May 31, 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.05.050.
- [33] M. O’Neil, *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.*, Fifteenth edition /. Cambridge UK: Royal Society of Chemistry, 2013.
- [34] “Caffeine C8H10N4O2 | ChemSpider.” <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2424.html> (accessed Aug. 10, 2020).
- [35] European Food Safety Authority, “Scientific Opinion on the safety of caffeine,” *EFSA J.*, vol. 13, no. 5, 2015, doi: 10.2903/j.efsa.2015.4102.
- [36] A. Murray and J. Traylor, *Caffeine Toxicity*. StatPearls Publishing, 2018.
- [37] A. Bolsoni-Lopes and M. I. C. Alonso-Vale, “Lipolysis and lipases in white adipose tissue – An update,” *Archives of Endocrinology and Metabolism*, vol. 59, no. 4. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, pp. 335–342, 2015, doi: 10.1590/2359-3997000000067.
- [38] A. Lass, R. Zimmermann, M. Oberer, and R. Zechner, “Lipolysis - A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores,” *Progress in Lipid Research*, vol. 50, no. 1. Elsevier Ltd, pp. 14–27, 2011, doi: 10.1016/j.plipres.2010.10.004.
- [39] M. V. Velasco Robles, C. Tano Nakamura, G. M. Machado-Santelli, C. Vladi Olga, T. M. Kaneko, and A. Rolim Baby, “Effects of caffeine and siloxanetriol alginate caffeine, as anticellulite agents, on fatty tissue: histological evaluation,” 2008.
- [40] E. Dupont *et al.*, “An integral topical gel for cellulite reduction: Results from a

- double-blind, randomized, placebo-controlled evaluation of efficacy,” *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, vol. 7, pp. 73–88, Feb. 2014, doi: 10.2147/CCID.S53580.
- [41] B. Vogelgesang, I. Bonnet, N. Godard, B. Sohm, and E. Perrier, “In vitro and in vivo efficacy of sulfo-carrabiose, a sugar-based cosmetic ingredient with anti-cellulite properties,” *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 33, no. 2, pp. 120–125, Apr. 2011, doi: 10.1111/j.1468-2494.2010.00593.x.
- [42] F. Turati *et al.*, “Efficacy of cosmetic products in cellulite reduction: systematic review and meta-analysis,” *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–15, Jan. 2014, doi: 10.1111/jdv.12193.
- [43] R. Roure, T. Oddos, A. Rossi, F. Vial, and C. Bertin, “Evaluation of the efficacy of a topical cosmetic slimming product combining tetrahydroxypropyl ethylenediamine, caffeine, carnitine, forskolin and retinol, in vitro, ex vivo and in vivo studies,” *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 33, no. 6, pp. 519–526, Dec. 2011, doi: 10.1111/j.1468-2494.2011.00665.x.
- [44] C. Dray, D. Daviaud, C. Guigné, P. Valet, and I. Castan-Laurell, “Caffeine reduces TNF α up-regulation in human adipose tissue primary culture,” *J. Physiol. Biochem.*, vol. 63, no. 4, pp. 329–336, 2007, doi: 10.1007/BF03165764.
- [45] H. Hamishehkar, J. Shokri, S. Fallahi, A. Jahangiri, S. Ghanbarzadeh, and M. Kouhsoltani, “Histopathological evaluation of caffeine-loaded solid lipid nanoparticles in efficient treatment of cellulite,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 41, no. 10, pp. 1640–1646, 2015, doi: 10.3109/03639045.2014.980426.
- [46] S. Muroski *et al.*, “A combination of caffeine, arginine, soy isoflavones, and L-carnitine enhances both lipolysis and fatty acid oxidation in 3T3-L1 and HepG2 cells in vitro and in KK mice in vivo,” *J. Nutr.*, vol. 137, no. 10, pp. 2252–2257, 2007, doi: 10.1093/jn/137.10.2252.
- [47] C. Sugiura, G. Zheng, L. Liu, and K. Sayama, “Catechins and Caffeine Promote Lipid Metabolism and Heat Production Through the Transformation of Differentiated 3T3-L1 Adipocytes from White to Beige Adipocytes,” *J. Food Sci.*, vol. 85, no. 1, pp. 192–200, 2020, doi: 10.1111/1750-3841.14811.
- [48] J. Stanek and M. Wochner, “Current and Future ‘ Body-sculpting ’ Cosmetics The Science of Fat,” vol. 130, no. 9, pp. 20–28, 2015.
- [49] D. Hexsel and M. Soirefmann, “Cosmeceuticals for Cellulite,” *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, vol. 30, no. 3, pp. 167–170, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.sder.2011.06.005.
- [50] N. Otberg *et al.*, “The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine,” *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 65, no. 4, pp. 488–492, 2008, doi: 10.1111/j.1365-2125.2007.03065.x.
- [51] M. A. Bolzinger, S. Briançon, J. Pelletier, H. Fessi, and Y. Chevalier, “Percutaneous release of caffeine from microemulsion, emulsion and gel dosage forms,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 68, no. 2, pp. 446–451, 2008, doi: 10.1016/j.ejpb.2007.10.018.

- [52] "Caffeine - Registration Dossier - ECHA," *Dermal absorption*. <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/10085/7/2/3> (accessed Nov. 10, 2020).
- [53] J. Frelichowska, M. A. Bolzinger, J. P. Valour, H. Mouaziz, J. Pelletier, and Y. Chevalier, "Pickering w/o emulsions: Drug release and topical delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 368, no. 1–2, pp. 7–15, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.09.057.
- [54] M. V Debandi, N. J. François, and M. E. Daraio, "Evaluación De Distintas Membranas Para Liberación in Vitro De Principios Activos Anticelulíticos.," *Aci*, vol. 2, no. 2, pp. 97–105, 2011.
- [55] S. Meesen, "In vitro percutaneous absorption of caffeine from cosmetic formulations," no. thesis Msc.Cosmetic Sciences, 2011.
- [56] R. Mustapha, C. Lafforgue, N. Fenina, and J. Marty, "Influence of drug concentration on the diffusion parameters of caffeine," *Indian J. Pharmacol.*, vol. 43, no. 2, pp. 157–162, Apr. 2011, doi: 10.4103/0253-7613.77351.
- [57] J. Djajadisastra, Sutriyo, and Hadyanti, "Percutane transport profile of caffeine and aminophyllin as anticellulite and the influences of other substances on in vitro penetration," *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 6, no. 5, pp. 532–538, 2014.
- [58] E. Abd *et al.*, "Deformable liposomes as enhancer of caffeine penetration through human skin in a Franz diffusion cell test," *Int. J. Cosmet. Sci.*, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1111/ics.12659.
- [59] N. H. C. S. Silva *et al.*, "Topical caffeine delivery using biocellulose membranes: A potential innovative system for cellulite treatment," *Cellulose*, vol. 21, no. 1, pp. 665–674, Feb. 2014, doi: 10.1007/s10570-013-0114-1.
- [60] I. Iskandarsyah, A. W. Puteri, and E. Ernysagita, "Penetration test of caffeine in ethosome and desmosome gel using an in vitro method," *Int. J. Appl. Pharm.*, vol. 9, pp. 120–123, 2017, doi: 10.22159/ijap.2017.v9s1.69_76.
- [61] F. Farner, L. Bors, Á. Bajza, G. Karvaly, I. Antal, and F. Erdő, "Validation of an In vitro-in vivo Assay System for Evaluation of Transdermal Delivery of Caffeine," *Drug Deliv. Lett.*, vol. 9, no. 1, pp. 15–20, Sep. 2018, doi: 10.2174/2210303108666180903102107.
- [62] J. Pavlačková *et al.*, "Transdermal absorption of active substances from cosmetic vehicles," *J. Cosmet. Dermatol.*, vol. 18, no. 5, pp. 1410–1415, 2019, doi: 10.1111/jocd.12873.
- [63] J. Ageis, H. Suryadi, and M. Jufri, "Formulation and in vitro skin penetration of a solid lipid nanoparticle gel containing coffea arabica extract," *Int. J. Appl. Pharm.*, vol. 12, no. Special Issue 1, pp. 177–181, 2020, doi: 10.22159/ijap.2020.v12s1.FF040.
- [64] Y. de Lafuente, A. Ochoa-Andrade, M. E. Parente, M. C. Palena, and A. F.

- Jimenez-Kairuz, "Preparation and evaluation of caffeine bioadhesive emulgels for cosmetic applications based on formulation design using QbD tools," *Int. J. Cosmet. Sci.*, pp. 548–556, 2020, doi: 10.1111/ics.12638.
- [65] M. Dias, A. Farinha, E. Faustino, J. Hadgraft, J. Pais, and C. Toscano, "Topical delivery of caffeine from some commercial formulations," 1999.
- [66] A. Smith, A. Chadha, R. Homan, and G. Baki, "Skin Penetration of Caffeine from Marketed Eye Creams," New York, 2017. [Online]. Available: <http://permeagear.com/wp->.
- [67] MINISTERIO DE SALUD, "RESOLUCION NUMERO 8430 DE 1993 'Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud,'" 1993.
- [68] República de Colombia, "Estatuto nacional de proteccion de los animales Ley 84 de 1989," *El Congr. Colomb.*, vol. 5, no. Diciembre 27, p. 14, 1989, [Online]. Available: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0>.
- [69] Congreso de Colombia, "Ley 2047 de 2020 "por el cual se prohíbe en colombia la experimentación, importación, fabricación y comercialización de productos cosméticos, sus ingredientes o combinaciones de ellos que sean objeto de pruebas con animales y se dictan otras disposiciones," 2020.
- [70] J. Y. Kim, J. Y. Song, E. J. Lee, and S. K. Park, "Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 281, no. 7, pp. 614–623, 2003, doi: 10.1007/s00396-002-0808-7.
- [71] R. Injac, B. Srdjenovic, M. Prijatelj, M. Boskovic, K. Karljickovic-Rajic, and B. Strukelj, "Determination of caffeine and associated compounds in food, beverages, natural products, pharmaceuticals, and cosmetics by micellar electrokinetic capillary chromatography," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 46, no. 2, pp. 137–143, 2008, doi: 10.1093/chromsci/46.2.137.
- [72] E. Marchei, D. De Orsi, C. Guarino, S. Dorato, R. Pacifici, and S. Pichini, "Measurement of iodide and caffeine content in cellulite reduction cosmetic products sold in the European market," *Anal. Methods*, vol. 5, no. 2, pp. 376–383, Jan. 2013, doi: 10.1039/c2ay25761k.
- [73] K. Mladenov and S. Sunarić, "Caffeine in Hair Care and Anticellulite Cosmetics: Sample Preparation, Solid-Phase Extraction, and HPLC Determination," *J. Cosmet. Sci.*, vol. 71, no. 5, pp. 251–262, 2020.
- [74] L. M. Sanabria, J. A. Martínez, and Y. Baena, "Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación in vitro empleando mucosa oral porcina," *Rev. Colomb. Ciencias Químico-Farmacéuticas*, vol. 46, no. 2, May 2017, doi: 10.15446/rcciquifa.v46n2.67956.
- [75] A. M. A. Hasan and M. E.-S. Abdel-Raouf, *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*. 2019.

- [76] L. A. Martínez, L. M. Sanabria, and Y. Baena, "Safety assessment of complex benzoic acid using in vitro permeation assays with pig skin in Franz cells," pp. 1–17, 2020.
- [77] Y. Baena, L. Dallos, R. Manzo, and L. Ponce D'León, "Estandarización de celdas de Franz para la realización de ensayos de liberación de fármacos a partir de complejos con polielectrolitos," *Rev. Colomb. Ciencias Químico-Farmacéuticas*, vol. 40, no. 2, pp. 174–188, 2011.
- [78] L. Sanabria, "Contribución a la implementación de un ensayo de permeación bucal, in vitro, empleando cafeína como compuesto modelo.," Universidad Nacional de Colombia, 2017.
- [79] European Medicines Agency, "ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation," *Sci. Med. Heal.*, vol. 44, no. March, p. 57, 2019.
- [80] Food and Drug Administration -Guidance for Industry, "Bioanalytical method validation," in *Guidance for Industry*, 2018, pp. 1–41, doi: 10.5958/2231-5675.2015.00035.6.
- [81] E. A. Fernández-montes, "Control de calidad Fórmulas dermatológicas," *Farm. Prof.*, vol. 17, pp. 70–75, 2003, [Online]. Available: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-13044489>.
- [82] K. Welin-Berger, J. A. M. Neelissen, and B. Bergenståhl, "The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 13, no. 3, pp. 309–318, 2001, doi: 10.1016/S0928-0987(01)00118-X.
- [83] L. Binder, J. Mazál, R. Petz, V. Klang, and C. Valenta, "The role of viscosity on skin penetration from cellulose ether-based hydrogels," *Ski. Res. Technol.*, vol. 25, no. 5, pp. 725–734, 2019, doi: 10.1111/srt.12709.
- [84] C. Wibowo and K. M. Ng, "Product-oriented process synthesis and development: Creams and pastes," *AIChE J.*, vol. 47, no. 12, pp. 2746–2767, 2001, doi: 10.1002/aic.690471214.
- [85] D. Saha and S. Bhattacharya, "Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: A critical review," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 47, no. 6, pp. 587–597, 2010, doi: 10.1007/s13197-010-0162-6.
- [86] H. Iwata and K. Shimada, *Formula Ingredients and production in cosmetics*, Springer., vol. 53, no. 9. Japan, 2013.
- [87] D. W. Lachenmeier, "Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity," *J. Occup. Med. Toxicol.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–16, 2008, doi: 10.1186/1745-6673-3-26.
- [88] L. C. Becker *et al.*, "Safety Assessment of Glycerin as Used in Cosmetics," *Int. J. Toxicol.*, vol. 38, no. 3_suppl, pp. 6S-22S, Nov. 2019, doi: 10.1177/1091581819883820.

- [89] S. Björklund, J. Engblom, K. Thuresson, and E. Sparr, "Glycerol and urea can be used to increase skin permeability in reduced hydration conditions," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 50, no. 5, pp. 638–645, 2013, doi: 10.1016/j.ejps.2013.04.022.
- [90] "Hansch, C., Leo, A., D. Hoekman. Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Washington, DC: American Chemical Society., 1995., p. 31 Hazardous Substances Data Bank (HSDB)." .
- [91] "Flick, E.W. (ed.). Industrial Solvents Handbook 4 th ed. Noyes Data Corporation., Park Ridge, NJ., 1991., p. 394 Hazardous Substances Data Bank (HSDB)." .
- [92] C. Reichardt and T. Welton, "Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry: Fourth Edition," *Solvents Solvent Eff. Org. Chem. Fourth Ed.*, Nov. 2010, doi: 10.1002/9783527632220.
- [93] "Liquids - Dielectric Constants." https://www.engineeringtoolbox.com/liquid-dielectric-constants-d_1263.html (accessed Sep. 04, 2022).
- [94] "Solvent Polarity Table - Miller's Home." <https://sites.google.com/site/miller00828/in/solvent-polarity-table> (accessed Sep. 04, 2022).
- [95] INVIMA, "Validación de Métodos Analíticos," pp. 1–92, 2014, [Online]. Available: <https://www.invima.gov.co/documents/20143/1433858/Validación+Medicamentos.pdf>.
- [96] Food and Drug Administration, "Methods, Method Verification and Validation," *ORA Lab. Proced.*, vol. II, pp. 1–19, 2014.
- [97] M. Akdeniz, S. Gabriel, A. Lichterfeld-Kottner, U. Blume-Peytavi, and J. Kottner, "Transepidermal water loss in healthy adults: a systematic review and meta-analysis update," *Br. J. Dermatol.*, vol. 179, no. 5, pp. 1049–1055, 2018, doi: 10.1111/bjd.17025.
- [98] C. Jacques-Jamin, C. Jeanjean-Miquel, A. Domergue, S. Bessou-Touya, and H. Duplan, "Standardization of an in vitro model for evaluating the bioavailability of topically applied compounds on damaged skin: Application to sunscreen analysis," *Skin Pharmacol. Physiol.*, vol. 30, no. 2, pp. 55–65, 2017, doi: 10.1159/000455196.
- [99] L. Kong *et al.*, "Chlorogenic acid and caffeine combination attenuates adipogenesis by regulating fat metabolism and inhibiting adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells," *J. Food Biochem.*, no. January, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1111/jfbc.13795.
- [100] H. Nakabayashi, T. Hashimoto, H. Ashida, S. Nishiumi, and K. Kanazawa, "Inhibitory effects of caffeine and its metabolites on intracellular lipid accumulation in murine 3T3-L1 adipocytes," *BioFactors*, vol. 34, no. 4, pp. 293–302, 2008, doi: 10.1002/biof.5520340405.
- [101] S. H. Su, H. W. Shyu, Y. T. Yeh, K. M. Chen, H. Yeh, and S. J. Su, "Caffeine inhibits adipogenic differentiation of primary adipose-derived stem cells and bone marrow stromal cells," *Toxicol. Vitr.*, vol. 27, no. 6, pp. 1830–1837, 2013, doi: 10.1016/j.tiv.2013.05.011.

- [102] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), "Thigh Creams (Cellulite Creams) | FDA." <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetic-products/thigh-creams-cellulite-creams> (accessed Sep. 06, 2022).
- [103] M. Nomura *et al.*, "Inhibition of epidermal growth factor-induced cell transformation and Akt activation by caffeine," *Mol. Carcinog.*, vol. 44, no. 1, pp. 67–76, Sep. 2005, doi: 10.1002/MC.20120.
- [104] J. V. Forrester, A. D. Dick, P. G. McMenamin, F. Roberts, and E. Pearlman, "General and ocular pharmacology," *Eye*, pp. 338-369.e1, Jan. 2016, doi: 10.1016/B978-0-7020-5554-6.00006-X.
- [105] K. Al-Khamis, S. S. Davis, and J. Hadgraft, "In vitro-in vivo correlations for the percutaneous absorption of salicylates," *Int. J. Pharm.*, vol. 40, no. 1–2, pp. 111–118, 1987, doi: 10.1016/0378-5173(87)90055-X.