



Estudio de la permeación de una serie de betabloqueantes a través de mucosa de cerdo

Sonia Amores Garzón

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA PERMEACIÓN DE UNA SERIE DE BETABLOQUEANTES A
TRAVÉS DE MUCOSA DE CERDO

SONIA AMORES GARZÓN
2012

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA
UNIDAD DE BIOFARMACIA Y FARMACOCINÉTICA

ESTUDIO DE LA PERMEACIÓN DE UNA SERIE DE BETABLOQUEANTES A
TRAVÉS DE MUCOSA DE CERDO

SONIA AMORES GARZÓN
2012

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA
UNIDAD DE BIOFARMACIA Y FARMACOCINÉTICA

ESTUDIO DE LA PERMEACIÓN DE UNA SERIE DE BETABLOQUEANTES A
TRAVÉS DE MUCOSA DE CERDO

Memoria presentada por Sonia Amores Garzón para optar al título de doctor por la
Universidad de Barcelona

Directores



Dr. D. José Doménech Berrozpe



Dr. D. Jacinto Lauroba Viladrosa

Doctoranda



Sonia Amores Garzón

SONIA AMORES GARZÓN
2012

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es el resumen de muchos años de esfuerzo en los cuales han participado muchas personas, como son los diferentes miembros de la Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética, los compañeros que han pasado por el departamento y los amigos y familia que nada tienen que ver con este entorno. A todos ellos quisiera hacer extensiva mi gratitud sin mencionarlos pues son muchos y, directa o indirectamente, ya sea corrigiendo y opinando o simplemente dando ánimo en los momentos clave han hecho posible este trabajo.

Sí quisiera hacer una mención especial a ciertas personas sin las cuales esta Memoria no se habría llevado a cabo, en especial al Dr. Jacinto Lauroba, director de esta tesis, por dirigirla y participar en la misma, a la Dra. Ana Calpena por el interés mostrado, las sugerencias y ayuda recibida de forma desinteresada, a Álvaro Gimeno por el suministro de las mucosas, material imprescindible para realizar el presente trabajo y a Joan Freixes por su ayuda con algunos programas informáticos y la interpretación de las correlaciones conseguidas.

Especial reconocimiento merece el Dr. Doménech, director también de esta tesis, por el seguimiento y supervisión de la misma, sin olvidar la amistad brindada en todo momento.

Y ya por último, agradecer a mi familia el ánimo, paciencia, comprensión y confianza recibidos por su parte.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

1	ASPECTOS GENERALES.....	11
1.1	INTRODUCCIÓN.....	13
1.2	EFEECTO DE PRIMER PASO.....	14
1.2.1	Evidencia del efecto de primer paso.....	15
1.2.2	Consideraciones generales.....	19
1.2.3	Consecuencias terapéuticas.....	20
1.2.4	Métodos de estudio.....	20
1.3	ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA CAVIDAD BUCAL.....	22
1.3.1	Absorción de fármacos a través de mucosa bucal.....	24
1.3.2	Formas farmacéuticas destinadas a acción tópica.....	27
1.3.3	Formas farmacéuticas de absorción sistémica.....	28
1.3.4	Administración bucal.....	28
1.4	BETABLOQUEANTES.....	32
1.4.1	Características fisicoquímicas.....	33
1.4.2	Propiedades farmacológicas.....	34
1.4.2.1	<i>Poder beta-adrenolítico.....</i>	34
1.4.2.2	<i>Corazón.....</i>	35
1.4.2.3	<i>Resistencia periférica total y presión arterial.....</i>	35
1.4.2.4	<i>Coronarias y oxigenación cardíacas.....</i>	36
1.4.2.5	<i>Bronquios.....</i>	36
1.4.2.6	<i>Presión intraocular.....</i>	36
1.4.2.7	<i>Selectividad beta1-adrenérgica.....</i>	37
1.4.3	Características farmacocinéticas.....	37
1.4.3.1	<i>Absorción.....</i>	37
1.4.3.2	<i>Biodisponibilidad.....</i>	38
1.4.3.3	<i>Distribución en el organismo.....</i>	39
1.4.3.4	<i>Disposición biológica y volumen de distribución.....</i>	39
1.4.3.5	<i>Distribución entre eritrocitos y plasma.....</i>	40
1.4.3.6	<i>Unión a proteínas plasmáticas.....</i>	40
1.4.3.7	<i>Metabolismo y eliminación.....</i>	41
1.4.3.8	<i>Metabolitos activos.....</i>	42
1.4.3.9	<i>Semivida de eliminación y aclaramiento.....</i>	42
1.4.3.10	<i>Interés en la medida de los niveles plasmáticos.....</i>	42
1.5	REFERENCIAS.....	45
2	MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
2.1	MATERIAL.....	51
2.1.1	Fármacos.....	51
2.1.2	Reactivos químicos.....	54
2.1.3	Reactivos biológicos.....	55
2.1.4	Soluciones.....	55
2.1.5	Formulaciones farmacéuticas.....	55
2.1.6	Aparatos.....	56
2.1.7	Diseños experimentales.....	56
2.2	METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE PERMEACIÓN BUCAL.....	57
2.2.1	Obtención de la mucosa bucal de cerdo como membrana de permeación.....	57
2.2.1.1	<i>Preparación de la mucosa fresca.....</i>	57
2.2.1.2	<i>Preparación de la mucosa con crioprotector y albúmina.....</i>	57
2.3	MÉTODOS.....	58

2.3.1	Metódica Analítica	58
2.3.2	Validación de la metódica analítica.....	58
2.3.2.1	<i>Selectividad</i>	58
2.3.2.2	<i>Linealidad</i>	59
2.3.2.3	<i>Precisión</i>	59
2.3.2.4	<i>Exactitud</i>	60
2.3.2.5	<i>Límites de cuantificación y de detección</i>	60
2.3.3	Validación de la metódica analítica por CLAE para los estudios de permeación transmucosa de cerdo.....	61
2.3.4	Preparación de las Formulaciones Farmacéuticas.....	61
2.3.4.1	<i>Soluciones saturadas de betabloqueante</i>	61
2.3.5	Estudio de permeación transbucal ex vivo.....	61
2.3.5.1	<i>Célula de difusión</i>	61
2.3.5.2	<i>Membrana de difusión</i>	62
2.3.5.3	<i>Solución receptora</i>	63
2.3.5.4	<i>Técnica del ensayo de permeación</i>	63
2.3.5.5	<i>Tratamiento de los datos experimentales</i>	64
2.3.5.6	<i>Determinación de las concentraciones de fármaco teóricas en estado de equilibrio estacionario</i>	64
2.3.6	Estudio estadístico.....	65
2.3.7	Estimación del coeficiente de reparto.....	65
2.3.8	Estudio de relación estructura-actividad (QSAR).....	66
2.4	REFERENCIAS.....	69
3	RESULTADOS.....	71
3.1	VALIDACIÓN DE LA METÓDICA ANALÍTICA.....	73
3.1.1	Validación de la metódica analítica por CLAE para los estudios de la permeación bucal.....	73
3.1.1.1	<i>Selectividad</i>	76
3.1.1.2	<i>Linealidad</i>	76
3.1.1.3	<i>Precisión y exactitud</i>	83
3.1.1.4	<i>Límite de cuantificación y límite de detección</i>	86
3.2	ESTUDIO DE PERMEACION BUCAL EX VIVO.....	87
3.2.1	Estudio de permeación intrínseca.....	87
3.2.1.1	<i>Cantidades permeadas acumuladas en función del tiempo</i>	87
3.2.1.2	<i>Parámetros de permeación</i>	104
3.2.1.3	<i>Concentraciones teóricas de fármaco en estado de equilibrio estacionario</i>	110
3.3	ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	110
3.3.1	Estudio comparativo entre la mucosa bucal fresca y congelada.....	110
3.3.1.1	<i>Cantidades permeadas</i>	110
3.3.1.2	<i>Parámetros de permeación</i>	111
3.3.2	Estudio comparativo entre los betabloqueantes ensayados.....	112
3.3.2.1	<i>Cantidades permeadas</i>	112
3.3.2.2	<i>Parámetros de permeación</i>	113
3.4	ESTIMACIÓN DEL COEFICIENTE DE REPARTO.....	115
3.5	RESUMEN DE LOS VALORES DE LOS PARAMETROS ESTUDIADOS.....	115
3.6	ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (QSAR).....	116
3.7	REFERENCIAS.....	117
4	DISCUSIÓN.....	119
4.1	REFERENCIAS.....	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1	Puntos de pérdida de fármaco antes de acceder a circulación sistémica.....	18
Tabla 1-2	Características de las distintas zonas de la cavidad bucal.....	24
Tabla 1-3	Efecto y potencia de los betabloqueantes.....	35
Tabla 1-4	Propiedades farmacocinéticas de algunos betabloqueantes	38
Tabla 2-1	Condiciones cromatográficas de los betabloqueantes.....	58
Tabla 3-1	Valores de la pendiente y ordenada en el origen de las rectas de calibración en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 que correlacionan las concentraciones teóricas de acebutolol (x) y las concentraciones experimentales (y) para cada ámbito de concentraciones. Se acompañan del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r ²).	77
Tabla 3-2	Valores de la pendiente y ordenada en el origen de las rectas de calibración en solución reguladora de fosfatos a pH 7.4 que correlacionan las concentraciones teóricas de atenolol (x) y las concentraciones experimentales (y) para cada ámbito de concentraciones. Se acompañan del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r ²).	78
Tabla 3-3	Valores de la pendiente y ordenada en el origen de las rectas de calibración en solución reguladora de fosfatos a pH 7.4 que correlacionan las concentraciones teóricas de labetalol (x) y las concentraciones experimentales (y) para cada ámbito de concentraciones. Se acompañan del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r ²).	79
Tabla 3-4	Valores de la pendiente y ordenada en el origen de las rectas de calibración en solución reguladora de fosfatos a pH 7.4 que correlacionan las concentraciones teóricas de metoprolol (x) y las concentraciones experimentales (y) para cada ámbito de concentraciones. Se acompañan del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r ²).	80
Tabla 3-5	Valores de la pendiente y ordenada en el origen de las rectas de calibración en solución reguladora de fosfatos a pH 7.4 que correlacionan las concentraciones teóricas de oxprenolol (x) y las concentraciones experimentales (y) para cada ámbito de concentraciones. Se acompañan del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r ²).	81
Tabla 3-6	Valores de la pendiente y ordenada en el origen de las rectas de calibración en solución reguladora de fosfatos a pH 7.4 que correlacionan las concentraciones teóricas de propranolol (x) y las concentraciones experimentales (y) para cada ámbito de concentraciones. Se acompañan del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r ²)	82

Tabla 3-7	Concentraciones teóricas y experimentales correspondientes a cada recta de validación de la metodología analítica inter día del acebutolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 en el ámbito de concentraciones entre 0.2 – 30 µg/mL. Se acompañan de los valores medios, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y error relativo porcentual (Er%).....	83
Tabla 3-8	Concentraciones teóricas y experimentales correspondientes a cada recta de validación de la metodología analítica inter día del atenolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 en el ámbito de concentraciones entre 0.05 – 30 µg/mL. Se acompañan de los valores medios, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y error relativo porcentual (Er%).....	83
Tabla 3-9	Concentraciones teóricas y experimentales correspondientes a cada recta de validación de la metodología analítica inter día de labetalol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 en el ámbito de concentraciones entre 0.05 – 30 µg/mL. Se acompañan de los valores medios, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y error relativo porcentual (Er%).....	84
Tabla 3-10	Concentraciones teóricas y experimentales correspondientes a cada recta de validación de la metodología analítica inter día de metoprolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 en el ámbito de concentraciones entre 0.2 – 30 µg/mL. Se acompañan de los valores medios, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y error relativo porcentual (Er%).....	84
Tabla 3-11	Concentraciones teóricas y experimentales correspondientes a cada recta de validación de la metodología analítica inter día de oxprenolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 en el ámbito de concentraciones entre 0.1 – 30 µg/mL. Se acompañan de los valores medios, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y error relativo porcentual (Er%).....	85
Tabla 3-12	Concentraciones teóricas y experimentales correspondientes a cada recta de validación de la metodología analítica inter día de propranolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 en el ámbito de concentraciones entre 0.05 – 30 µg/mL. Se acompañan de los valores medios, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y error relativo porcentual (Er%).....	85
Tabla 3-13	Valores medios y desviación estándar (DE) de los límites de detección y cuantificación de cada uno de los betabloqueantes obtenidos en la validación inter día de las metodologías analíticas	86
Tabla 3-14	Concentración de las soluciones saturadas (C ₀) utilizadas en el ensayo de permeación bucal intrínseca	87
Tabla 3-15	Cantidades permeadas acumuladas en mucosa bucal fresca a los tiempos prefijados	88
Tabla 3-16	Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas en mucosa bucal fresca a los tiempos prefijados	88
Tabla 3-17	Cantidades permeadas acumuladas en mucosa bucal congelada a los tiempos prefijados	89

Tabla 3-18	Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas en mucosa congelada a los tiempos prefijados	89
Tabla 3-19	Cantidades permeadas acumuladas de acebutolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados	92
Tabla 3-20	Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas de acebutolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados.....	92
Tabla 3-21	Cantidades permeadas acumuladas de atenolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados.....	93
Tabla 3-22	Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas de atenolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados	93
Tabla 3-23	Cantidades permeadas acumuladas de labetalol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados.....	94
Tabla 3-24	Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas de labetalol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados.....	94
Tabla 3-25	Cantidades permeadas acumuladas de metoprolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados	95
Tabla 3-26	Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas de metoprolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados.....	95
Tabla 3-27	Cantidades permeadas acumuladas de oxprenolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados	96
Tabla 3-28	Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas de oxprenolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados	96
Tabla 3-29	Cantidades permeadas acumuladas de propranolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados	97
Tabla 3-30	Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas de propranolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados.....	97
Tabla 3-31	Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P1, P2, Kp, J, Tl y TMWL) obtenidos para la solución de propranolol a través de mucosa fresca aplicando un modelo de dosis infinitas	104
Tabla 3-32	Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P1, P2, Kp, J, Tl y TMWL) obtenidos para la solución de propranolol a través de mucosa congelada aplicando un modelo de dosis infinitas.....	105
Tabla 3-33	Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P1, P2, Kp, J, y Tl) obtenidos para la solución de acebutolol a través de mucosa bucal porcina aplicando un modelo de dosis infinitas	106
Tabla 3-34	Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P1, P2, Kp, J, y Tl) obtenidos para la solución de atenolol a través de mucosa bucal porcina aplicando un modelo de dosis infinitas	107
Tabla 3-35	Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P1, P2, Kp, J, y Tl) obtenidos para la solución de labetalol a través de mucosa bucal porcina aplicando un modelo de dosis infinitas	107

Tabla 3-36	Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P1, P2, Kp, J, y Tl) obtenidos para la solución de metoprolol a través de mucosa bucal porcina aplicando un modelo de dosis infinitas	108
Tabla 3-37	Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P1, P2, Kp, J, y Tl) obtenidos para la solución de oxprenolol a través de mucosa bucal porcina aplicando un modelo de dosis infinitas	108
Tabla 3-38	Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P1, P2, Kp, J, y Tl) obtenidos para la solución de propranolol a través de mucosa bucal porcina aplicando un modelo de dosis infinitas	109
Tabla 3-39	Valores de los parámetros correspondientes a los betabloqueantes ensayados. Cee(t)=valor teórico, Cee(T)=valor terapéutico. Se considera un área de permeación efectiva de 2.5cm ²	110
Tabla 3-40	Homogeneidad de variancias y normalidad obtenidos para el estudio comparativo de las cantidades permeadas acumuladas de propranolol a través de mucosa fresca y congelada	111
Tabla 3-41	Homogeneidad de variancias y normalidad de los parámetros de permeación obtenidos para el propranolol a través de mucosa fresca y congelada.....	112
Tabla 3-42	Análisis estadístico aplicado a los parámetros de permeación del propranolol obtenidos a través de mucosa fresca y congelada	112
Tabla 3-43	Homogeneidad de variancias y normalidad obtenidos para el estudio comparativo de las cantidades permeadas acumuladas de una serie de betabloqueantes a través de mucosa bucal	113
Tabla 3-44	Homogeneidad de variancias obtenidos para el estudio comparativo de los parámetros de permeación de una serie de betabloqueantes a través de mucosa bucal.....	114
Tabla 3-45	Normalidad obtenida para el estudio comparativo de los parámetros de permeación de una serie de betabloqueantes a través de mucosa bucal	114
Tabla 3-46	Análisis estadístico aplicado a los parámetros de permeación obtenidos de una serie de betabloqueantes a través de mucosa bucal.....	114
Tabla 3-47	Valores de pKa, logaritmo del coeficiente de distribución a pH 7.4 (log D _{pH7.4}), logaritmo del coeficiente de reparto (log P) y coeficiente de reparto (P) obtenidos para los distintos betabloqueantes	115
Tabla 3-48	Resumen de los valores de los parámetros biofarmacéuticos y fisicoquímicos de los distintos betabloqueantes	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1	Evidencia del efecto de primer paso [4].....	15
Figura 1-2	Perfiles metabólicos diferentes según la vía de administración del fármaco [4].....	16
Figura 1-3	Perfiles metabólicos diferentes según la vía de administración del fármaco [4].....	17
Figura 1-4	Tránsito de un fármaco a través del tracto intestinal [4].....	17
Figura 1-5	Método de Cassidy y Houston (administración del fármaco: vía oral (p.o.); hepatoportal (h.p.); intravenosa (i.v.); intrarterial (i.a.))[5].....	21
Figura 1-6	Composición de la cavidad bucal [6].....	22
Figura 1-7	Disposición de la mucosa bucal [6].....	23
Figura 1-8	Absorción bucal de una serie de ácidos orgánicos en humanos (▲Butanoico, Δ Dodecanoico, x Octanoico □ Decanoico, ■Hexanoico,▼Nonanoico, ○ Heptanoico, ● Undecanoico) [7].....	26
Figura 1-9	Concentraciones plasmáticas subsiguientes a la administración bucal e intramuscular de la morfina [8].....	27
Figura 1-10	Concentraciones medias de diclofenaco en plasma, por perfusión endovenosa (3 mg/h, ●) y por administración bucal (27 mg, ○) [10]......	29
Figura 1-11	Zona anatómica de la mucosa bucal para la administración de fármacos mediante formas farmacéuticas mucoadhesivas [11].....	30
Figura 1-12	Sistemas de liberación mucoadhesivos [11].....	32
Figura 1-13	Estructura química general de los betabloqueantes.....	33
Figura 2-1	Estructura química del hidrocloreto de acebutolol.....	51
Figura 2-2	Estructura química del atenolol.....	52
Figura 2-3	Estructura química del hidrocloreto de labetalol.....	52
Figura 2-4	Estructura química del tartrato de metoprolol.....	53
Figura 2-5	Estructura química del hidrocloreto de oxprenolol.....	53
Figura 2-6	Estructura química del hidrocloreto de propranolol.....	54
Figura 2-7	Equipo de muestreo manual de células de Franz.....	56
Figura 2-8	Célula de difusión tipo Franz.....	62
Figura 2-9	Mucosa bucal porcina.....	62
Figura 2-10	Proceso de corte de la mucosa bucal porcina.....	63
Figura 2-11	Estructura química general de los betabloqueantes.....	66
Figura 3-1	Cromatograma correspondiente a una solución de acebutolol (C=15µg/mL).....	73
Figura 3-2	Cromatograma correspondiente a una solución de atenolol (C=15µg/mL).....	73
Figura 3-3	Cromatograma correspondiente a una solución de labetalol (C=15µg/mL).....	74
Figura 3-4	Cromatograma correspondiente a una solución de metoprolol (C=15µg/mL).....	74

Figura 3-5	Cromatograma correspondiente a una solución de oxprenolol (C=15µg/mL)	75
Figura 3-6	Cromatograma correspondiente a una solución de propranolol (C=15µg/mL)	75
Figura 3-7	Representación gráfica de las rectas de calibración de acebutolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 utilizadas para los diferentes márgenes de concentración.....	77
Figura 3-8	Representación gráfica de las rectas de calibración de atenolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 utilizadas para los diferentes márgenes de concentración.....	78
Figura 3-9	Representación gráfica de las rectas de calibración de labetalol en solución reguladora de fosfatos pH de 7.4 utilizadas para los diferentes márgenes de concentración.....	79
Figura 3-10	Representación gráfica de las rectas de calibración de metoprolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 utilizadas para los diferentes márgenes de concentración.....	80
Figura 3-11	Representación gráfica de las rectas de calibración de oxprenolol en solución reguladora de fosfatos pH 7.4 utilizadas para los diferentes márgenes de concentración.....	81
Figura 3-12	Representación gráfica de las rectas de calibración de propranolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 utilizadas para los diferentes márgenes de concentración.....	82
Figura 3-13	Cantidades permeadas acumuladas de propranolol (µg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación bucal de la solución saturada de propranolol a través de mucosa bucal fresca.....	90
Figura 3-14	Cantidades permeadas acumuladas de propranolol (µg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de propranolol a través de mucosa bucal congelada.....	90
Figura 3-15	Cantidades medias ± DE permeadas acumuladas de propranolol (µg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación bucal de la solución saturada de propranolol a través de mucosa bucal fresca.....	91
Figura 3-16	Cantidades medias ± DE permeadas acumuladas de propranolol (µg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de propranolol a través de mucosa bucal congelada.....	910
Figura 3-17	Cantidades permeadas acumuladas de acebutolol (µg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de acebutolol	98
Figura 3-18	Cantidades medias ± DE permeadas acumuladas de acebutolol (µg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de acebutolol	98
Figura 3-19	Cantidades permeadas acumuladas de atenolol (µg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de atenolol.....	99

Figura 3-20	Cantidades medias \pm DE permeadas acumuladas de atenolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de atenolol	99
Figura 3-21	Cantidades permeadas acumuladas de labetalol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de labetalol	100
Figura 3-22	Cantidades medias \pm DE permeadas acumuladas de labetalol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de labetalol	100
Figura 3-23	Cantidades permeadas acumuladas de metoprolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de metoprolol	101
Figura 3-24	Cantidades medias \pm DE permeadas acumuladas de metoprolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de metoprolol	101
Figura 3-25	Cantidades permeadas acumuladas de oxprenolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de oxprenolol	102
Figura 3-26	Cantidades medias \pm DE permeadas acumuladas de oxprenolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de oxprenolol	102
Figura 3-27	Cantidades permeadas acumuladas de propranolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de propranolol	103
Figura 3-28	Cantidades medias \pm DE permeadas acumuladas de propranolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de propranolol	103
Figura 3-29	Representación de las cantidades medias permeadas acumuladas de propranolol a través de mucosa fresca y congelada. Se acompaña el valor del test de Friedman	111
Figura 3-30	Representación de las cantidades medias permeadas acumuladas de los betabloqueantes través de mucosa. Se acompaña el valor del test de Friedman	113

ASPECTOS GENERALES

1 ASPECTOS GENERALES

Como consecuencia de las dificultades que presenta la obtención de una nueva molécula que mejore la actividad terapéutica de los fármacos dentro de un grupo farmacológico, la industria farmacéutica orienta sus estudios de investigación en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas o de vías de administración alternativas. La presente Memoria está centrada en estudiar la vía bucal como potencial vía de administración de fármacos empleando una serie de betabloqueantes como fármacos de estudio.

Se emplea mucosa de cerdo fresca en un estudio comparativo de la permeación de los betabloqueantes y, por otra parte, se investiga la influencia de la congelación de la mucosa en el proceso de permeación de los fármacos.

1.1 INTRODUCCIÓN

El diseño de formas farmacéuticas destinadas a ser administradas por vía extravasal en general, y por vía oral en particular, tienen como motivo fundamental situar al fármaco que contienen en la zona de absorción en condiciones óptimas de absorbabilidad. Sin embargo, para que un fármaco desarrolle su actividad farmacológica de forma que se obtenga la respuesta terapéutica esperada, una vez disuelto en la zona anatómica de absorción, deberá atravesar las membranas biológicas que separan la zona de absorción de la circulación sistémica a fin de que a través de la misma pueda acceder a la “biofase” o lugar de acción. El proceso de absorción, por consiguiente, juega un papel fundamental en la respuesta farmacológica de los principios activos, es más, puede afirmarse que dicho proceso puede ser limitativo del rendimiento terapéutico de los fármacos y, por ello, responsable de su potencial utilización clínica.

Por los motivos expuestos, los estudios acerca del potencial paso de los fármacos a través de las membranas biológicas han sido tema de investigación por parte de numerosos investigadores pertenecientes a distintas escuelas de diferentes países [1, 2, 3]. Mayoritariamente los fármacos, disueltos en los líquidos biológicos presentes en la zona de absorción, atraviesan las membranas por difusión pasiva de acuerdo con la ley de Fick. Es importante que la membrana absorbente, anatómicamente, esté situada en una región del organismo bien irrigada con el fin de que el fármaco tras atravesar la membrana acceda con facilidad a la circulación sistémica y se distribuya con rapidez hasta la “biofase” en la que se ha instalado la alteración patológica.

En otro orden de cosas, en la actualidad, debido a las dificultades que presenta la obtención de nuevos fármacos seguros y eficaces, la investigación en el campo de la farmacia está orientada a diseñar nuevas formas de dosificación y, muy especialmente, nuevas vías de administración alternativas a la vía oral y que presenten ventajas sustanciales a esta vía por ser la más utilizada en clínica.

Una de las vías alternativas de administración que ha merecido especial atención, es la vía bucal. Cabe considerar que la cavidad bucal es una zona de entrada para determinados fármacos formulados en formas de liberación apropiada que permiten poner el fármaco en contacto con la mucosa bucal. El sistema venoso que irriga la cavidad bucal, permite que el fármaco pueda acceder rápidamente a la circulación sistémica a través de la vena yugular, evitando el efecto de primer paso que puedan sufrir algunos fármacos administrados por vía

oral. En primer lugar, eluden la acción del pH gástrico sobre las moléculas que no son ácido resistentes y la acción de los enzimas y microflora presentes en el tracto intestinal. En segundo lugar, debido a que los fármacos administrados por vía oral, tras su absorción a través de la vena porta, accede toda la cantidad de principio activo absorbido al hígado. La administración de fármacos a través de la cavidad bucal evita, en el primer ciclo de circulación, su paso por la glándula hepática. Este hecho hace, para muchos fármacos, que aumente su biodisponibilidad tanto en magnitud como en velocidad y, como consecuencia su actividad terapéutica. Por ejemplo, la metiltestosterona proporciona una biodisponibilidad del 40% más elevada por vía bucal que por vía oral. Resulta evidente que la metiltestosterona se biotransforma en el intestino, en el hígado o en ambos lugares a la vez. Análogamente sucede con los nitritos y nitratos orgánicos que presentan una mayor biodisponibilidad por vía bucal que por vía oral debido al efecto de primer paso que sufren estos compuestos.

1.2 EFECTO DE PRIMER PASO

Muchos fármacos se administran por vía oral u otras vías extravasculares por comodidad y conveniencia. La cantidad de fármaco que alcanza el órgano diana depende no solo de las características fisicoquímicas (que determinan la cantidad de fármaco que puede atravesar las distintas barreras fisiológicas del organismo), sino también del metabolismo que tiene lugar antes de que el fármaco acceda a la circulación sistémica, y que puede producirse en el tracto gastrointestinal, hígado y pulmón. El metabolismo y la excreción realizada por estos órganos, antes de que fármaco pueda alcanzar la circulación sistémica se conoce como eliminación presistémica o efecto de primer paso.

El efecto de primer paso puede definirse como: “Fenómeno por el cual algunos fármacos son metabolizados entre el lugar de su absorción y su paso a la circulación sistémica”. Se entiende por efecto de primer paso la pérdida de fármaco o, mejor dicho, de una fracción de la dosis administrada, al pasar por primera vez, durante el proceso de absorción, por los órganos de eliminación. En general, se acepta que el concepto de metabolismo o eliminación presistémica es más amplio, incluyendo también los procesos de pérdida que puede sufrir el fármaco en el lumen gastrointestinal, como consecuencia de una descomposición no metabólica o bien debido a un metabolismo intestinal local ocasionado por los enzimas intestinales o por la flora bacteriana.

Un efecto de primer paso importante puede limitar el uso de ciertos fármacos administrados por vía oral. Por ejemplo, la lidocaína es un antiarrítmico eficaz pero se administra por vía parenteral debido a un metabolismo presistémico. Aunque en teoría sería posible administrar una dosis elevada, no es una posibilidad práctica, primero porque hay elevadas diferencias interindividuales en la cantidad de metabolismo presistémico y segundo porque los metabolitos generados en el hígado son más tóxicos que el compuesto inicial. Al igual que ocurre con la lidocaína y otros muchos fármacos, el efecto de primer paso, tiene importancia clínica, farmacocinética, farmacológica y toxicológica.

1.2.1 Evidencia del efecto de primer paso

Puede ponerse de manifiesto la existencia de un efecto de primer paso, si se observa alguno de los casos siguientes:

- a) En el estudio cinético de los fármacos se puede hallar situaciones como se muestra en la parte superior de la figura 1-1, en la que un fármaco administrado a la misma dosis por vía intravenosa y extravascular produzca curvas de niveles plasmáticos con perfiles similares. En este caso, la biodisponibilidad del fármaco, es decir, la fracción de fármaco que accede a la circulación sistémica tras la administración extravasal sería del 100%, ya que la relación de las áreas bajo las curvas extravasal e intravenosa, en este caso sería 1.

Se puede presentar otra situación como, se muestra la parte inferior de la figura 1-1, en la que el valor de AUC tras una administración extravascular resulta muy inferior al valor de AUC obtenido por vía intravenosa habiéndose administrado las mismas dosis. Se podría interpretar que la causa es una baja absorción del fármaco, pero no es este el caso ya que por los estudios de cantidad de fármaco recuperado en orina (en forma inalterada y metabolitos), se concreta que se recoge prácticamente toda la dosis administrada. Descartada la no absorbabilidad del fármaco y la correcta liberación del principio activo a partir de la forma farmacéutica diseñada, se presenta una situación clara de que el fármaco referenciado sufre un efecto de primer paso.

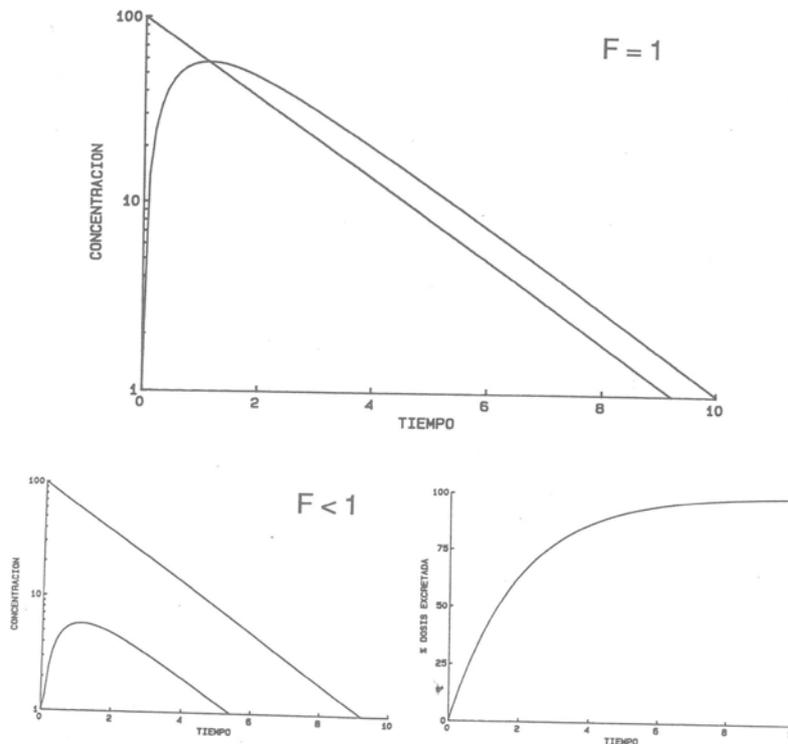


Figura 1-1 Evidencia del efecto de primer paso [4]

- b) Otra evidencia clara de la existencia de un efecto de primer paso o de eliminación presistémica, se puede hallar comparando los perfiles metabólicos que se presentan tras la administración de un fármaco por diferentes vías (Figura 1-2). Los símbolos negros corresponden a amitriptilina (fármaco inalterado) tras la administración oral de 50 mg (-----) e intramuscular a la dosis de 25 mg (- - - - -) a un voluntario sano. Los símbolos vacíos corresponden al metabolito nortriptilina tras la administración oral (-----) e intramuscular (- - - - -). Las concentraciones plasmáticas de metabolito alcanzan el máximo mucho antes por vía oral que por vía intramuscular. Este hecho es indicativo que la entrada del metabolito por vía oral es más rápida que por vía intramuscular. La biodisponibilidad de la amitriptilina está comprendida entre un 30-60%.

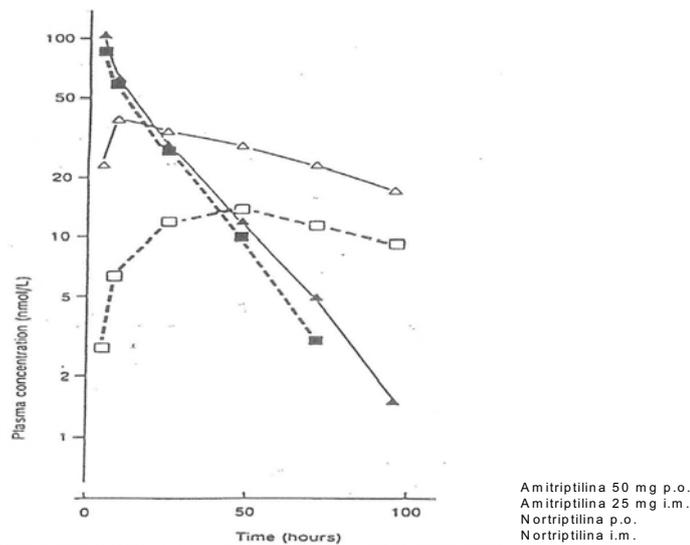
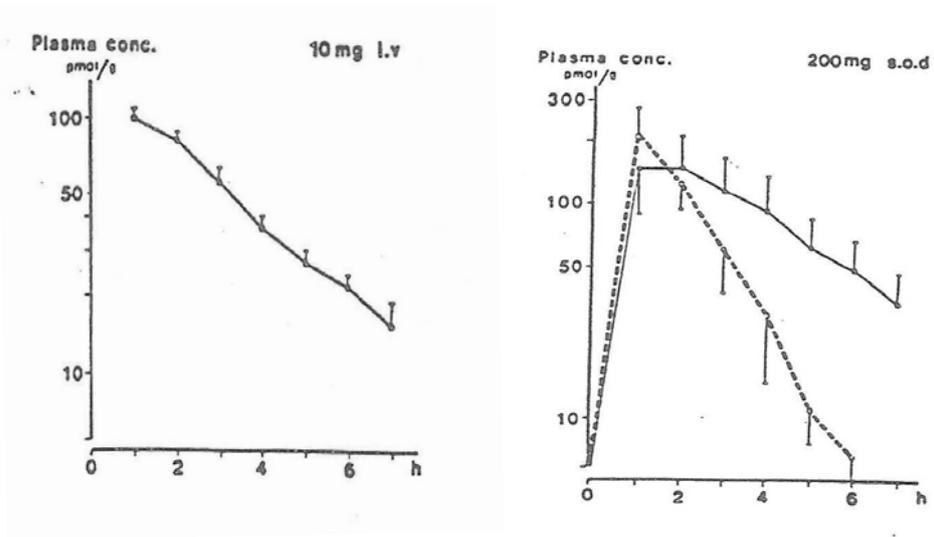


Figura 1-2 Perfiles metabólicos diferentes según la vía de administración del fármaco [4]

En la figura 1-3, puede observarse que cuando un fármaco sufre un efecto de primer paso intenso, las concentraciones de metabolito pueden ser superiores después de la administración oral que intravenosa y en algunos casos, como el que se expone en la figura 1-3, para el alprenolol, solo se halla el 4-hidroxiaprenolol (metabolito activo) después de la administración oral. Puede observarse que por vía oral, para tener concentraciones de alprenolol similares a las halladas por vía intravenosa, se deben utilizar formas farmacéuticas con dosis muy superiores.



Alprenolol
4-OH alprenolol

Figura 1-3 Perfiles metabólicos diferentes según la vía de administración del fármaco [4]

En ambos casos, si la biodisponibilidad es inferior a uno y la absorción es mayor, o bien cuando se observan perfiles metabólicos distintos según la vía de administración (ya sea con metabolitos distintos o bien con distinta velocidad de aparición o en distinta magnitud), se puede considerar un efecto de primer paso o eliminación presistémica.

¿Cómo se explica el hecho de que aparezcan concentraciones de fármaco bajas conociendo que no se debe a una falta de absorción?

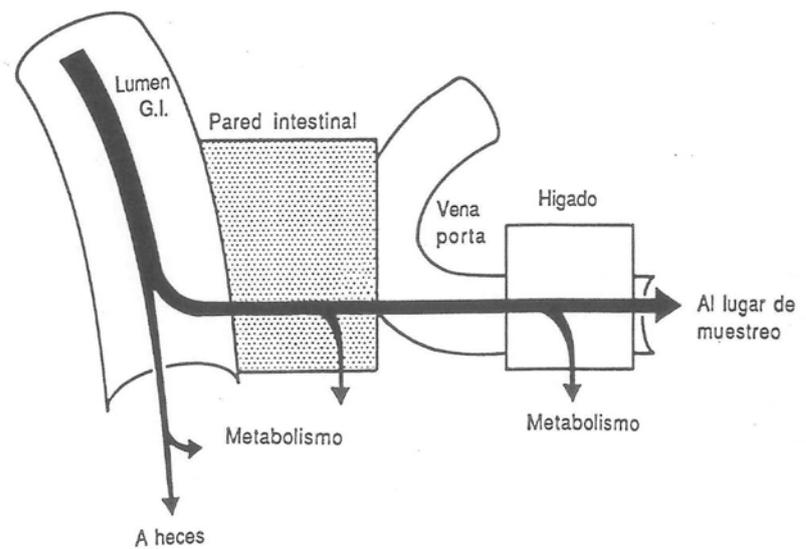


Figura 1-4 Tránsito de un fármaco a través del tracto intestinal [4]

Si se observa el camino que tiene que recorrer el fármaco, tras su administración oral, hasta alcanzar la circulación sistémica, pueden concretarse los diferentes puntos de pérdida (Figura 1-4).

Fármaco en heces: si se encuentra fármaco inalterado en heces puede ser debido a:

- Mala absorción del principio activo
- Mal diseño biofarmacéutico de la forma farmacéutica
- Existencia de un ciclo enterohepático

La aparición de fármaco en heces es importante cuantificarla pero no se encuentra incluida como eliminación presistémica. Excluido de que el fármaco se puede hallar en heces, un primer punto de posible pérdida es la descomposición de fármaco en el tracto gastrointestinal.

Si se supone que el fármaco sobrepasa la destrucción en el lumen gastrointestinal, el siguiente paso es atravesar la pared intestinal. En este caso el fármaco puede sufrir una segunda posibilidad de destrucción por acción de los enzimas presentes en las células columnares que configuran la estructura intestinal, en este caso, el fármaco tampoco sería detectado en la circulación general.

El siguiente paso es la incorporación del fármaco a la vena porta y su paso por el hígado. En la glándula hepática, el fármaco puede ser metabolizado en gran proporción y, si se produce este proceso, tampoco se encontraría fármaco en la circulación sistémica.

Cualquier pérdida de fármaco que se produzca durante el proceso de absorción dará lugar a una disminución de las concentraciones de fármaco en sangre. Son procesos de eliminación previos antes de que el fármaco alcance la circulación sistémica; por ello, se conocen como eliminación presistémica. Debido a que hasta que el fármaco no abandona el tracto gastrointestinal no se considera absorbido, cuando el fármaco se administra por vía oral, se considera únicamente efecto de primer paso las pérdidas de fármaco debidas a la eliminación por enzimas gastrointestinales, flora microbiana, enzimas situadas en las células columnares del intestino y el hígado en el transcurso del proceso de absorción.

A modo de resumen, en la tabla 1-1 se esquematizan los posibles puntos de pérdida de fármaco antes de acceder a la circulación sistémica:

Tabla 1-1 Puntos de pérdida de fármaco antes de acceder a circulación sistémica

FRACCIÓN NO ABSORBIDA	Pérdida directa por heces del medicamento inalterado	
	Descomposición no metabólica en el tracto gastrointestinal	METABOLISMO O ELIMINACIÓN PRESISTÉMICA
Metabolismo intestinal local		
En fluidos intestinales		
Por acción de la microflora intestinal		
FRACCIÓN ABSORBIDA	En epitelio intestinal durante la absorción (EPP)	
	Metabolismo hepático en el primer ciclo de circulación (EPP)	

- 1) Pérdida en heces del fármaco inalterado. Se considera fármaco no absorbido
- 2) Descomposición no metabólica en el tracto gastrointestinal.
- 3) Metabolismo intestinal local: en fluidos intestinales, por acción de la microflora intestinal
- 4) Metabolismo a nivel de la glándula hepática.

Un esquema de lo expuesto se consigna en la figura 1-4.

1.2.2 Consideraciones generales

¿El efecto de primer paso es siempre desfavorable?

La respuesta debe matizarse. La definición de efecto de primer paso indica la pérdida de fármaco y, en general, ésta pérdida de fármaco va asociada a una disminución del efecto terapéutico siempre y cuando el producto inalterado sea el responsable del efecto terapéutico del fármaco. Por ejemplo, la morfina sufre un efecto de primer paso desfavorable que puede paliarse aumentando la dosis sin llegar a la toxicidad.

En los casos que la modificación estructural del fármaco por el efecto de primer paso de lugar a metabolitos activos, el efecto de primer paso será favorable para la acción terapéutica. Por ejemplo: la imipramina se transforma en desipramina (metabolito activo); la sulfasalazina se metaboliza en sufapiridina + 5-ASA (metabolito activo).

¿El efecto de primer paso es previsible?

Puede comentarse que es difícilmente previsible. Cabe considerar que fármacos con estructuras químicas similares lo sufren. Este hecho ocurre con el ácido acetilsalicílico pues también sufre efecto de primer paso el éster fosfórico del ácido salicílico. Sin embargo, en el caso de los betabloqueantes, que tienen estructura química similar y además similar actividad terapéutica, algunos de ellos sufren un efecto de primer paso hepático intenso (propranolol, metoprolol, oxprenolol), mientras que otros lo sufren más moderado (atenolol, nadolol), pero en cualquier caso, todos los betabloqueantes sufren efecto de primer paso.

¿El efecto de primer paso puede atenuarse?

El efecto de primer paso es de naturaleza metabólica en el que se hallan implicadas reacciones enzimáticas. Estas reacciones son saturables. Por lo tanto, la atenuación dependerá de que la dosis administrada sea suficiente para saturar los procesos enzimáticos y además es necesario que la dosis elevada no produzca efectos tóxicos.

Otro sistema de atenuar el efecto de primer paso es el uso de “profármacos”. Los “profármacos” son compuestos en los cuales el fármaco está unido a una sustancia inerte. Cuando se produce el efecto de primer paso, se separa el producto inerte del fármaco y éste accede a la circulación sistémica con lo que se atenúa la alteración del principio activo.

1.2.3 Consecuencias terapéuticas

¿Qué consecuencias terapéuticas tiene la existencia de una eliminación presistémica?

- 1). Para fármacos que no den lugar a metabolitos activos y que sufran un efecto de primer paso importante, la consecuencia terapéutica será el requerir dosis orales muy superiores a las intravenosas para alcanzar concentraciones plasmáticas equivalentes.
- 2). Si se produce un efecto de primer paso intenso, significa que la fracción de dosis que se escapa del metabolismo es pequeña y como consecuencia en clínica se producirá una gran variabilidad en las respuestas entre los distintos individuos. En resumen, se presenta una gran dificultad para establecer regímenes posológicos correctos.
- 3). Otra consecuencia clínica de un efecto de primer paso intenso, es el que puede llegar a inutilizar la vía de administración. Por ejemplo, la vía oral no se utiliza para fármacos como la lidocaína, naloxona, insulina, etc. Por ello es importante seleccionar otras vías alternativas a la vía de administración oral.

1.2.4 Métodos de estudio

Para los estudios del efecto de primer paso, pueden utilizarse métodos “in vitro” e “in situ” y métodos “in vivo”.

Métodos “in vitro” e “in situ”

Consisten en aislar células o tejidos de órganos en los cuales se desea comprobar su capacidad para metabolizar al fármaco; hecho que se observa, después de incubar el fármaco con las preparaciones de tejido y la aparición de metabolitos.

El estudio del metabolismo que produce la flora intestinal puede realizarse “in vitro” si se demuestra la capacidad de la flora para producir un metabolito en un tiempo prudencial ya que alargar el tiempo de incubación puede modificar la flora. Consiste en incubar bacterias con el fármaco y observar la aparición de metabolitos.

Los métodos “in vitro” e “in situ”, pueden proporcionar información solamente cualitativa.

Métodos “in vivo”

Se basan en la utilización de modelos fisiológicos, que son modelos en los que intervienen medidas del flujo sanguíneo a distintos niveles y se realizan tomas de muestras en distintos puntos mediante la utilización de catéteres. Son métodos complejos y muy especializados.

Otro método consiste en comparar valores de AUC obtenidos por diferentes vías de administración que permite cuantificar de forma relativamente fácil los efectos de primer paso a nivel de diferentes órganos, tal como se muestra en el esquema de la figura 1-5.

El método, se basa en calcular la tasa de extracción (E) de cada órgano, la tasa de extracción total y la biodisponibilidad (F) final, tal como se detalla en el esquema que se expone a continuación:

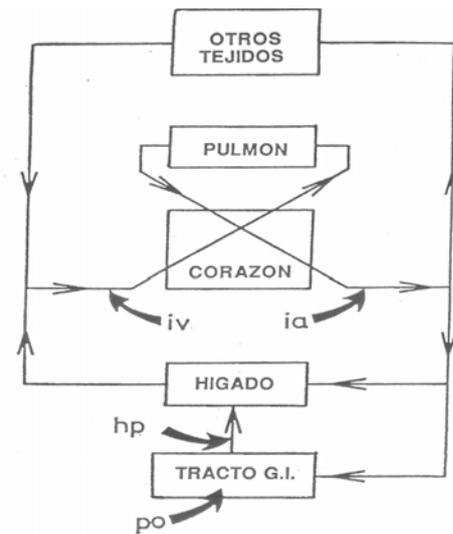


Figura 1-5 Método de Cassidy y Houston (administración del fármaco: vía oral (p.o.); hepatoportal (h.p.); intravenosa (i.v.); intrararterial (i.a.)) [5]

Se trata del método de Cassidy y Houston que utiliza la rata como animal de experimentación. En cada caso, se administra el fármaco en la zona anterior del órgano que se pretende estudiar, y se toman muestras de sangre en la posterior del órgano. A partir de los datos experimentales se estima, en cada caso, el área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC). Teniendo en cuenta que la tasa de extracción (E) equivale a:

$$E = 1 - F \quad \text{(Ecuación 1-1)}$$

siendo F la biodisponibilidad del fármaco, puede calcularse el valor de la tasa de extracción en cada caso.

Vía intrararterial: E=0; es la vía de administración que se toma como referencia.

Vía intravenosa:
$$E_{i.v.} = 1 - \frac{(AUC)_{i.v.}}{(AUC)_{i.a.}} \quad \text{(Ecuación 1-2)}$$

Vía hepatoportal:
$$E_{h.p.} = 1 - \frac{(AUC)_{h.p.}}{(AUC)_{i.v.}} \quad \text{(Ecuación 1-3)}$$

Vía oral:
$$E_{v.o.} = 1 - \frac{(AUC)_{v.o.}}{(AUC)_{h.p.}} \quad \text{(Ecuación 1-4)}$$

A partir de la ecuación 1-1, el valor de la biodisponibilidad es igual a:

$$F = 1 - E \quad \text{(Ecuación 1-5)}$$

Por consiguiente el efecto de primer paso total será el siguiente:

$$\text{Tasa de extracción total} = E_{i.v.} \cdot E_{h.p.} \cdot E_{v.o.} \quad \text{(Ecuación 1-6)}$$

Y el de la biodisponibilidad final será:

$$\text{Biodisponibilidad final} = F_{i.v.} \cdot F_{h.p.} \cdot F_{v.o.} \quad \text{(Ecuación 1-7)}$$

1.3 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA CAVIDAD BUCAL

La cavidad bucal está dividida en dos regiones:

- a) El vestíbulo exterior, que está limitado por las mejillas y los labios.
- b) El vestíbulo interior oral, delimitado por los arcos maxilares y mandibulares.

En su parte posterior, existen grandes acúmulos de tejido linfoide formado por las amígdalas; incluso, puede haber pequeños nódulos linfáticos en la mucosa del paladar blando; ambos tipos de formaciones tienen una misión importante en las defensas antiinfecciosas.

Como lugar de administración se distinguen cuatro zonas: La zona bucal, que corresponde al recubrimiento del vestíbulo exterior, mejillas y labios, la zona sublingual, que como su nombre indica, corresponde a la parte inferior de la lengua, la gingival, que son las encías y la palatal que comprende el velo del paladar y la lengua fundamentalmente. En la figura 1-6, se expone la composición de la cavidad bucal.

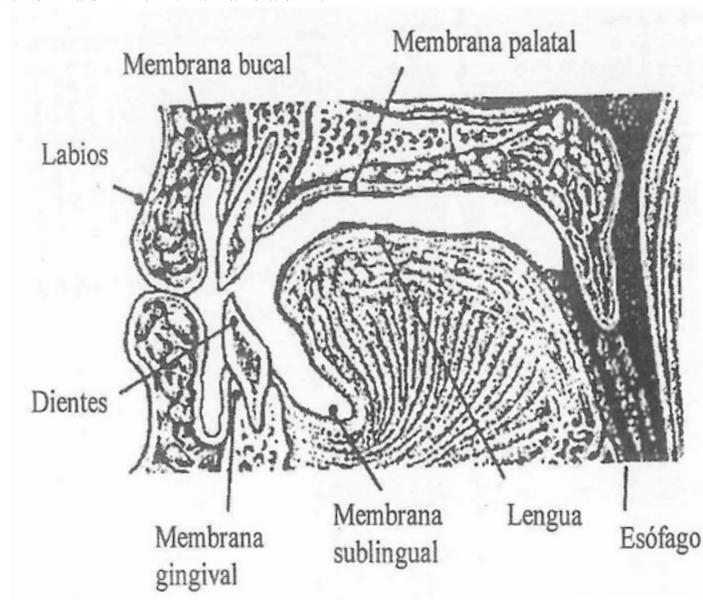


Figura 1-6 Composición de la cavidad bucal [6]

En general, la mucosa bucal consta de:

- a) El epitelio bucal.
- b) La membrana basal, que conecta el epitelio bucal a la Lamina propia.
- c) La Lamina propia, formada por tejido conjuntivo laxo.
- d) La capa submucosa con tejido conjuntivo laxo y tejido conjuntivo glandular con la mayor parte de los vasos sanguíneos y los nervios.

Estos elementos están dispuestos sobre una capa muscular o hueso. La disposición anatómica de la mucosa bucal, se consigna en la figura 1-7.

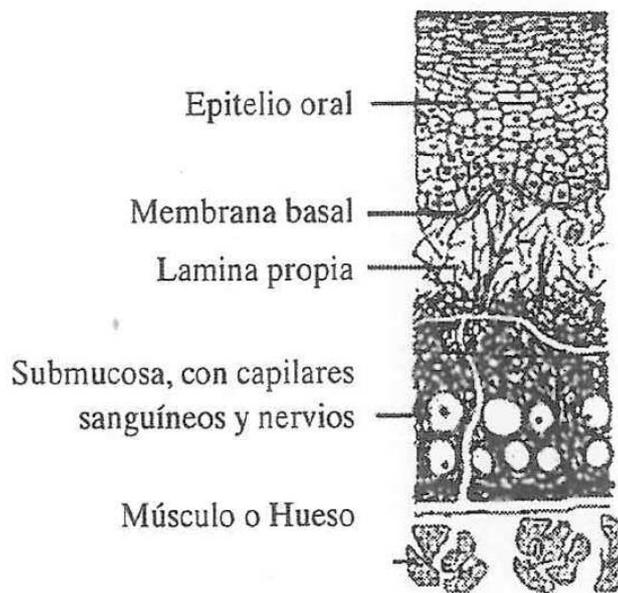


Figura 1-7 Disposición de la mucosa bucal [6]

El epitelio de la mucosa bucal es poliestratificado, similar a los restantes órganos. Está formado por una membrana basal mitóticamente activa, sobre la que se sitúan capas de células progresivamente diferenciadas que se descaman en la zona más superficial. El recambio del epitelio bucal, es decir, la migración de una capa hasta la superficie, dura unos 5-6 días, y éste se puede considerar también como un valor promedio para toda la mucosa bucal. A medida que las células maduran y migran desde la capa basal hasta la superficie, aumentan de tamaño y se hacen progresivamente más aplanadas, al tiempo que incrementan su contenido en filamentos proteicos y pierden orgánulos citoplasmáticos.

La composición de esta capa varía de acuerdo con las funciones del tejido; así en el paladar duro y la lengua, que son mucosas masticatorias sujetas a fuerzas de distensión, el epitelio se encuentra queratinizado como la epidermis, mientras que el recubrimiento del interior de las mejillas y de la región sublingual es distensible y no queratinizado. Asimismo, la composición lipídica varía de acuerdo con esta clasificación: en las zonas queratinizadas se presenta una alta proporción de ceramidas y acilceramidas compuestos apolares que se han asociado a la función de barrera, y que están en menor concentración en las restantes zonas.

El grosor del epitelio también es diferente según su localización. La zona bucal se compone de unas 40 a 50 capas de células, mientras que la zona sublingual es más delgada (Tabla 1-2).

Tabla 1-2 Características de las distintas zonas de la cavidad bucal

TEJIDO	LOCALIZACIÓN	ESPESOR (µm)	QUERATINIZACIÓN	NATURALEZA DE LOS LÍPIDOS
Bucal (50 cm ²)	Interior de las mejillas y de los labios superior e inferior	500 - 600	No	Polar
Sublingual (26.5 cm ²)	Frenillo y base de la boca	100 - 200	No	Polar
Gingival	Encías	200	Sí	Apolar
Palatal	Paladar superior y lengua	250	Sí	Apolar

En general, la vía bucal está más vascularizada que la oral. Casi todo el retorno venoso procedente de la zona se incorpora a la vena yugular interna, lo cual tiene trascendencia para la absorción sistémica oral. Asimismo se encuentran capilares linfáticos en la *Lamina propia* que aparecen como canalículos ciegos en las papilas.

Por otra parte, la cavidad oral contiene la mayor variedad de microorganismos presentes en el organismo humano. La entrada en el cuerpo de éstos y cualquier otro producto tóxico está limitada por el epitelio oral que realiza una función de barrera.

La mucosa bucal tiene, asimismo, sensibilidad al dolor, tacto y temperatura, además del sentido exclusivo del sabor. En este aspecto, existen algunos mecanismos protectores que responden a estímulos sensoriales que provienen de la boca, como el inicio de tragar o provocar arcadas. Con todos ellos es necesario contar a la hora de diseñar formas farmacéuticas destinadas a esta vía de administración.

Otro punto de vital importancia es su papel de secretor de saliva, pues determina que la boca se halle permanentemente húmeda, y esto repercute directamente en su capacidad de absorción. Asimismo, influye en la velocidad de disolución de la forma farmacéutica. Se puede secretar hasta 1 litro de saliva por día, si bien varía entre un flujo de saliva en reposo de 0,5 ml min⁻¹, y más de 7 ml min⁻¹ bajo máxima estimulación parasimpática.

Las glándulas salivares principales son la *parótida*, la *submaxilar* y la *sublingual*. Están situadas algo alejadas de la mucosa y se abren a la cavidad oral a través de un largo conducto. Glándulas salivares de menor entidad se pueden encontrar inmediatamente por debajo de la mucosa bucal. La saliva es viscosa, incolora y opalescente e hipotónica comparada con el plasma (entre 110 y 330 miliosmoles por litro). Su pH varía entre 6,2 y 7,4 (de alto a bajo flujo de producción), pero la actividad bacteriana sobre los azúcares puede reducir el pH hasta valores de 3 a 4 cerca de los dientes.

1.3.1 Absorción de fármacos a través de mucosa bucal

La permeabilidad media de la mucosa bucal, considerada globalmente, es intermedia entre la percutánea y la intestinal. Evidentemente, debido a las estructuras y funciones de sus partes, existen diferencias considerables en su permeabilidad. Así, en principio, cabría establecer el orden decreciente: sublingual > bucal > palatal > gingival pues la mucosa sublingual es la más delgada, la bucal es más gruesa y la palatal y gingival se encuentran queratinizadas.

La barrera más efectiva para la penetración de los solutos se cree que está en el cuarto superior del epitelio y su capacidad depende de su grosor y de su posible queratinización, tal como se muestra en la figura 1-7. La membrana basal actúa como barrera únicamente para microorganismos y aunque puede suponer una cierta resistencia a la penetración de compuestos, no es nunca el paso limitante. La Lamina propia, a su vez, es insuficiente densa para oponerse al paso incluso de moléculas grandes y, por otra parte, su matriz hidratada debería facilitar el paso de productos hidrófilos.

Al igual que en el caso de otros epitelios, es necesario distinguir entre dos posibles caminos de difusión: clásicamente se designan como transcelular y paracelular. El camino de permeación transcelular es mayoritario y supone la difusión en las membranas lipídicas de las células. De nuevo en este caso existe una diferencia notable en la velocidad de penetración en función de la zona que se considere, fundamentalmente según la constitución de la barrera epitelial que es el paso limitativo. La ruta paracelular se encuentra en el espacio que existe entre las células; supone que el epitelio tenga una matriz accesible y que el soluto pueda difundir en el medio intercelular.

En todo caso, la absorción parece que se realiza mayoritariamente por difusión pasiva entre la fase acuosa, constituida por la saliva, y la fase lipófila, que es la capa lipídica de la membrana.

Se absorben bien una gama de compuestos con un coeficiente de reparto (aceite/agua) entre 40 y 2000. Las moléculas más hidrófilas son demasiado polares y sólo penetran en la mucosa al dosificarlas en altas concentraciones. Si la lipofilia sobrepasa el valor de 4000, los compuestos tienen una solubilidad demasiado baja en agua; la absorción de estos compuestos está limitada por su velocidad de disolución.

Evidentemente es necesario que el compuesto se halle en solución y, puesto que la cantidad de fase acuosa, es decir, la saliva, es pequeña, sólo pueden usarse medicamentos suficientemente solubles que se dosifiquen a muy baja concentración, de 10 a 15 mg.

Si se acepta como general, el mecanismo de difusión pasiva, es obvio que también influirá en la absorción el grado de ionización, el cual depende del pKa del fármaco y del pH de la zona. Éste se mantiene entre 6,2 y 7,4 gracias al poder regulador de la saliva. No obstante, puede modificarse mediante la incorporación de soluciones reguladoras de pH a los excipientes de la forma farmacéutica, dado que el volumen de líquido es, como se ha indicado, pequeño (Figura 1-8).

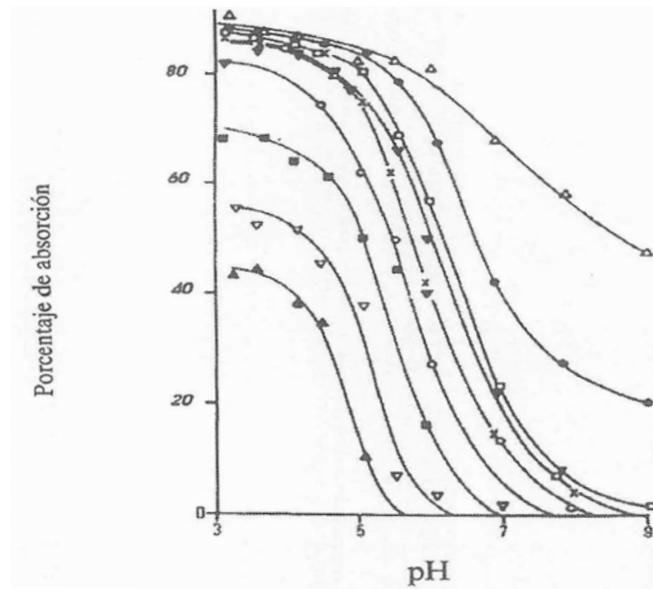


Figura 1-8 Absorción bucal de una serie de ácidos orgánicos en humanos (▲ Butanoico, △ Dodecanoico, x Octanoico □ Decanoico, ■ Hexanoico, ▼ Nonanoico, ○ Heptanoico, ● Undecanoico) [7]

Además de estos condicionantes no pueden administrarse sustancias con mal sabor o amargas, porque condicionan un aumento de secreción salival, que redundaría en la deglución de parte de la dosis.

Por otra parte, la irrigación sanguínea es muy buena, lo cual conduce a una absorción lucrativa si concurren los factores analizados. Además esta vía permite evitar el efecto de primer paso, ya que la sangre que drena la cavidad oral accede directamente a la cava superior, lo que se ha podido demostrar para varios fármacos.

Otro efecto muy interesante es que si se puede controlar la liberación del fármaco en la zona denominada bucal, el fármaco se absorbe rápidamente al inicio pero luego aparece un perfil de absorción continuo y lento, indicando que el epitelio se comporta como un reservorio. Este fenómeno fue comprobado por Davis B.J. y col. 1979 [9], quienes consiguieron una difusión inversa, es decir, del epitelio al líquido, al lavar la boca con una solución de pH adecuado. Esto se debe, probablemente, a alguna forma de unión entre el epitelio y el fármaco.

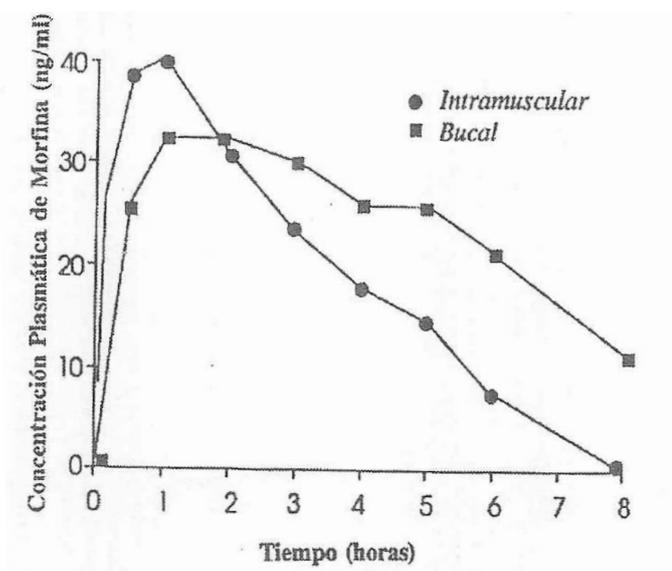


Figura 1-9 Concentraciones plasmáticas subsiguientes a la administración bucal e intramuscular de la morfina [8]

1.3.2 Formas farmacéuticas destinadas a acción tópica

Son las formas de administración bucal más difundidas. En general tienen como misión corregir o prevenir las afecciones buco-faríngeas: dolor de dientes, infecciones bacterianas o fúngicas, aftas, estomatitis y para facilitar el movimiento de los dientes. En consecuencia los fármacos que se incorporan a la forma farmacéutica son: antisépticos y desinfectantes, antifúngicos, anestésicos locales, antiinflamatorios, expectorantes y prostaglandinas. Evidentemente, estos principios activos son compuestos efectivos en condiciones de administración discontinua; además, este tipo de administración permite alcanzar altas concentraciones pero por un espacio de tiempo corto.

Las formas farmacéuticas destinadas a una acción tópica, *in situ*, se deben colocar en la parte superior de la lengua, cerca del velo del paladar. Como se ha comentado, esta zona, se halla recubierta de una mucosa gruesa, rígida y queratinizada en la zona del paladar duro. Esto hace que el paso del fármaco a la sangre sea poco efectivo, con lo que el fármaco liberado actuará, fundamentalmente, sobre la cavidad oral y faríngea. La cantidad de fármaco que accede por vía digestiva o directamente a la sangre ha de ser y en cierto modo se consigue, ínfima.

Estas formas farmacéuticas son tradicionalmente enjuagues y comprimidos de acción tópica. En general, como se ha reseñado, proveen altas concentraciones de fármaco durante periodos cortos de tiempo.

Deben formularse con objeto de que provean una disolución lenta, uniforme y suave, es decir, una *erosión* durante un periodo de tiempo largo (5 a 10 min). En la actualidad, se está mejorando el tiempo de contacto de los fármacos destinados a una acción tópica mediante otras estrategias como son comprimidos mucoadhesivos, geles, pomadas y algunas formas de dosificación fijas en la dentadura. Sin embargo, por su localización, se incrementa inevitablemente el porcentaje absorbido.

1.3.3 Formas farmacéuticas de absorción sistémica

Tienen las localizaciones preferentes que se han comentado anteriormente, de las que toman su nombre. En el caso de las *formas bucales*, se colocan en las bolsas de las mejillas o entre la encía y el labio. Y debajo de la lengua, como su nombre indica, en el caso de *comprimidos sublinguales*. Tal como se ha descrito, en ambas situaciones la mucosa oral es muy poco compacta y se halla muy bien irrigada, por lo que es de esperar una absorción sistémica lucrativa, tanto más cuanto que eluden los efectos de primer paso hepático e intestinal.

Además de esta ventaja, existen otros condicionantes que permiten su consideración como vías alternativas de dosificación. Entre ellos:

- Posibilidad de interrupción brusca del tratamiento, lo que se consigue con la simple retirada de la forma de dosificación.
- Escasa importancia de los fenómenos de metabolismo bacteriano.
- Posible alternativa en la administración cuando la vía oral es clínicamente impracticable, como en el caso de dificultades en la deglución, náuseas, síndromes de mala absorción y otras condiciones.

Su principal inconveniente práctico es que el sistema de liberación debe mantenerse en el lugar de administración durante un periodo de tiempo, más o menos largo, en el que se debe evitar hablar, comer, beber o fumar, ya que se provoca deglución de la saliva y con ella parte de la dosis.

Asimismo, y ya en otro orden de ideas, la absorción puede resultar variable, ya que el excesivo flujo salival puede provocar una velocidad de disolución distinta de la prevista o el paso del principio activo disuelto al tracto digestivo, con absorción oral o degradación en ciertos casos. Por otra parte, la velocidad de disolución del fármaco en la formulación puede depender de la posición de la forma farmacéutica, debido a variaciones en la proximidad de las glándulas salivares o por el contenido de agua de la saliva.

1.3.4 Administración bucal

En esta localización, la mucosa oral es menos permeable y no provee una absorción tan rápida como la sublingual. Por otra parte, puesto que es más ancha y plana y permanece relativamente inmóvil, es más adecuada para formulaciones planas, especialmente, de liberación controlada, para fármacos menos fácilmente absorbibles e incluso se ha propuesto para péptidos.

La primera consideración a realizar es, obviamente, que una forma farmacéutica de liberación controlada solo tiene sentido si la semivida de eliminación del fármaco es corta.

Asimismo resultará eficaz si la permeabilidad del epitelio es suficientemente buena. En este aspecto es posible que convenga modificar el entorno de la mucosa por adición de un cosolvente, o modificar el pH para facilitar el reparto del soluto en la misma. También puede requerir el uso de un promotor de absorción (como en la administración transdérmica) o de un inhibidor del metabolismo (fundamentalmente cuando se intenta administrar un principio activo de carácter proteico). Todo ello incrementa considerablemente la complejidad de la forma farmacéutica.

Por otra parte, el desarrollo de una forma farmacéutica solo es válido si se consigue la permanencia de la misma durante un tiempo adecuado. El problema consiste, asimismo, en

encontrar una composición que posea una velocidad de disolución independiente de la secreción salival y actividades como hablar, masticar o beber. Además se debe tener en cuenta la aceptación, por parte del paciente, de este tipo de forma farmacéutica durante periodos mayores de 4 horas; en realidad, sería deseable un periodo de 6 a 12 horas. Finalmente se requiere una evaluación cuidadosa del posible poder irritativo de estos sistemas de liberación sobre la mucosa bucal.

Esto hace que las formulaciones más idóneas para la administración bucal sean parches o comprimidos mucoadhesivos.

Los parches presentan la ventaja de que, por aislar el reservorio del medio, impiden la influencia de la saliva, mucus y enzimas, pero en estos casos, el área de aplicación, los lípidos intercelulares y la queratinización pueden convertirse en factores limitativos, por este motivo la zona más operativa es la mejilla. Existen ensayos en humanos con fármacos que sufren un alto efecto de primer paso, como por ejemplo el diclofenaco, en forma de discos de 1 cm² de un gel hidrófilo formado por el 80% en peso de hidroxietilmetacrilato y el 20% de un ligante macromolecular hidrofóbico. Se adhiere a la mejilla con un material impermeable y adhesivo dental. En la figura 1-10, se puede observar el perfil de la curva de niveles plasmáticos de diclofenaco administrado por perfusión endovenosa y por administración bucal. Es de notar también el periodo de latencia que se presenta, típico de ese efecto reservorio o del establecimiento del gradiente de difusión en el epitelio. Si se calcula el flujo que supone, se obtienen valores 1000 veces superiores al flujo de la piel.

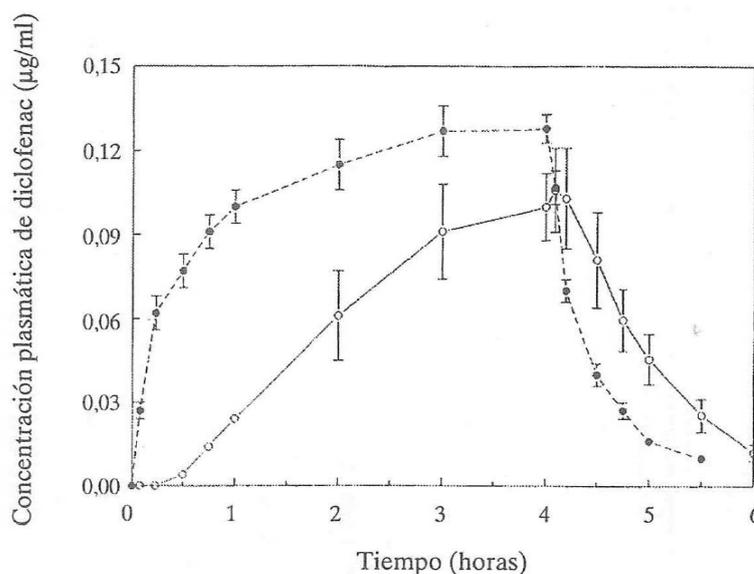


Figura 1-10 Concentraciones medias de diclofenaco en plasma, por perfusión endovenosa (3 mg/h, ●) y por administración bucal (27 mg, ○) [10].

Entre las formas mucoadhesivas se pueden distinguir distintos tipos, muchos de los cuales están en fase inicial de desarrollo; de hecho, las experiencias clínicas se limitan casi por completo a comprimidos mucoadhesivos. La gelificación del excipiente proporciona en todos los casos la bioadherencia y, asimismo, la vía bucal ofrece como ventaja substancial, la inexistencia de efecto de primer paso intestinal o hepático.

En resumen, las ventajas de la vía bucal, puede concretarse en las siguientes:

- En general, zona aceptada por los pacientes para la administración de fármacos.
- Mucosa bastante permeable.
- Mucosa relativamente rica en vasos sanguíneos.
- Periodos de recuperación cortos después de someter la membrana a estrés o lesión.
- Ausencia de células de Langerhans (tolerancia a potenciales alérgenos).
- Evita la acción del pH gástrico para moléculas que no son ácido resistentes.
- Evita el efecto de la acción enzimática y microflora bacteriana presente en el tracto intestinal.
- Evita el efecto de primer paso hepático (primer ciclo de circulación).
- Posibilita la interrupción brusca del tratamiento.
- Posible alternativa en la administración de fármacos cuando la vía oral es impracticable (dificultad de deglución, náuseas, síndrome de mala absorción, etc.).

Como se ha comentado anteriormente, la mejilla es la zona de la mucosa bucal que presenta mayor superficie, no está queratinizada y está muy bien irrigada. Por estas razones es la zona anatómica de la mucosa bucal para la administración de fármacos mediante formas farmacéuticas mucoadhesivas, tal como se expone en la figura 1-11.

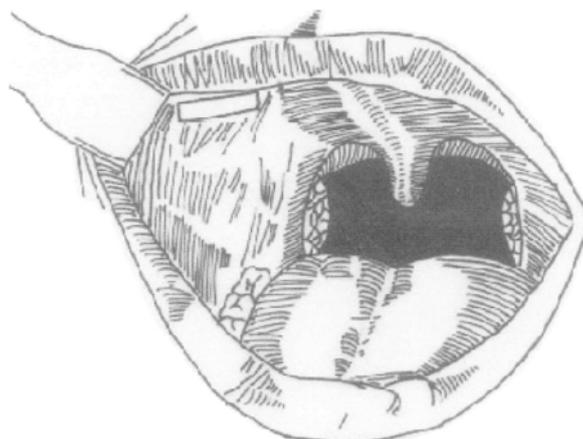


Figura 1-11 Zona anatómica de la mucosa bucal para la administración de fármacos mediante formas farmacéuticas mucoadhesivas [11]

Un ejemplo de estas formulaciones, es la siguiente:

Fármaco	80,0 mg
Methocel	60,4 mg
Policabofil	18,0 mg
Estearato magnésico	1,6 mg

La formulación anterior corresponde a comprimidos mucoadhesivos de un peso de 160 mg [12].

También pueden elaborarse sistemas de liberación mucoadhesivos en los que la capa externa está formulada con lactosa, a fin de que la liberación sea unidireccional hacia la mucosa externa de la mejilla [13].

En la absorción de los fármacos por vía bucal, existen una serie de factores que influyen en el proceso. Entre los más destacados puede citarse los siguientes:

a) Factores biológicos:

- Área
- Espesor efectivo difusional
- Composición oral de la mucosa
- Estructura de la mucosa oral
- pH del entorno
- Velocidad de flujo de la saliva
- Composición de la saliva

b) Factores que dependen del fármaco:

- Gusto
- Solubilidad
- Coeficiente de reparto
- pKa
- Semivida biológica
- Velocidad de absorción
- Potencial irritación
- Potencial efecto alergénico
- Coeficiente de difusión a través del epitelio
- Estabilidad del fármaco

c) Factores que dependen del sistema de liberación

- Características organolépticas de los excipientes
- Características del proceso de liberación
- Potencial retención del fármaco
- Tamaño
- Forma
- Textura
- Potencial irritación y/o respuesta alérgica

En la figura 1-12 se expone un esquema de diferentes sistemas de liberación mucoadhesivos de fármacos:

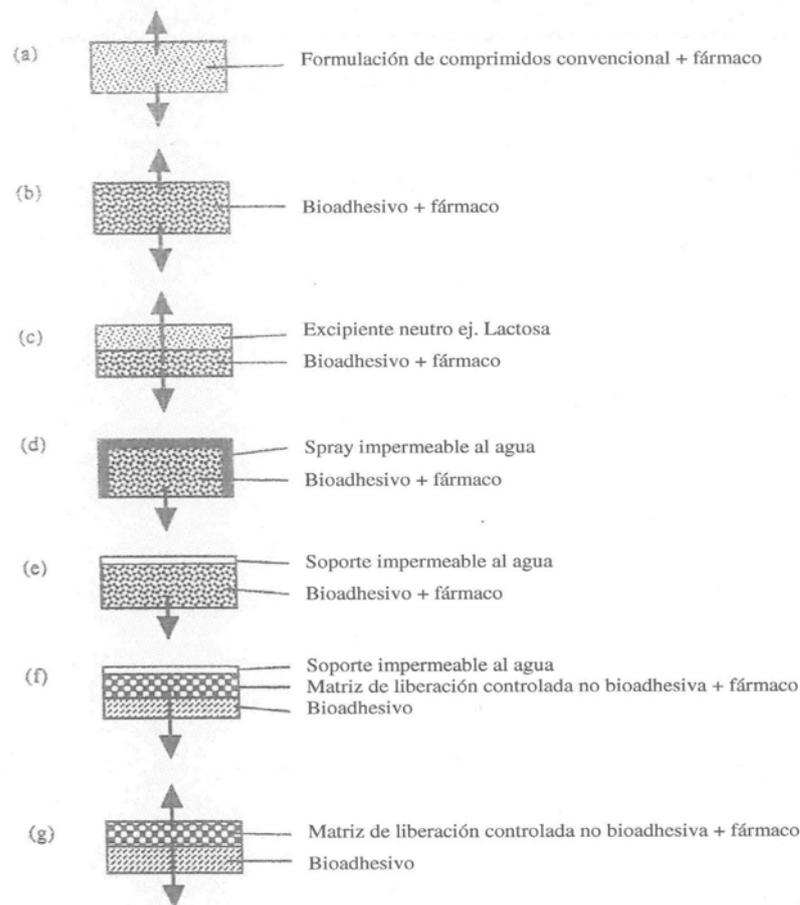


Figura 1-12 Sistemas de liberación mucoadhesivos [11]

En otro orden de cosas, para el estudio “in vitro” del potencial paso de los fármacos a través de la mucosa bucal se emplean diferentes metodologías, una de ellas es la utilización de células de Franz [14]. Como membrana de permeación se coloca entre el compartimiento dador y receptor de la célula la mucosa de cerdo convenientemente tratada. Se trabaja con mucosa bucal de cerdo por ser anatómicamente la más similar a la especie humana [15, 16, 17, 18, 19]. Estos estudios aportan información acerca de la posibilidad de que un fármaco pueda ser administrado por vía bucal.

1.4 BETABLOQUEANTES

Los inhibidores beta-adrenérgicos o betabloqueantes constituyen uno de los avances terapéuticos más importantes en los últimos treinta años en el tratamiento de las alteraciones cardiovasculares y otras enfermedades [20].

Este grupo de medicamentos actúa bloqueando los receptores beta del sistema adrenérgico por lo que son considerados como antagonistas competitivos y específicos de las catecolaminas. En 1967 Lans y col. [21] propusieron subdividir los receptores beta-adrenérgicos en dos grupos: los receptores beta₁, presentes fundamentalmente en el corazón y los receptores beta₂, presentes en los bronquios y vasos periféricos. Sin embargo en un mismo tejido u

órgano pueden coexistir receptores beta1 y beta2 [22], como en el corazón, y en determinadas condiciones, por ejemplo, bajo influencias hormonales, puede variar la concentración de receptores en un tejido.

La estimulación de receptores beta conlleva un aumento de la frecuencia y de la fuerza de contracción cardíaca, aumento de la liberación de renina y lipólisis (liberación de ácidos grasos), así como relajación intestinal. La estimulación de los receptores beta2 provoca relajación uterina, broncodilatación, vasodilatación, gluconeogénesis y liberación de insulina. Los fármacos betabloqueante, en consecuencia, disminuyen o anulan todas las respuestas secundarias a la activación de los receptores beta.

El desarrollo de nuevas moléculas en este campo ha conducido a la obtención, a partir de betabloqueantes no selectivos y capaces de suprimir todos los efectos beta-adrenérgicos (tipo propranolol), de sustancias capaces de bloquear selectivamente los receptores beta1 (bloqueantes beta o cardioselectivos) como por ejemplo, el atenolol y metoprolol, y de bloqueantes selectivos de los receptores beta2, como la butoxamina.

La evolución del conocimiento sobre la acción de estos fármacos ha puesto de manifiesto diferentes fenómenos que deberán tenerse en cuenta en su posterior utilización clínica. Entre estos cabe citar:

- a) La selectividad beta1 o beta2 adrenérgica es relativa y se ejerce únicamente dentro de un cierto ámbito de dosis.
- b) Ciertos fármacos betabloqueantes presentan actividad agonística parcial, comúnmente denominada actividad simpaticomimética intrínseca (AIS).
- c) Existen receptores beta-adrenérgicos presinápticos (autoreceptores) cuya función fisiológica no está perfectamente dilucidada aunque parecen ser sensibles a concentraciones reducidas de los mediadores y su respuesta es acelerar la salida del mismo (autoaceleración) con lo que el bloqueo de dichos receptores presinápticos disminuye, por tanto, la actividad simpática.

De lo expuesto se deduce la idea de la complejidad del tema, pero lo que realmente debe tenerse en cuenta es que la utilización clínica de estos fármacos tendrá interés cuando convenga disminuir el tono simpático, así como las diversas respuestas que de él se deriven.

1.4.1 Características fisicoquímicas

En general, todos los betabloqueantes derivan de una estructura común: N-isopropil-1-hidroxi-2-etilamina (Figura 1-13).

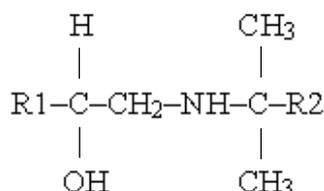


Figura 1-13 Estructura química general de los betabloqueantes

Una parte aromática (R1) actúa como auténtica moduladora de las propiedades físicoquímicas de los betabloqueantes, propiedades que, a la vez, condicionan las características farmacocinéticas de las diferentes moléculas que configuran este grupo terapéutico.

Por otro lado, el agrupamiento N-isopropil (ocasionalmente N-terbutil u otros radicales ampliamente ramificados) es el que determina el bloqueo beta-adrenérgico.

El hidroxilo alifático da a la molécula actividad óptica, siendo la forma levo (-) mucho más activa como bloqueador beta que la forma dextro (+). Esta diferencia es útil para distinguir entre los efectos sobre los receptores beta y las de otras acciones farmacológicas. Por ejemplo, la forma (+) del propranolol tiene menos de un uno por ciento de la potencia de la forma (-) para bloquear receptores adrenérgicos beta, pero los isómeros son equipotentes como anestésicos locales [23]. Sin embargo, en clínica generalmente se utiliza la mezcla racémica debido a que en la práctica resulta difícil separar los dos isómeros; lo que, por otra parte, conlleva un costo muy elevado.

Los agentes de bloqueo beta-adrenérgico son sustancias de carácter básico débil y su pKa oscila entre 8.1 y 9.8 [24].

1.4.2 Propiedades farmacológicas

La farmacología de los agentes que bloquean los receptores adrenérgicos beta se deduce de las funciones reguladas por los receptores implicados y los estados fisiológicos y patológicos en que dichas funciones son activadas. Entre las propiedades más importantes destacan:

1.4.2.1 Poder beta-adrenolítico

Es la propiedad común a todos estos fármacos. Los betabloqueantes no selectivos se oponen de manera competitiva a todos los efectos beta-adrenérgicos. En el plano clínico esto se traduce en la supresión de todos los tonos simpáticos con soporte beta-adrenérgico, por la eliminación de los efectos beta de las catecolaminas y por la reducción de las reacciones de adaptación al organismo al esfuerzo, al estrés, etc. bajo el control beta-adrenérgico.

Al ejercer estos efectos los betabloqueantes no muestran la misma potencia, tal como se expone en la tabla 1-3. Sin embargo, la existencia de betabloqueantes con potencia distinta pierde relevancia en el plano clínico, al utilizarse dosis equitativas de los mismos.

Tabla 1-3 Efecto y potencia de los betabloqueantes

FARMACO	I.P.A.	S.A. β_1	A.S.I.	A.A.L.
alprenolol	0.3-1	0	++	+
atenolol	1	+	0	0
bevantolol	-	+	-	-
bufuralol	-	0	+	+
bunolol	50	0	0	0
metoprolol	1	+	0	+
oxprenolol	0.5-1	0	++	+
penbutolol	0.5-20	0	+	+
pronetolol	-	0	+	+
propranolol	1	0	0	+
timolol	6	0	0	0

I.P.A: Intensidad del poder adrenolítico (propranolol=1)

S.A. β_1 : Selectividad adrenérgica β_1 (cardioselectividad)

A:S:I: Actividad simpaticomimética intrínseca

A.A.L: Actividad anestésica local

1.4.2.2 Corazón

Los betabloqueantes, por supresión del tono acelerador cardíaco tienden a disminuir la frecuencia cardíaca en reposo, pero sobre todo en el esfuerzo. Este efecto será menos marcado en las sustancias que posean actividad simpaticomimética intrínseca (ASI). La fuerza contráctil cardíaca estará igualmente disminuida por la acción de los betabloqueantes.

El gasto cardíaco se reduce generalmente en las mismas proporciones que la frecuencia ya que el volumen de eyección sistólica no está sensiblemente modificado. Estas disminuciones de frecuencia y gasto cardíaco provocadas tras administrar una primera dosis de betabloqueante, se mantendrán a lo largo de un tratamiento prolongado.

1.4.2.3 Resistencia periférica total y presión arterial

Los efectos de los betabloqueantes sobre la presión arterial son bifásicos:

- En un primer estadio (tras administración intravenosa u oral de una primera dosis de fármaco) el gasto cardíaco disminuye; pero, por un mecanismo reflejo compensatorio, la resistencia periférica aumenta en las mismas proporciones y la presión arterial no varía. Si el betabloqueante tiene ASI, ni el gasto cardíaco, ni la resistencia periférica sufrirán apenas variación.
- En un segundo estadio (varias horas después de una primera administración a lo largo de un tratamiento prolongado) la presión arterial disminuye progresivamente. No se ha dilucidado el mecanismo del cual depende este efecto antihipertensor, pero una explicación verosímil puede ser que exista una pérdida gradual del aumento reflejo de la resistencia periférica como respuesta a la disminución del gasto cardíaco [25].

En caso de que el fármaco posea actividad simpaticomimética intrínseca (ASI) existe, por el contrario, una disminución de la resistencia periférica (efecto beta2 vascular) que explica la caída tensional [26].

1.4.2.4 Coronarias y oxigenación cardíacas

Existen diversos factores que condicionan las variaciones que se puedan producir en el flujo coronario bajo el efecto de los betabloqueantes.

El primero de ellos es la reducción del trabajo cardíaco (debido a la disminución de la frecuencia), de la función inotrópica del gasto y de la presión cardíaca lo que tiende, por autorregulación metabólica, a reducir el flujo sanguíneo coronario.

El segundo factor es el alargamiento del tiempo de llenado diastólico, consecuencia de la bradicardia, lo que permite, sobre todo en reposo, una mejor perfusión de la red coronaria.

El tercer factor lo constituye la ruptura del equilibrio, a nivel de los vasos coronarios, entre los receptores alfa1 y beta2 adrenérgicos, lo que entraña una vasoconstricción relativa que tiende a reducir el flujo coronario, sobre todo a nivel del epicardio, permitiendo de este modo una redistribución de la sangre coronaria, favorable al endocardio, tanto a nivel del miocardio sano como isquémico [27].

Globalmente, el flujo sanguíneo coronario varía poco o disminuye ligeramente bajo el efecto de los betabloqueantes; pero, evidentemente, el corazón trabajará en condiciones de oxigenación muy mejoradas.

En condiciones de esfuerzo, los betabloqueantes reducen la taquicardia, la subida de presión, el trabajo y el consumo de oxígeno cardíacos, mejorando de este modo la tolerancia al esfuerzo.

1.4.2.5 Bronquios

El bloqueo de las receptores beta-adrenérgicos bronquiales (beta2, 70% y beta1, 39%) provoca una broncoconstricción. Por este motivo, los bloqueantes beta1 cardioselectivos presentan una menor incidencia en accidentes broncoespásmicos en enfermos asmáticos, aunque dichas reacciones adversas son siempre posibles. La prudencia aconseja no administrar betabloqueantes en caso de enfermos con antecedentes de síndromes obstructivos bronquiales.

1.4.2.6 Presión intraocular

Los betabloqueantes disminuyen la secreción del humor acuoso y con ello la presión intraocular. Por este motivo algunos de ellos son utilizados en el tratamiento del glaucoma de ángulo abierto. La principal ventaja de los betabloqueantes en el glaucoma es que tienen una buena eficacia, no afectan al diámetro pupilar ni a la acomodación. En cambio, con el tiempo aparece una cierta taquifilaxia, que hace disminuir el efecto; manteniéndose, sin embargo, una reducción de la presión intraocular, moderada pero suficiente.

1.4.2.7 Selectividad beta1-adrenérgica

Se trata de la propiedad que tienen ciertos inhibidores beta1-adrenérgicos de bloquear únicamente los receptores beta1, es decir, aquellos situados principalmente a nivel del corazón o del aparato yuxttaglomerular. Esta propiedad es relativa y se ejerce únicamente entre cierto ámbito de dosis.

En la tabla 1-3, se muestra la selectividad beta1 (cardioselectividad) de varios betabloqueantes.

Las ventajas potenciales de los betabloqueantes beta1-selectivos sobre los no selectivos pueden resumirse en las siguientes:

- 1) Con respecto a los receptores beta2-bronquiales, una mayor seguridad, aunque no absoluta, en el aspecto respiratorio de los individuos asmáticos.
- 2) Con respecto a los receptores beta2-vasculares, aseguran el mantenimiento de los efectos vasodilatadores periféricos de las catecolaminas circulantes y del equilibrio entre receptores alfa y beta-adrenérgicos, lo que puede inducir una disminución en la frecuencia de efectos secundarios (tipo síndrome de Raynaud) y una mayor tolerancia al esfuerzo en determinados tipos de enfermos.
- 3) Con respecto a los receptores implicados en la glicogenolisis, un menor riesgo de agravamiento en los estados hipoglicémicos.

1.4.3 Características farmacocinéticas

Como consecuencia de la actividad farmacológica contrastada de este grupo de fármacos y de su utilidad en clínica, se han realizado amplios estudios acerca del comportamiento farmacocinético de los betabloqueantes, los cuales permiten, por una parte, conocer el tránsito de estos fármacos a través del organismo y, por otra, proporcionan información acerca de sus características a nivel del proceso de absorción; todo ello en conjunto, constituye una base racional para el diseño de una forma farmacéutica óptima en cada caso.

A continuación se detallan las principales características farmacocinéticas de este grupo de fármacos, descritas de forma global, dentro de cada uno de los procesos que ocurren consecutivamente a su administración.

1.4.3.1 Absorción

La vía usual de administración de los betabloqueantes es la oral; por dicho motivo, la mayor parte de las formas farmacéuticas están diseñadas para ser administradas por esta vía. Si la forma farmacéutica ha sido bien diseñada, estos fármacos se absorben bien a lo largo del tracto gastrointestinal, su absorción es superior al 90% para los compuestos de carácter lipófilo, siendo más irregular para los de carácter hidrófilo [28, 29, 30]. La velocidad a la que se absorben estos fármacos puede considerarse relativamente rápida de t_{max} comprendidos entre 0.5 y 4 horas [31, 32, 33], tal como se muestra en la tabla 1-4.

Tabla 1-4 Propiedades farmacocinéticas de algunos betabloqueantes

FÁRMACO	T_{max} (h)	DOSIS ABSORBIDA (%)	F (%)	Vd (L/Kg)	t_{1/2} (h)
atenolol	2-4	40-60	40 - 65	0.7 - 1	6 - 9
metoprolol	0.5-1.5	> 95	30 - 60	5.6	3 - 4
timolol	1-3	70 -90	55 - 75	2 - 2.4	4 - 5
oxprenolol	0.5-1	70 - 90	20 - 75	1.2	1 - 2
alprenolol	0.5-1.5	> 90	10-15	3.4	2 - 3
propranolol	1-3	> 90	30 - 40	3.3 - 5.5	2 - 3
penbutolol	1.5	-	90	10.4	26

El pH de los fluidos gastrointestinales puede afectar significativamente el grado de absorción de los betabloqueantes en las distintas zonas del tracto intestinal. Mención especial merece los estudios sobre la absorción bucal, una de las vías más productivas en la absorción de fármacos. En este sentido, los estudios de absorción bucal del alprenolol a pH inferior a 4 y se ha observado que no se absorbe significativamente en estas condiciones, mientras que lo hace rápidamente si el pH de la mucosa bucal es superior a 4 [30]. Una dependencia similar del pH ha sido descrita para la absorción bucal del propranolol, mientras que para otros fármacos de la misma serie la influencia es menor [34].

Teniendo en cuenta que los betabloqueantes son compuestos de carácter básico, la absorción colónica de estos compuestos debería ser buena. Este hecho ha sido puesto de manifiesto por Domenech y col. [35] que observaron, utilizando la rata como animal de experimentación, que la absorción colónica del metoprolol presentaba una constante de velocidad de absorción superior a la obtenida en el intestino delgado.

1.4.3.2 Biodisponibilidad

En el apartado anterior se ha concretado que el paso de los betabloqueantes a través de las membranas absorbentes es generalmente rápido. Sin embargo, en la actualidad se sabe que no es la fracción de dosis que atraviesa la membrana la que determina la intensidad o el efecto farmacológico, sino la fracción de dosis que accede inalterada a la circulación sistémica.

Como puede observarse en la tabla 1-4, la cantidad de fármaco que se absorbe a través del tracto gastrointestinal, es sustanciosa, en general; no obstante, la biodisponibilidad en magnitud de estos compuestos presenta diferencias importantes. Estudios orientados en este sentido, han puesto de manifiesto que existe una relación directa entre la biodisponibilidad en magnitud y el aclaramiento hepático del betabloqueante en su primer paso a través del hígado; es decir, los compuestos que presentan un aclaramiento hepático bajo poseen una biodisponibilidad elevada y viceversa.

Los betabloqueantes tienden a disminuir el flujo hepático sanguíneo, lo que comporta reducir su aclaramiento hepático y, en consecuencia, aumentan su biodisponibilidad. Asumiendo que la administración de estos fármacos se efectúa a dosis equivalentes, la reducción del flujo sanguíneo a través del hígado afecta en el mismo grado a todos los betabloqueantes, por lo que su aclaramiento hepático está directamente relacionado con la tasa de extracción. Por regla general, para los compuestos de carácter lipófilo (alprenolol, propranolol, oxprenolol, etc.) la tasa de extracción es elevada y por consiguiente su biodisponibilidad en magnitud es

baja, mientras que para las sustancias hidrófilas (nadolol, atenolol, sotalol, etc.) y ciertas sustancias lipófilas (betaxolol, penbutolol) la tasa de extracción es baja o casi nula y en consecuencia su biodisponibilidad elevada.

Por otra parte, deberá tenerse en cuenta que para los betabloqueantes sujetos a un efecto de primer paso, la biodisponibilidad en magnitud es dosis dependiente y, como consecuencia, la fracción de dosis que alcanzará la circulación sistémica será progresivamente más alta a medida que aumenta la dosis administrada. Esto ha sugerido a diversos autores [36] que el proceso de extracción hepática es un fenómeno saturable, de modo que cuando se saturan los sistemas microsomales hepáticos responsables de la extracción, por efecto de la dosis de betabloqueante administrada, se produce un aumento de la biodisponibilidad absoluta. Diferentes autores han dado una explicación de la influencia de la dosis en la biodisponibilidad en magnitud de los betabloqueantes que presentan un bajo valor de este parámetro [37, 38]. Se postula que estos fármacos son extraídos por el hígado mediante dos sistemas distintos: uno de alta afinidad, pero baja capacidad, y otro de baja afinidad, pero de mucha mayor capacidad. Se cree que el sistema de alta afinidad pueda ser el citocromo P450 microsomal y, evidentemente, la saturación de este sistema dará lugar a un aumento de la biodisponibilidad tras la administración de una dosis suficiente para saturar dicho sistema.

En definitiva, la importancia del fenómeno de primer paso es función del nivel de actividad de los microsomas hepáticos, que puede encontrarse estimulada (por inducción enzimática) o por el contrario inhibida (dicumarol, cimetidina, IMAO). Esto podría explicar, junto con factores de tipo genético, las variaciones interindividuales halladas en los niveles hemáticos de una población tras la administración de una dosis única de betabloqueante [30].

En lo que concierne a los betabloqueantes no sujetos a efecto de primer paso, su biodisponibilidad es independiente de la dosis administrada y los niveles hemáticos son directamente proporcionales a las dosis de fármaco administradas.

Debido a que, en general, los betabloqueantes sufren en mayor o menor proporción, efecto de primer paso, se ha postulado la vía bucal como una muy buena alternativa a la vía oral.

1.4.3.3 Distribución en el organismo

En general, los betabloqueantes se unen a diversos tejidos del organismo a través de la circulación sistémica, unión que dependerá del flujo sanguíneo de la zona y de la afinidad del fármaco por los tejidos. Son pocos los estudios realizados en humanos respecto a las características de distribución de los betabloqueantes; sin embargo, se ha demostrado que para alguno de estos fármacos su concentración en plasma no es representativa de la verdadera concentración en sangre, puesto que poseen una alta afinidad por los eritrocitos y las concentraciones hemáticas son sustancialmente más altas que las plasmáticas.

1.4.3.4 Disposición biológica y volumen de distribución

El comportamiento farmacocinético de los betabloqueantes puede asumirse claramente como bicompartimental, a juzgar por la morfología de las curvas de niveles plasmáticos obtenidas tras la administración intravenosa del fármaco [39]. La fase de disposición rápida (fase alfa) es fugaz y el equilibrio de disposición se alcanza en un tiempo comprendido entre 0,5 a

2 horas, consecutivamente a la administración intravenosa. Sin embargo, tras la administración oral de los betabloqueantes en una forma farmacéutica sólida, las curvas de nivel plasmático tienen características biexponenciales, quedando totalmente enmascarada la fase rápida de disposición observada tras administración intravenosa. Este hecho es debido a la baja velocidad de disolución que poseen estos fármacos en los líquidos circundantes al lugar de absorción, hecho que condiciona la velocidad y magnitud de absorción de los mismos. Por este motivo, la distribución extravascular de los betabloqueantes se realiza a una velocidad similar a la de absorción y como consecuencia, queda enmascarada la fase alfa [39].

El volumen aparente de distribución de los betabloqueantes oscila entre 1 y 10 L/kg. En la tabla 1-4, se exponen los volúmenes de distribución (V_d) hallados para algunos de estos compuestos. No obstante, para la mayoría de los betabloqueantes, incluso para los que presentan un volumen de distribución bajo, el valor obtenido excede del máximo espacio fisiológico corporal. Se ha puesto de manifiesto que estos compuestos se acumulan en ciertas zonas extravasculares, observándose que la concentración de betabloqueantes es sustancialmente alta en tejidos correspondientes a órganos tales como el corazón, hígado y pulmones, hallándose concentraciones más altas que las plasmáticas [40, 41].

Además del flujo sanguíneo de la zona, las características fisicoquímicas de los betabloqueantes son uno de los factores que más influyen en su distribución a los tejidos, tanto en velocidad como en cantidad; concretamente su liposolubilidad, debido a que cuanto menor es la polaridad de la molécula más facilidad tiene el compuesto para acceder a los tejidos adiposos. Evidentemente, también aumenta el volumen de distribución cuando descende el porcentaje de unión de estos fármacos a las proteínas plasmáticas.

1.4.3.5 Distribución entre eritrocitos y plasma

Una de las características de los betabloqueantes, en lo que ha distribución se refiere, es que se unen a los eritrocitos en proporciones variables [42]. Este hecho debe tenerse en cuenta en los tratamientos cinéticos de estos fármacos y debe considerarse la posibilidad de que su afinidad especial por los hematíes justifique la utilización de un compartimiento adicional.

1.4.3.6 Unión a proteínas plasmáticas

Los betabloqueantes se unen a las proteínas plasmáticas en proporciones variables, aunque la estimación del porcentaje de unión para un determinado fármaco varía según cual sea la bibliografía consultada, ya que no ha sido utilizado siempre el mismo método para su determinación. No obstante, parece ser que el grado de unión está directamente relacionado con la liposolubilidad ya que los compuestos de carácter lipófilo se unen en mayor proporción que los hidrófilos [43].

Es importante destacar que las variaciones en la tasa de unión a proteínas pueden provocar modificaciones en su volumen de distribución y semivida biológica. Desde un punto de vista teórico, el aclaramiento plasmático se relaciona con el volumen de distribución y la semivida de eliminación, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$t_{1/2} = V_d/Cl \cdot 1,44 \quad \text{(Ecuación 1-8)}$$

Por consiguiente, de acuerdo con la ecuación 1-8, un descenso de la unión a proteínas plasmáticas de los betabloqueantes que se unen a ellas en una proporción del 90% (el propranolol como ejemplo más característico) conlleva un aumento del volumen de distribución y por ello la semivida del fármaco de referencia se hace más larga [36]. En principio, esta aseveración pronunciada por los autores del trabajo no concuerda con el concepto generalizado de que un descenso en la unión a las proteínas plasmáticas lleva como consecuencia a una reducción en la semivida biológica de los fármacos. Los autores justifican su conclusión asumiendo que el aclaramiento de algunos betabloqueantes, por ejemplo el propranolol, no está limitada por la fracción libre de fármaco circulante, es decir, que la extracción del fármaco de la sangre se realiza tanto en forma libre como unido a proteínas. Para los fármacos que poseen esta propiedad (eliminación no limitada por la unión a proteínas plasmáticas), un incremento en la unión a las proteínas plasmáticas disminuirá la semivida de eliminación de los mismos, debido a que también disminuirá su V_d y, de acuerdo con la ecuación 1-8 el valor de la $t_{1/2}$ será más pequeño. Debe remarcar, sin embargo, que el efecto comentado anteriormente sobre la semivida en relación con las proteínas plasmáticas se cumple para los betabloqueantes cuando se dan las siguientes condiciones:

- a) Unión a proteínas plasmáticas en un porcentaje superior al 85%. Por ejemplo, para el metoprolol que se une en un 12%, el efecto comentado no tendría significación.
- b) Eliminación mayoritariamente por extracción hepática.

Deberán tenerse en cuenta estas consideraciones cuando se diseñan pautas posológicas para los betabloqueantes que deban administrarse conjuntamente con otros fármacos susceptibles de variar la tasa de unión a proteínas plasmáticas.

1.4.3.7 Metabolismo y eliminación

Las vías de eliminación de los betabloqueantes dependen fundamentalmente de su lipofilia. Las moléculas más lipófilas, como el propranolol, alprenolol, etc. serán metabolizados prácticamente en su totalidad en el hígado y sus metabolitos eliminados por la glándula hepática. A medida que la lipofilia de los fármacos va disminuyendo, la eliminación por excreción renal del fármaco intacto va aumentando y así, por ejemplo, el atenolol se elimina prácticamente por el riñón inmodificado. Entre estos dos casos extremos se encuentran la mayoría de los betabloqueantes utilizados en clínica, para los cuales la eliminación se realiza en mayor o menor proporción por las dos vías: metabolización hepática y excreción renal de forma inalterada.

Las vías de metabolización más comunes para los betabloqueantes son las siguientes:

- a) Desaminación oxidativa y O-desalquilación con la subsiguiente oxidación de la cadena lateral.
- b) Hidroxilaciones y alifática y formación de conjugados entre el grupo alcohólico secundario de la cadena lateral y el ácido glucurónico.

1.4.3.8 Metabolitos activos

Tal como se ha comentado en el epígrafe anterior, la mayoría de los betabloqueantes sufren metabolización hepática en proporciones variables. Corrientemente, los productos de transformación metabólica son sustancias inactivas desde un punto de vista farmacológico, aunque ciertos compuestos (propranolol, alprenolol, acebutol) originan metabolitos activos, que pueden contribuir a los efectos farmacológicos de los betabloqueantes. En todo caso, está bien estudiado tanto el número de metabolitos que se generan (entre 3 y 6 normalmente) como la cantidad de los mismos para un gran número de betabloqueantes [40, 41, 44, 45].

1.4.3.9 Semivida de eliminación y aclaramiento

Los betabloqueantes más lipófilos y que son metabolizados más intensamente por el hígado presentan, generalmente, semividas de eliminación más cortas (excepto el penbutolol) mientras que los compuestos hidrófilos, con poca metabolización y excretados mayoritariamente por el riñón de forma inalterada, poseen semividas más largas que pueden llegar con fármacos como el nadolol a valores cercanos a las 23 horas [42].

Por regla general, los betabloqueantes tienen un comportamiento lineal cuando se administran a dosis únicas dentro del ámbito terapéutico, es decir, las semividas de eliminación son independientes de la dosis administrada [46, 47]. A dosis múltiples, sin embargo, el comportamiento farmacocinético de estos fármacos puede ser no lineal en función del efecto de primer paso que sufren. De este modo, la administración en régimen de dosis múltiple de 80 mg de propranolol cada 6 horas, produce niveles plasmáticos potencialmente tóxicos. La acumulación es causada mayoritariamente por la saturación del efecto de primer paso hepático, incrementándose, en este caso, la semivida de eliminación en un 44% [36]. Para fármacos de este grupo cuyo efecto de primer paso sea bajo, el valor de la semivida de eliminación, tras su administración a dosis múltiples, es prácticamente el mismo que el obtenido tras una administración única.

El aclaramiento total es una medida de la eficacia en el proceso de eliminación y para fármacos como el alprenolol y propranolol se han obtenido valores de 1,5 L/min, próximos al flujo sanguíneo hepático normal (de 1,1 a 1,8 L/min) [48]. Este hecho indica que estos fármacos son extraídos, prácticamente en su totalidad, cuando se administran por vía oral, por el hígado por efecto de primer paso. Valores más bajos se han encontrado para el atenolol y sotalol, siendo estos valores similares al aclaramiento renal de la creatinina en individuos sanos (0,12 L/min), lo que concuerda con la eliminación mayoritaria que sufren estos fármacos a través del riñón.

1.4.3.10 Interés en la medida de los niveles plasmáticos

La determinación de los niveles plasmáticos de los betabloqueantes es útil en las siguientes circunstancias:

- A los enfermos que no responden a la posología habitual (debido a una mala absorción como consecuencia de un fenómeno de primer paso muy importante, etc.) con el fin de establecer el régimen posológico más adecuado.
- En los niños o ancianos, para modificar la posología y adaptarla a sus propias características.

- En los insuficientes hepáticos y, sobre todo, en los insuficientes renales, para la adaptación a su posología (dosis y frecuencia de administración) en función del grado de afectación funcional.

De todo lo comentado acerca de las características farmacocinéticas de los betabloqueantes, cabe destacar que, mayoritariamente estos fármacos, administrados por vía oral, sufren un mayor o menor efecto de primer paso. Por este motivo, para aumentar la biodisponibilidad de estos fármacos y, como consecuencia, su rendimiento terapéutico, es importante investigar una vía de administración alternativa a la vía oral. La vía bucal es una buena alternativa a la vía oral para la administración de betabloqueantes porque, entre otras propiedades, evita el efecto de primer paso que sufren estos fármacos. Para tener información de la potencial permeación de los betabloqueantes a través de la mucosa bucal debe realizarse estudios “*in vitro*” utilizando la mucosa bucal de cerdo, anatómicamente la más parecida a la humana, como membrana de permeación, estudios que son el principal objetivo de esta Tesis.

1.5 REFERENCIAS

- 1 Wagner J.G. "Farmacocinética Clínica". Ed. Reverté. Barcelona (1983)
- 2 Ritschel W.R. "Basic Pharmacokinetics" Ed. Drug Intelligence Publications. Cincinnati (1992)
- 3 Shargel L.; Yu A.B.C. "Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics" Ed. Appleton and Lange. Connecticut (1992)
- 4 Rowland, M. Tozer, T. N. Clinical Pharmacokinetics. Concepts and Applications, 4th edition. Philadelphia, Williams & Wilkins (2009)
- 5 Cassidy M.K.; Houston J.B. "Journal Pharm. Pharmacol.", 32, 57 (1980)
- 6 Washintong, N. Washintong, C. Wilson, C.G. "Physiological Pharmaceutics" 37-58, Ed. Taylor and Francis London (2002)
- 7 Beckett, A. H. et al. J.Pharm. Pharmacol, 22, 15 (1970)
- 8 Bell M. D. D. et al. Lancet, 1.73 (1985)
- 9 Davis B.J. y col. (1979)
- 10 Cassidy J. et al., Pharm. Res., 10, 126 (1993)
- 11 Rathbone, M.J.; Ponchel G. "Systemic Oral Mucosal Drug Delivery and Delivery Systems" en: Oral Mucosal Drug Delivery Systems. Ed. Rathbone, M.J. Marcel Dekker, Inc. New York (1996)
- 12 Taylan B., Capan Y., Güven O., Kes S., "Design and evaluation of sustained-release and buccal adhesive propranolol hydrochloride Tablets". Journal Controlled Release, 38, 11-20 (1996)
- 13 Jinsong H., Heng P. W. S. "Buccal Delivery Systems". Drug Development and Industrial Pharmacy, 29, 8, 821-832 (2003)
- 14 Squier C. A., Senel S., Wertz P. W. "Oral buccal drug delivery promises and possibilities". STP Pharma Practiques, 10, 47-54 (2000)
- 15 Oral Mucosal Drug Delivery, vol. 74, 85-100 (1996)
- 16 Junginger H. E, Hoogstraate J. A, Coos Verhoel J. "Recent advances in buccal drug delivery and absorption-in vitro and in vivo studies". Journal Controlled Release, 62, 149-159 (1999)
- 17 Liu Chen, Xu Hui-Nan, Li Xiao-Ling. "In vitro permeation of tetramethylpyrazine across porcine buccal mucosa". Acta Pharmacol sin, 23 (9), 792-796 (2002)
- 18 Jaehwi Lee, Sang Kil Lww, Young Wook Chol. "The effect of storage conditions on the permeability of porcine buccal mucosa". Arch. Pharm. Res, vol 25, nº 4; 546-549 (2002)
- 19 Armorel D, Van Eyk, Pieter van der Bijl. "Comparative permeability of various chemical markers through vaginal and buccal mucosa as well as porcine buccal and mouth floor mucosa". Archives of Oral Biology, 49; 387-392 (2004)

- 20 Black J.W, Ducan W.A.H., Shanks R.G. Br. J. Comparison of some properties of pronethalol and propranolol. *Pharmacol.* 25, 577-591 (1965)
- 21 Lands A.M., Arnold A., McAuliff J.P., Luduena F.P., Brown T.G. "Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines". *Nature* 214, 597-598 (1967)
- 22 Engel G. "Subclasses of beta-adrenoceptors - a quantitative estimation of beta 1- and beta 2- adrenoceptors in guinea pig and human lung". *Postgrad. Med. J.* 57, suppl.1, 77-83 (1981)
- 23 Barret A.M., Cullum V.A. "The biological properties of the optical isomers of propranolol and their effects on cardiac arrhythmias". *Br. J. Pharmacol.* 34, 43-55 (1968)
- 24 Schoenwald R.D, Huang H. *J.Pharm. Sci.* 72, 1266-1274 (1983)
- 25 Tarazi R.C., Dustan H.P. "Beta adrenergic blockade in hypertension. Practical and theoretical implications of long-term hemodynamic variations". *Am. J. Cardiol.* 29, 633-640 (1972)
- 26 Man Int Veld A.J., Schalekamp M.A.D.H. *Br. J. Clin. Pharmacol* 13, 2455-2575 (1982)
- 27 Gross G.J., Winbury M.M "Beta adrenergic blockade on intramyocardial distribution of coronary blood flow". *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 187, 451-464 (1973)
- 28 Bodem G., Chidsey C.A. *Clin. Pharmacol. Ther.* 17, 400-406 (1975)
- 29 Cugler R., Herold W., Dangler H.J. "Pharmacokinetics of pindolol in man". *Eur.J.Clin. Pharmacol*, 7, 17-24 (1974)
- 30 Johnson G., Regardh C.G. "Clinical pharmacokinetics of beta-adrenoreceptor blocking drugs". *Clin Pharmacokin.* 1, 233-263 (1976)
- 31 Carruthers S.G., Kelly J.G., McDewitt D.G., Shanks R.G., Walsh M.J. *Br. Med. J.* 2, 303-306 (1975)
- 32 Brunner L., Imhof P., Jack D. "Relation between plasma concentrations and cardiovascular effects of oral oxprenolol in man". *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 8, 3-9 (1975)
- 33 Tjamandra T.B., Thomas J., Verbeeck R., Verbesselt R., Verbenckmaes R., de Schepper P.J. Br. "The effect of end-stage renal failure and haemodialysis on the elimination kinetics of sotalol". *J. Clin. Pharmacol.* 3, 259-265 (1976)
- 34 Hicks D.C. "The buccal absorption of some -adrenoceptor blocking drugs". *Br. J. Pharmacol.* 47, 680P (1973)
- 35 Domenech J., Alba M., Morera J.M., Obach R., Pla Delfina J.M. "Gastric, intestinal and colonic absorption of metoprolol in the rat". *Br. J. Clin. Pharmac.* 19, 85S-89S (1985)
- 36 Evans G.H., Nies A.S., Shand D.G. "The disposition of propranolol. 3. Decreased half-life and volume of distribution as a result of plasma binding in man, monkey, dog and rat". *J. Pharmacol. Exp. Ther* 186, 114-122 (1973)
- 37 Evans G.H., Shand D.G. "Disposition of propranolol. VI. Independent variation in steady-state circulating drug concentrations and half-life as a result of plasma drug binding in man". *Clin. Pharmacol. Ther.* 14, 494-500 (1976)

- 38 Grundin R, Moldeus P., Orrenius S., Borg K., Skanberg I., Von Barh C. 2The possible role of cytochrome P-450 in the liver "first pass elimination" of a beta-receptor blocking drug". *Acta Pharmacol. Toxicol.* 35, 242-260 (1974)
- 39 Ristchel, W.A. *Drug. Intell.* 14, 746-756 (1980)
- 40 Bodin N.O., Borg K., Johanson R., Obianwu H., Svenson R. "Absorption, distribution and excretion of alprenolol in man, dog and rat". *Acta Pharmacol. Toxicoll.* 35, 261-269 (1974)
- 41 Bodin N.O., Borg K., Johanson R., Ramsay C.H., Skanberg I. "Tissue distribution of metoprolol-(3-h) in the mouse and the rat". *Acta Pharmacol. Toxicol.* 36 (Supp V), 116-124 (1975)
- 42 Giudicelli J.F., *Rev. Pract.* 34, 909-921 (1984)
- 43 Sundquist H. *Curr. Ther. Res.* 28, 385-445 (1980)
- 44 Riess W., Huerzeler H., Raschdorf F. "The metabolites of oxprenolol (Trasicor) in man". *Xenobiotica*4, 365-373 (1974)
- 45 Tocco D.J., Duncan A.E.W., Deluna F.A., Hucker H.B., Gruber V.F., Vandenneuevel W.J. "Physiological disposition and metabolism of timolol in man and laboratory animals". *Drug. Metab. Dispos.* 3, 361-370 (1975)
- 46 Johnson G., Regardh C.G. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 36 (Supp V), 31-34 (1975)
- 47 Brunner L., Imhof P., Jack D. "Relation between plasma concentrations and cardiovascular effects of oral oxprenolol in man". *Eur.J.Clin. Pharmacol.* 8, 3-9 (1975)
- 48 Regardh C.G. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 37 (Supp I), 3-39 (1975)

MATERIAL Y MÉTODOS

2 MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se detallan los materiales utilizados en el presente trabajo así como la metodología empleada en cada una de las experiencias realizadas.

2.1 MATERIAL

2.1.1 Fármacos

Acebutolol

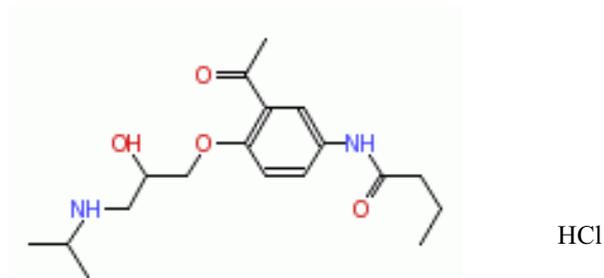


Figura 2-1 Estructura química del hidrocloreto de acebutolol

- Fórmula molecular: $C_{18}H_{28}N_2O_4 \cdot HCl$
- Peso molecular: 372.93
- Aspecto: polvo cristalino blanco o casi blanco
- Solubilidad: Fácilmente soluble en agua y en etanol; muy poco soluble en acetona y en cloruro de metileno; prácticamente insoluble en éter.
- pKa: 9.1
- Punto fusión: 214.52
- Proveedor: SIGMA.

Atenolol

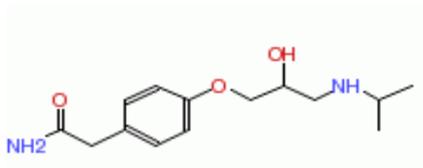


Figura 2-2 Estructura química del atenolol

- Fórmula molecular: C₁₄H₂₂N₂O₃
- Peso molecular: 266.3
- Aspecto: polvo blanco o casi blanco
- Solubilidad: Bastante soluble en agua; soluble en alcohol absoluto; poco soluble en cloruro de metileno.
- pKa: 9.16
- Punto fusión: 183.93
- Proveedor: Roig Pharma

Labetalol

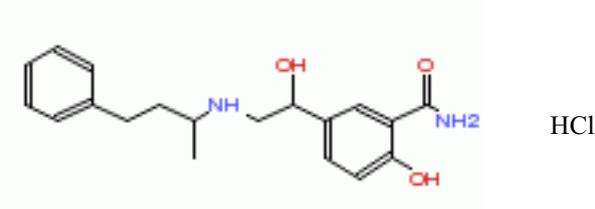


Figura 2-3 Estructura química del hidrocloreuro de labetalol

- Fórmula molecular: C₁₉H₂₄N₂O₃ · HCl
- Peso molecular: 364.9
- Aspecto: polvo blanco o casi blanco
- Solubilidad: Bastante soluble en agua y en etanol; prácticamente insoluble en cloruro de metileno y en éter.
- pKa: 9.2
- Punto fusión: 228.46
- Proveedor: SIGMA

Metoprolol

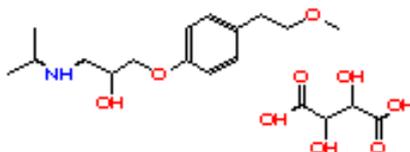
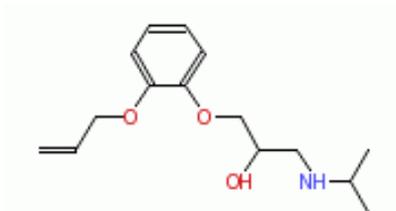


Figura 2-4 Estructura química del tartrato de metoprolol

- Fórmula molecular: $C_{15}H_{25}NO_3 \cdot \frac{1}{2} C_4H_6O_6$
- Peso molecular: 684.8
- Aspecto: polvo cristalino blanco o cristales incoloros
- Solubilidad: Muy soluble en agua, fácilmente soluble en etanol, cloroformo y cloruro de metileno; poco soluble en acetona; insoluble en éter.
- pKa: 9.17
- Punto fusión: 228.46
- Proveedor: SIGMA

Oxprenolol



HCl

Figura 2-5 Estructura química del hidrocloreuro de oxiprenolol

- Fórmula molecular: $C_{15}H_{23}NO_3 \cdot HCl$
- Peso molecular: 301.8
- Aspecto: polvo cristalino blanco
- Solubilidad: Fácilmente soluble en agua, etanol y cloroformo; bastante soluble en acetona; prácticamente insoluble en éter.
- pKa: 9.6
- Punto fusión: 228.46
- Proveedor: Novartis

Propranolol

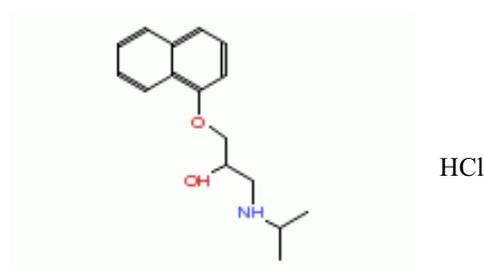


Figura 2-6 Estructura química del hidrocloreuro de propranolol

- Fórmula molecular: $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$
- Peso molecular: 295.81
- Aspecto: polvo cristalino e inodoro, de color blanco o casi blanco
- Solubilidad: Soluble en agua y en etanol; poco soluble en cloroformo; prácticamente insoluble en éter.
- pKa: 9.14
- Punto fusión: 132.76
- Proveedor: Acofarma

2.1.2 Reactivos químicos

Todos los reactivos utilizados han sido suministrados por empresas de reconocida garantía y del máximo grado de pureza disponible.

- KH_2PO_4 (Panreac Química SA, Montcada i Reixac, España)
- Na_2HPO_4 (Panreac Química SA, Montcada i Reixac, España)
- Isopropilamina 99% (Aldrich)
- Amoníaco 30% para análisis (Panreac)
- Ácido acético glacial para análisis (Panreac)
- DMSO (Dimetilsulfóxido) (Merck)
- Solución de Hanks (solución nutritiva y de conservación de estructuras celulares). La composición en g/L es: $CaCl_2=0,14$; $KCl=0,14$; $KH_2PO_4=0,06$; $MgSO_4=0,1$; $MgCl_2=0,1$; $NaCl=8,0$; $NaHCO_3=0,35$; $Na_2HPO_4=0,09$; $Glucosa=1$ (Biological Industries (Israel))
- Metanol calidad HPLC para análisis instrumental (Panreac Química SA, Montcada i Reixac, España)
- Acetonitrilo calidad HPLC para análisis instrumental (Panreac Química SA, Montcada i Reixac, España)

2.1.3 Reactivos biológicos

Mucosa bucal porcina

El material biológico utilizado en las distintas experiencias, ha sido mucosa bucal de cerdo procedente del estabulario de la Facultad de Medicina ubicado en el "campus de Bellvitge". Para la utilización de la mucosa bucal en trabajos de experimentación se obtuvo la correspondiente autorización por parte del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Barcelona y el Comité de Experimentación Animal del gobierno autónomo (Generalitat de Catalunya).

2.1.4 Soluciones

Se han preparado las siguientes soluciones:

- Solución DMSO 10% y albúmina al 4%

Solución empleada en el almacenamiento de la mucosa bucal porcina como crioprotector.

Preparación: Mezclar 100 mL DMSO, 4 g de albúmina y completar volumen hasta 1000 mL con PBS.

- Solución reguladora de fosfatos de pH 7.4

Solución utilizada como fase acuosa para preparar rectas de calibrado y como solución receptora en los estudios de permeación.

Preparación: Mezclar 11.88 g de Na₂HPO₄ y 9.08 g de KH₂PO₄ con cantidad suficiente de agua para un litro. Ajustar a pH 7.4 con hidróxido sódico en caso necesario.

- Solución metanol / agua

Distintas proporciones de metanol/ agua han sido mezcladas para obtener la fase orgánica de la fase móvil en la valoración de los distintos betabloqueantes y llevar a cabo su correspondiente análisis por CLAE.

- Solución acetato amónico pH 3.0

Solución utilizada como fase acuosa en el análisis de los betabloqueantes por CLAE.

Preparación: A 200 mL de agua se le añaden 5.75 µL de ácido acético. Ajustar pH con amoníaco. Completar volumen con agua hasta un litro.

2.1.5 Formulaciones farmacéuticas

Soluciones saturadas de fármaco

Se ha preparado para cada fármaco a estudiar (acebutolol, atenolol, labetalol, metoprolol, oxprenolol y propranolol) una solución saturada de los mismos en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 para estudiar la permeación intrínseca a través de mucosa bucal de cerdo de cada fármaco.

2.1.6 Aparatos

Para la realización de los estudios objeto del presente trabajo, además de la instrumentación usual presente en un laboratorio (balanzas, pH-metro, pipetas, baño, ultrasonidos, etc.), se han utilizado los siguientes equipos:

- Equipo Sation 9000 para la obtención de agua calidad CLAE.
- Dermatómomo : Dermatómomo 25mm, Nouvag[®] (Sumedex, S.A, Valencia)
- Aparato de medida de la pérdida transmucosa de agua (Tewl)
- Equipo de muestreo manual de células de Franz (Crown Glass Co. Mod D-9), compuesto por:
 - Células de Franz
 - Baño termostato TECTRON S-473.100
 - Consola de agitación modelo FDC-400 (Hanson Research)
- Equipo Waters modelo LC Module I Plus de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) con detector UV (Waters Cromatografía, S.A., Barcelona, España).
- Centrifuga Sigma, mod. 4K10 (Sigma Laborzentrifugen GMBH, Osterode am Harz, Germany)



Figura 2-7 Equipo de muestreo manual de células de Franz

2.1.7 Diseños experimentales

Se han realizado dos tipos de estudios de permeación in vitro de los betabloqueantes:

- a) Estudio comparativo de los diferentes betabloqueantes sometidos a estudio a través de mucosa bucal fresca de cerdo.
- b) Estudio comparativo de mucosa bucal de cerdo fresca y congelada utilizando propranolol como fármaco de referencia.

2.2 METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS DE PERMEACIÓN BUCAL

La metodología seguida para el estudio de la permeación bucal de los betabloqueantes a través de la mucosa bucal de cerdo, se detalla a continuación.

2.2.1 *Obtención de la mucosa bucal de cerdo como membrana de permeación*

De acuerdo con uno de los objetivos propuestos, el estudio comparativo entre la mucosa bucal porcina en distintas condiciones (fresca y congelada) se prepara la mucosa bucal de cerdo. El tratamiento realizado es el siguiente:

- Extracción manual de la mucosa del animal recién anestesiado para evitar fenómenos de descomposición.
- Limpieza y acondicionamiento grosero de la mucosa, es decir, separación de la piel, tejido glandular, etc.

A partir de este punto, el tratamiento consta de diferentes etapas según se trate de la preparación de la mucosa fresca o de la mucosa con crioprotector para su congelación.

2.2.1.1 *Preparación de la mucosa fresca*

- Transporte de la mucosa en solución salina a la Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética de la Facultad de Farmacia, Barcelona.
- Corte de la mucosa a $500 \pm 100 \mu\text{m}$ mediante microtomo.
- Montaje de la mucosa en células de Franz.

2.2.1.2 *Preparación de la mucosa con crioprotector y albúmina*

- Se coloca la mucosa en placas de Petri con la solución DMSO 10% y 4% albúmina descrita en el epígrafe 2.1.4 de la Memoria.
- Congelación de la mucosa durante el tiempo y la temperatura prefijados.
- Previamente a su uso, descongelación al baño maría a 37°C .
- Lavados sucesivos de la mucosa con solución salina para eliminar el DMSO.
- Transporte a la Unidad de Biofarmacia y Farmacocinética.
- Corte de la mucosa a $500 \pm 100 \mu\text{m}$ mediante microtomo.
- Se procede al montaje de la mucosa en las células de Franz.

El estudio de la permeación de los betabloqueantes a través de mucosa bucal de cerdo fresca recién extraída es muy poco operativo y está condicionado por la disponibilidad del material biológico. Por este motivo se ha llevado a cabo la comprobación de si se presentan diferencias en la permeación del fármaco entre mucosa fresca y congelada, experiencia que se ha realizado con el propranolol como fármaco de referencia, lo que permitirá realizar, en otros trabajos, experimentos seriados con la mínima variabilidad y máxima capacidad de trabajo.

2.3 MÉTODOS

2.3.1 *Metódica Analítica*

La valoración cuantitativa de los betabloqueantes objeto de estudio se ha realizado por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). Se ha utilizado un equipo de la marca Waters modelo LC Module Plus descrito en el apartado 2.1.6. El sistema de detección ha sido por espectrofotometría ultravioleta.

Los análisis se han realizado a temperatura ambiente. Las condiciones cromatográficas para determinar cada uno de los betabloqueantes se detallan en la tabla 2-1.

Tabla 2-1 Condiciones cromatográficas de los betabloqueantes

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS				
Columna: Atlantis 5 μm reversed phase C (4.6 x 150 mm)				
Volumen inyección: 30 μL				
Longitud de onda: 280 nm				
Fármaco	Fase móvil			Flujo mL/min
	Buffer ^a	AcN	H ₂ O	
acebutolol	10	25	65	2
atenolol	10	5	85	2
labetalol	10	25	65	2
metoprolol	10	25	65	2
oxprenolol	10	25	65	2
propranolol	75	25	-	1

a: Acetato de amonio pH 3

2.3.2 *Validación de la metódica analítica*

Se entiende por validación la obtención de pruebas convenientemente documentadas, demostrativas de que un método analítico es lo suficientemente fiable para obtener el resultado previsto dentro de intervalos definidos [1]. Como principales criterios de validación de las métodos analíticas se considera: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación y límite de detección. No existe un modelo único de validación y un mismo parámetro puede ser estimado mediante diferentes métodos de cálculo. Además, los parámetros a considerar en una validación cambian según los requerimientos legales de diferentes organizaciones (CE, OMS, USP) o según la metódica analítica escogida [2]. Existe un consenso internacional de las propuestas realizadas por la International Conference on Harmonization (ICH) que han sido aceptadas por la Agencia Europea para la evaluación de Productos Medicinales que establece los criterios a seguir ICH Q2B (CPMP/ICH/831/95).

2.3.2.1 *Selectividad*

La selectividad es la capacidad de un método para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra [1].

Para comprobar la selectividad de las metodías analíticas se ha inyectado una solución blanco biológico y una solución con cada betabloqueante por separado en el solvente empleado. En la solución blanco biológico no deben aparecer picos en el tiempo de retención de los betabloqueantes a estudiar.

2.3.2.2 Linealidad

Se define como la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración de analito en la muestra dentro de un margen establecido [1].

El margen se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito. Para comprobar la linealidad de las metodías analíticas se inyectan en el cromatógrafo las rectas preparadas y se representan las concentraciones reales frente a las concentraciones teóricas en una recta de regresión por mínimos cuadrados de ecuación: $y=a+bx$. Donde x (variable independiente) es la concentración teórica, y (variable dependiente), la concentración real, b el valor de la pendiente y a el término independiente. Para cada recta se ha determinado el coeficiente de correlación (r) que indica el grado de relación entre las variables x e y . El valor recomendable para el coeficiente de correlación es ≥ 0.999 [1]. También se ha determinado el coeficiente de determinación r^2 ya que la información obtenida mediante el cálculo de r es limitada y no se justifica por si sola mientras que r^2 aporta una mayor significación estadística debido a que expresa la proporción de la variación total de y explicada por el método analítico.

2.3.2.3 Precisión

La precisión se define como el grado de dispersión entre los valores obtenidos al determinar un analito en un ensayo de varios replicados. Es una medida del grado de reproducibilidad de un método analítico cuando se trabaja en condiciones normales y se expresa como la desviación estándar (coeficiente de variación, CV%).

La precisión analítica indica, por tanto, la distribución de los resultados alrededor de su media pero no da idea de la proximidad al valor real. Éste es uno de los criterios más importantes, junto con la exactitud, a tener en cuenta para comprobar la validez de un método analítico.

Para comprobar la precisión de las metodías analíticas utilizadas se estima el coeficiente de variación porcentual según la siguiente ecuación:

$$CV(\%) = \frac{DE}{C_{exp}} \cdot 100 \quad \text{(Ecuación 2-1)}$$

Donde C_{exp} es la media de los valores interpolados obtenida para los diferentes replicados de cada nivel de concentración y DE es la desviación estándar de los valores interpolados para cada concentración. La precisión se calcula para cada nivel de concentración utilizado en las rectas de calibración.

2.3.2.4 Exactitud

La exactitud representa el grado de concordancia entre el valor experimental encontrado y el valor verdadero. Indica, por tanto, la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posibles al valor real, pero no facilita información acerca de la dispersión de estos resultados. Muestra el error sistemático del método que puede ser constante o proporcional a la cantidad de sustancia ensayada.

Matemáticamente se expresa:

$$E_r (\%) = \frac{(C_{\text{exp}} - C_{\text{teor}})}{C_{\text{teor}}} \cdot 100 \quad \text{(Ecuación 2-2)}$$

Donde E_r es el error relativo porcentual, C_{exp} es la media de la concentración interpolada en cada nivel de concentración y C_{teor} es la concentración teórica de cada punto de la recta utilizada. La exactitud se calcula para cada nivel de concentración utilizado en las rectas de calibración.

2.3.2.5 Límites de cuantificación y de detección

Se entiende por límite de cuantificación (LC) de un método analítico como la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud. El límite de detección (LD) se define como la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales (ICH, Q2A).

El límite de cuantificación (LC) se calcula según la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{10 \cdot S}{P} \quad \text{(Ecuación 2-3)}$$

Donde S es la desviación estándar de la ordenada en el origen de la recta de calibración de menor rango de concentraciones y P la pendiente de dicha recta.

El límite de detección (LD) se calcula según la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3 \cdot S}{P} \quad \text{(Ecuación 2-4)}$$

Donde S es a desviación estándar de la ordenada en el origen de la recta de calibración de menor margen de concentraciones y P la pendiente de dicha recta.

2.3.3 Validación de la metodología analítica por CLAE para los estudios de permeación transmucosa de cerdo

La validación de la metodología analítica para el estudio de la permeación transmucosa de cerdo de los betabloqueantes se ha realizado mediante la preparación de 6 rectas de calibración para cada fármaco en diferentes días (validación interdía). En un matraz aforado de 10 ml se pesan 10 mg del fármaco a estudiar, se disuelven y se lleva a volumen con una solución reguladora de fosfatos de pH 7.4. A partir de esta solución se realizan soluciones con el mismo medio hasta una concentración de 0.1 µg/mL dependiendo del fármaco objeto de estudio.

La solución de blanco biológico utilizada para realizar la selectividad de la metodología analítica, se obtiene con una muestra de solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 mantenida en el compartimiento receptor de las células de Franz en las mismas condiciones de los ensayos de permeación estudiados, de este modo es posible observar los posibles picos debidos al solvente y a la mucosa. Se prepararon tres soluciones en contacto con mucosa de animales distintos.

2.3.4 Preparación de las Formulaciones Farmacéuticas

2.3.4.1 Soluciones saturadas de betabloqueante

En el presente trabajo se ha utilizado una solución libre de fármaco. Para ello, se ha saturado de los distintos betabloqueantes una solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 (pH similar al de la mucosa bucal humana [3]). El estudio de la permeación a través de la mucosa bucal a partir de una solución saturada permite estudiar el proceso en condiciones de actividad termodinámica máxima.

Las etapas seguidas en la elaboración de las soluciones saturadas de los distintos betabloqueantes son las siguientes:

- Se añade el betabloqueante a unos 5 ml de la solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 en agitación hasta que ésta ya no acepte más fármaco en solución.
- Se fuerza la solubilidad manteniendo la solución obtenida en un aparato de ultrasonidos durante 30 minutos.
- Se procede a centrifugar la solución resultante a 4000 rpm durante 5 minutos.
- Se filtra la solución a través de una membrana de nylon de 0.45µm de poro y esta solución es la que se utiliza como solución libre de fármaco en los estudios de permeación bucal

2.3.5 Estudio de permeación transbucal *ex vivo*

2.3.5.1 Célula de difusión

En los ensayos de permeación realizados se han utilizado células de difusión de Franz (FDC-400) de 1.2 cm de diámetro, suministradas por la firma Crown Glass Co. Inc (Somerville, N.J., U.S.A.), basadas todas ellas en el modelo de células propuesto por Franz [4].

La célula de difusión tipo Franz (Figura 2-8) consta de un compartimiento superior (compartimiento dador) y de un compartimiento inferior (compartimiento receptor), ambos de vidrio neutro de color topacio, separados por la membrana de difusión. La membrana debe permanecer durante los ensayos fijada mediante unas mordazas y unas pinzas de acero inoxidable que garantizan la estanqueidad del sistema. La superficie útil para la difusión entre los dos compartimientos es de 1.1 cm².



Figura 2-8 Célula de difusión tipo Franz

El compartimiento inferior o receptor se llena con la solución receptora. En el compartimiento superior o donador se sitúa la solución de fármaco a ensayar. El volumen útil del compartimiento es de aproximadamente 6 ml.

La temperatura se mantiene en el interior de la célula a $3 \pm 1^\circ\text{C}$ mediante la circulación de agua termostataada, que entra por la rama inferior de la camisa calefactora del cuerpo receptor de las células y sale por la parte superior.

La perfecta homogeneización de la concentración de fármaco en la solución receptora se consigue mediante la agitación de la misma por una barra magnética cubierta de teflón introducida en el compartimiento receptor y que es movida por un agitador externo.

2.3.5.2 Membrana de difusión

En el presente trabajo se ha utilizado mucosa bucal de cerdo procedente del estabulario de la Facultad de Medicina ubicado en el "campus de Bellvitge". Una vez sacrificado el animal se realiza uno de los dos procedimientos descritos en el apartado 2.2.1 bien se pretenda proceder a hacer el ensayo con mucosa fresca o congelada. En cualquiera de las dos situaciones previo al montaje en las células de Franz, la mucosa debe cortarse a un grosor de $500 \pm 100 \mu\text{m}$ con un microtomo eléctrico, Aesculap GA 630, Tuttlingen, Germany (Figuras 2-9 y 2-10).



Figura 2-9 Mucosa bucal porcina



Figura 2-10 **Proceso de corte de la mucosa bucal porcina**

2.3.5.3 *Solución receptora*

El medio receptor utilizado, fue una solución reguladora de fosfatos de pH 7.4. Para evitar que el proceso de permeación se vea limitado por problemas de solubilidad del fármaco en el medio receptor se deben cumplir las condiciones *sink* durante todo el tiempo que dure la experiencia, es decir, que no se debe alcanzar en el medio receptor una concentración de fármaco superior al 20% de la concentración de saturación. Estas condiciones permiten emular las condiciones *in vivo*.

2.3.5.4 *Técnica del ensayo de permeación*

Se llena el compartimiento receptor con la solución reguladora de fosfatos de pH 7.4, se introduce el núcleo de agitación magnético y se sitúa la membrana de difusión (mucosa bucal de cerdo) en la célula. Se completa el volumen con la solución receptora a través del puerto de toma de muestra, asegurándose de que no queden burbujas de aire entre la solución receptora y la membrana de difusión para así asegurar que durante toda la experiencia la superficie de permeación se mantiene constante.

Una vez atemperadas las células de difusión y eliminadas las burbujas de aire, se procede a comprobar la integridad de la mucosa bucal mediante la determinación de la pérdida de agua transmucosa (TMWL) con el Dermalab[®]. En el caso de dar un valor superior a 30 g/m²/h se descarta la mucosa y se procede a su sustitución. El valor del punto de corte fue determinado en estudios previos donde se valoró la media del valor TMWL con un total de 50 mucosas.

En el compartimiento dador se depositan 250 µl de la formulación a estudiar. Durante las experiencias, se cubre este compartimiento con una lámina de parafilm[®] para conseguir el aislamiento del medio ambiente y evitar su evaporación. La duración de las experiencias ha sido de 6 horas. A los tiempos prefijados de 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas se extraen muestras de 300 µl a través del puerto de toma de muestras del compartimiento receptor de la célula de difusión y se repone el volumen extraído con solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 libre de soluto y mantenida a la misma temperatura que el medio receptor. Las muestras extraídas se colocan en viales de cromatografía líquida de alta eficacia y se mantienen a -20°C hasta su posterior valoración por CLAE.

Las cantidades de fármaco permeadas acumuladas a cada tiempo de muestreo, se calculan a partir de la concentración del fármaco determinada en la solución receptora, por CLAE, corrigiendo la dilución producida por el muestreo.

En primer lugar, se lleva a cabo un estudio comparativo de permeación con todos los betabloqueantes sometidos a estudio a través de de mucosa fresca. En segundo lugar, se

procede a estudiar a nivel comparativo, la permeación de propranolol (fármaco de referencia) entre mucosa fresca y congelada a fin de investigar la influencia de la congelación en la permeación del fármaco a través de la mucosa.

2.3.5.5 *Tratamiento de los datos experimentales*

A partir de las concentraciones de fármaco en el compartimiento receptor de las células de Franz se estiman las cantidades permeadas obtenida a los tiempos prefijados de cada muestra y se corrigen en función del número de muestras precedentes, obteniéndose de este modo el tabulado experimental tiempo vs cantidades de fármaco permeadas acumuladas (t/Q).

Desde un punto de vista teórico, la ecuación matemática que se ajusta a los valores experimentales nos permite obtener los principales parámetros de permeación bucal de los betabloqueantes que define las características de penetración del fármaco a través de la mucosa bucal.

En el presente trabajo, en todas las experiencias realizadas se ha ajustado el modelo de dosis infinitas a los resultados experimentales (t/Q) mediante el programa Laplace[®] [5], que incluye la aplicación de un algoritmo de inversión numérica de transformadas de Laplace y posteriormente la optimización de los resultados mediante aplicación de las técnicas de monitorización de la suma de cuadrados residuales. Los resultados del ajustado permiten obtener los valores de los parámetros de permeación P_1 (relacionado con el coeficiente de reparto del fármaco entre los lípidos de la membrana de permeación y el disolvente de la formulación), P_2 (relacionado con el coeficiente de difusión del fármaco a través de la membrana de permeación) y del flujo (J) en estado de equilibrio estacionario. A partir de los valores de P_1 y P_2 se han calculado el coeficiente de permeabilidad ($K_p = P_1 \cdot P_2$) y el período de latencia ($T_l = 1/6 \cdot P_2$) [6].

2.3.5.6 *Determinación de las concentraciones de fármaco teóricas en estado de equilibrio estacionario*

Si se considera una forma farmacéutica de liberación controlada con un área específica de 2.5 cm², puede estimarse las concentraciones teóricas de fármaco en estado de equilibrio estacionario. Para ello se emplea la siguiente ecuación:

$$C_{ee} = J \cdot S / Cl_p \quad \text{(Ecuación 2-5)}$$

en la que:

C_{ee} = Concentración teórica de fármaco en estado de equilibrio estacionario.

J = Valor del flujo experimental del fármaco a través de la mucosa de cerdo.

S = Área específica de permeación.

Cl_p = Aclaramiento plasmático del fármaco [7].

2.3.6 *Estudio estadístico*

En este trabajo se ha realizado un estudio estadístico desde dos puntos de vista:

1. Estudio estadístico para poner de manifiesto si se presentan diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades permeadas y los parámetros de permeación comparando los valores correspondientes de todos los betabloqueantes ensayados a través de mucosa fresca.
2. Estudiar si se presentan diferencias estadísticamente significativas entre cantidades de propranolol permeadas a través de mucosa fresca y congelada, así como entre el valor de los parámetros de permeación obtenidos para el beta-bloqueante entre mucosa fresca y congelada.

Para llevar a cabo estos estudios estadísticos se ha realizado el análisis de la variancia (ANOVA) en el caso de presentarse distribución normal y homogeneidad de variancias y el test de Kruskal-Wallis o el test de Friedman en caso contrario.

Para realizar las pruebas estadísticas comentadas anteriormente se han utilizado los programas SAS [8] y NCSS [9].

2.3.7 *Estimación del coeficiente de reparto*

El coeficiente de reparto es una constante (P) físicoquímica característica de los fármacos, indicadora de su lipofilia, parámetro muy relacionado con la capacidad de penetrar las membranas lipídicas como el estrato córneo de la piel y la mucosa bucal. Se define como la relación entre la concentración de fármaco no ionizado en un solvente orgánico y la concentración del principio activo no ionizado en un solvente acuoso.

Para que el cálculo del coeficiente de reparto sea representativo del paso a través de la mucosa bucal se han considerado diferentes solventes orgánicos como el octanol [10, 11], el n-heptano [12], etc. Los resultados experimentales publicados en los últimos años han puesto de manifiesto que el coeficiente de reparto entre octanol-agua es el que correlaciona mejor con el comportamiento biológico del fármaco, posiblemente debido a que el octanol es capaz de solubilizar una pequeña parte de agua [13]. Se ha sugerido que la solubilidad del agua en octanol es ideal para representar barreras biológicas, ya que aunque las barreras biológicas generalmente se consideran lipófilas, de hecho son bicapas formadas por materiales lipófilos e hidrófilos [14].

Cuando se trata de fármacos ionizables se estima el coeficiente de distribución (D) [14, 15]. Este parámetro también es característico de la lipofilia del fármaco pero es variable en función del pH de la fase acuosa. El coeficiente de distribución, considerando que las especies ionizables sólo son solubles en la fase acuosa, puede definirse como la relación entre la concentración de fármaco ionizado en un solvente orgánico y la suma entre la concentración de fármaco no ionizado e ionizado en un solvente acuoso [14].

Aplicando la ecuación de Henderson-Hasselbach el coeficiente de distribución puede expresarse de la siguiente forma en función de si se trata de un ácido o una base (Ecuaciones 2-6 y 2-7).

$$\text{Log}D_{pH} = \log P - \log(1 + 10^{(pH-pKa)}) \quad \text{(Ecuación 2-6)}$$

$$\text{Log}D_{pH} = \log P - \log(1 + 10^{(pKa-pH)}) \quad \text{(Ecuación 2-7)}$$

En el presente trabajo el logaritmo del coeficiente de distribución ($\log D_{pH}$) se ha obtenido a través de la bibliografía [16]. Aplicando la ecuación 2-7 se ha obtenido el logaritmo del coeficiente de reparto ($\log P$). Realizando el inverso de $\log P$ se obtiene el correspondiente coeficiente de reparto (P).

2.3.8 Estudio de relación estructura-actividad (QSAR)

De acuerdo con lo comentado en el epígrafe 1.3., la mucosa bucal consta de dos tipos de estructuras, una queratinizada (zonas palatal y gingival) y otra no queratinizada (bucal y sublingual). La zona bucal está integrada por la parte interior de las mejillas y los labios inferior y superior. Dado que el objetivo de emplear como vía de administración de los betabloqueantes es a través de las mejillas interiores, la estructura de su membrana puede considerarse similar a la intestinal.

La mayoría de los modelos teóricos descritos en la bibliografía para la predicción de la absorción de fármacos a través de mucosas, incluyen como variables predictoras, algunos descriptores moleculares como la lipofilia, el peso molecular, la superficie polar o la capacidad de formar puentes de hidrógeno [17]. En este trabajo se han utilizado una serie de descriptores que pueden clasificarse como sigue:

a) Descriptores electrónicos

A fin de poner de manifiesto la influencia de las cargas netas de los átomos a la estructura química de los betabloqueantes estudiados de acuerdo con la figura 2-11, se han calculado como variables independientes en una correlación múltiple, las siguientes:

- Carga neta asociada al átomo de nitrógeno (N)
- Carga neta asociada al átomo de carbono alquílico (CAK)
- Carga neta asociada al átomo de oxígeno (O)
- Carga neta asociada al átomo de carbono arílico (CAR)

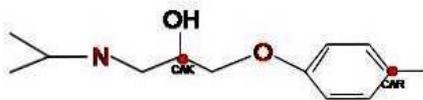


Figura 2-11 Estructura química general de los betabloqueantes

También se han considerado los descriptores HOMO y LUMO, siendo:

- HOMO: orbital molecular ocupado de mayor energía
- LUMO: orbital molecular desocupado de menor energía

- Formación puentes de hidrógeno

La capacidad de la molécula de entrar en la célula depende del número y fuerza de los puentes de hidrógeno que la sustancia forma con el agua, puesto que el primer paso para entrar en la membrana es la desolvatación de la molécula. La facilidad de formar puentes de hidrógeno es perjudicial para la entrada en el entorno no polar de la membrana. Por el contrario, cuando la membrana es la que forma puentes de hidrógeno con la molécula, facilita su paso a través de la misma. Por ello, esta propiedad junto con la lipofilia, son buenos descriptores de la permeabilidad del fármaco a través de la membrana. Dos de los descriptores asociados a la capacidad de formación de puentes de hidrógeno son los siguientes:

- BHA: enlace aceptor de hidrógeno
- BHD: enlace dador de hidrógeno

b) Descriptores estéricos

Como descriptores estéricos se han utilizado los siguientes:

- Volumen molecular (MW)
- Superficie molecular (MS)

c) Parámetros físico-químicos

- Coeficiente de reparto aparente

Puesto que el proceso de reparto en la membrana es uno de los pasos durante el transporte del fármaco a través de la misma, la lipofilia se ha utilizado frecuentemente como predictor de la permeabilidad del fármaco. El proceso de reparto en la membrana se produce a través del fluido circundante cuyo pH puede variar por distintos factores. Por este motivo, el proceso de absorción se correlaciona con el coeficiente de distribución (coeficiente de reparto aparente) determinado a un pH promedio fisiológico (en la mucosa bucal entre 6.2 y 7.4). En el caso de compuestos de estructura similar, es posible obtener buenas correlaciones entre la lipofilia del fármaco y su permeabilidad bucal.

- Peso molecular

El peso molecular está relacionado con el coeficiente de difusión del soluto en la fase acuosa y también con el coeficiente de difusión del soluto en la membrana biológica. Este último es uno de los factores determinantes de la velocidad de difusión del fármaco a través de la membrana. Se observa una gran correlación entre la difusión transcelular y el tamaño molecular. Compuesto de peso molecular < 200 , son capaces de atravesar la membrana utilizando la vía paracelular así como la difusión transcelular a través de la membrana. Compuestos de peso molecular > 250 , utilizan fundamentalmente la vía transcelular. No obstante, el incremento del peso molecular, cuando es mayor de 500, conduce a una disminución de la difusión transmembrana.

- Solubilidad

Como consecuencia de que los fármacos atraviesan la membrana disueltos en los líquidos circundantes a la misma, la solubilidad de los principios activos es un buen descriptor para establecer correlaciones con parámetros representativos de la velocidad de paso de los fármacos a través de la membrana. Concretamente, en el caso de la permeabilidad bucal, lo que interesa es la solubilidad de los fármacos a pH igual a 6.8.

- Punto de fusión

d) Descriptores topológicos

- Número de enlaces rotacionales (nRotB). Se define como un enlace simple no perteneciente a una estructura cíclica, unido a otro átomo no terminal excepto el hidrógeno. Los enlaces C-N se excluyen debido a la barrera energética que supone la estructura rotacional.

Para el cálculo de los descriptores descritos en este epígrafe, se han utilizado los siguientes programas informáticos:

Los descriptores electrónicos tales como las cargas netas asociadas a los distintos átomos estudiados, los orbitales frontera HOMO y LUMO se han calculado con el modelo semiempírico AM1, implantado en el programa CHEMOFFICE ULTRA 2010.

El volumen molecular y la superficie molecular se han calculado con una aplicación del mismo programa anteriormente mencionado.

Los descriptores nRotB, BHA y BHD se han calculado con la aplicación ChemIDplus (<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/> (2007)).

2.4 REFERENCIAS

- 1 AEFI. Validación de métodos analíticos. Barcelona: Monografías de AEFI (2001)
- 2 Camacho MA, Torres AI, Gil ME, Obregón M i Ruiz V. Validation protocolo of analytical methods for finished pharmaceutical products. STP Pharma Practiques; 3:197-202 (1993)
- 3 Gil Yosipovitch, Ilana Kaplan, Shlomo Calderon, Michael David. Yiong Huak Chan and Abraham Weinberger. “Distribution of Mucosal pH on the Bucca, Tongue, Lips and Palate”. Acta Derm Venereol 81; 178 – 180 (2001)
- 4 Franz TJ. In vitro vs in vivo percutaneous absorption: on the relevance of in vitro data. Journal of Investigative Dermatology; 64:190-195 (1975)
- 5 Micromath Scientific Software (1991)
- 6 Domenech Berrozpe, XVII Symposium AEFI, II Symposium AEPAR, “Formas farmacéuticas de liberación transdérmica”, 31-37 (1996)
- 7 Mammen J. “Clinical Pharmacokinetics”. Ed. ADIS (1990)
- 8 SAS Enterprise Guide 4.1, SAS Institute Inc. (2006)
- 9 NCSST2001, Statistical Software, Inc. (2001)
- 10 Flynn GL. Physicochemical determinants of skin absorption. En: GErry TR, Henry CJ. Principles of route-to-route extrapolation for risk assessment. New York: Elsevier; p.93-127 (1990)
- 11 Potts RO y Guy RH. Predicting skin permeability. Pharm Research; 9(5):663-669 (1992)
- 12 El Tayar N, Tsai RS, Testa B, Carrupt PA, Hansch C, Leo A. Percutaneous penetration of drugs: a quantitative structure-permeability relationship study. J Pharm Sci; 80:744-749 (1991)
- 13 Magnolis SA, Levenson M. Certification by Karl Fischer method of the water content in SRM 2890, water saturates 1-octanol, an analysis of associated interlaboratory bias in the measurement process. J Anal Chem; 367:1-7 (2000)
- 14 Scott DC, Cymer JW. Estimation of distribution coefficients from partition coefficient and pKa. Pharmaceutical Technology; 30-40 (2002)
- 15 Hadgraft J, Valenta C. pH, pKa and dermal delivery. Int J Pharm; 200:243-247 (2000)
- 16 Hanne Morck Nielsen, Margrethe Romer Rassing. TR 146 cells on filters as a model of human buccal epithelium: IV. Permeability of water, mannitol, testosterone and beta adrenoreceptor antagonists. Comparison to human, monkey and porcine buccal mucosa. International Journal of Pharmaceutics 194; 155-167 (2000)
- 17 Daniel F. Veber, Stephen R. Johnson, Hung-Yuan Cheng, Brian R. Smith, Keith W. Ward, Kenneth D. Kopple. “Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates”. J. Med. Chem., 45, 2615-2623 (2002)

RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Validación de la metodología analítica

3.1.1 Validación de la metodología analítica por CLAE para los estudios de la permeación bucal

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en la validación interdiaria de la metodología analítica empleada para la cuantificación de los distintos betabloqueantes estudiados en los ensayos de permeación, de acuerdo con lo expuesto en el apartado 2.3.2 de material y métodos.

Las figuras 3.1-3.6 muestran cromatogramas representativos de los diferentes betabloqueantes estudiados.

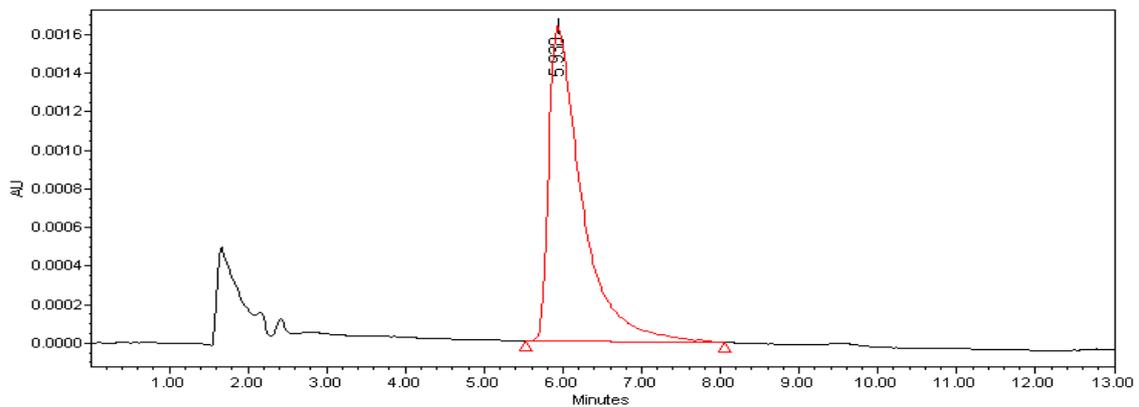


Figura 3-1 Cromatograma correspondiente a una solución de acebutolol (C=15µg/mL)

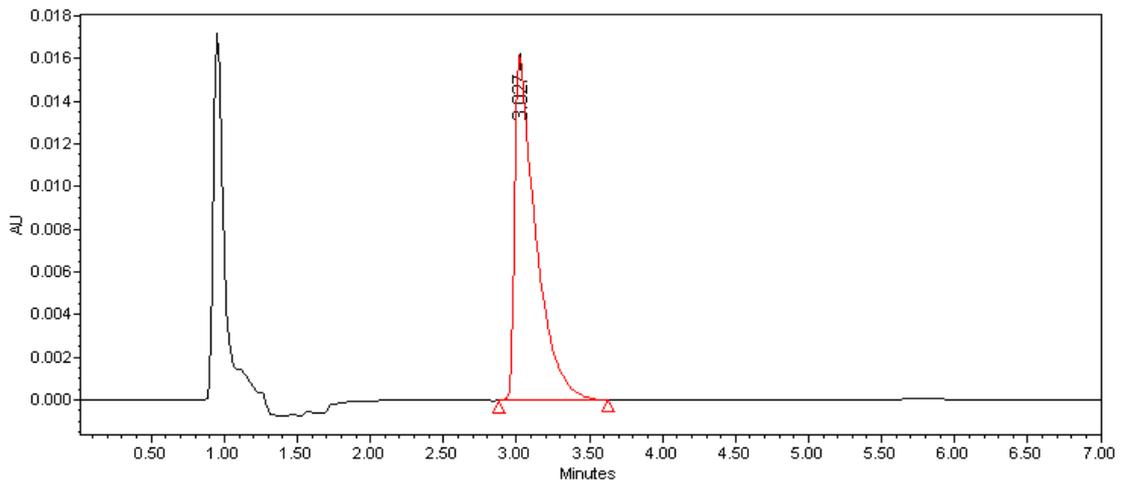


Figura 3-2 Cromatograma correspondiente a una solución de atenolol (C=15µg/mL)

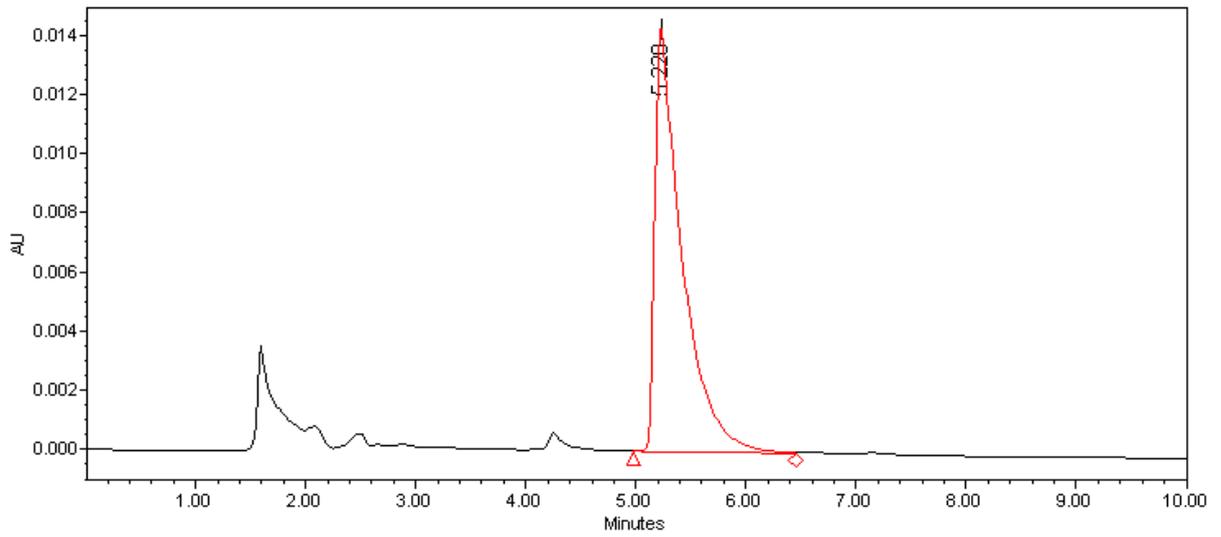


Figura 3-3 Cromatograma correspondiente a una solución de labetalol (C=15µg/mL)

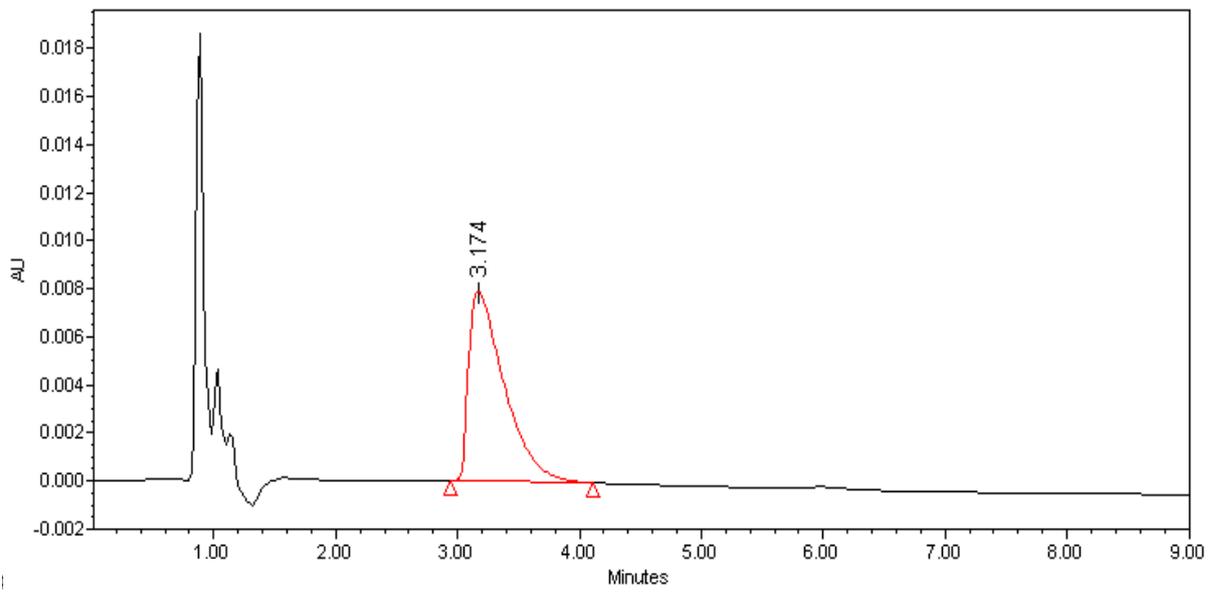


Figura 3-4 Cromatograma correspondiente a una solución de metoprolol (C=15µg/mL)

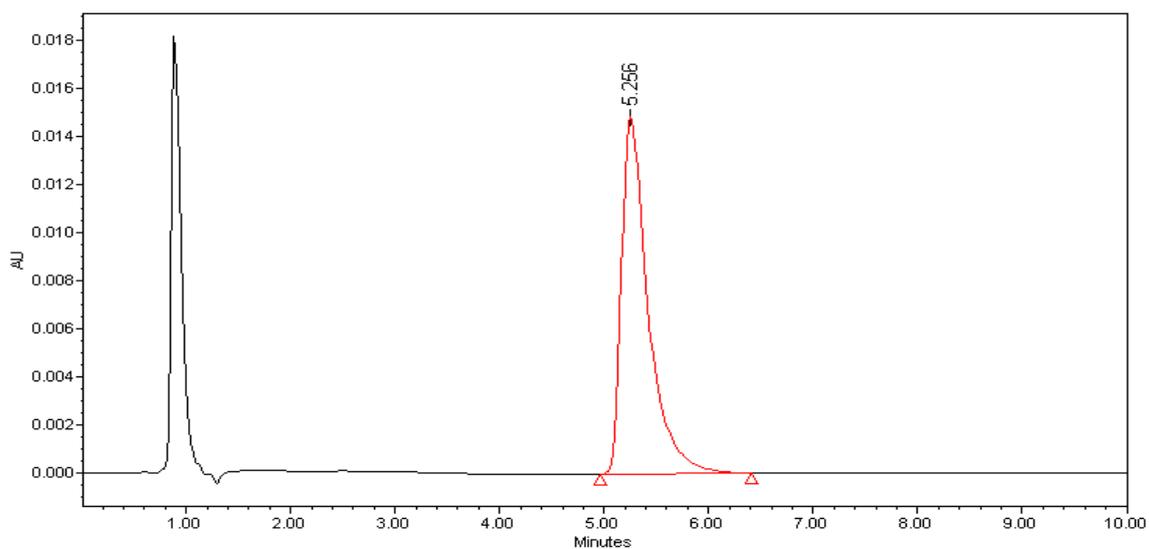


Figura 3-5 Cromatograma correspondiente a una solución de oxprenolol (C=15µg/mL)

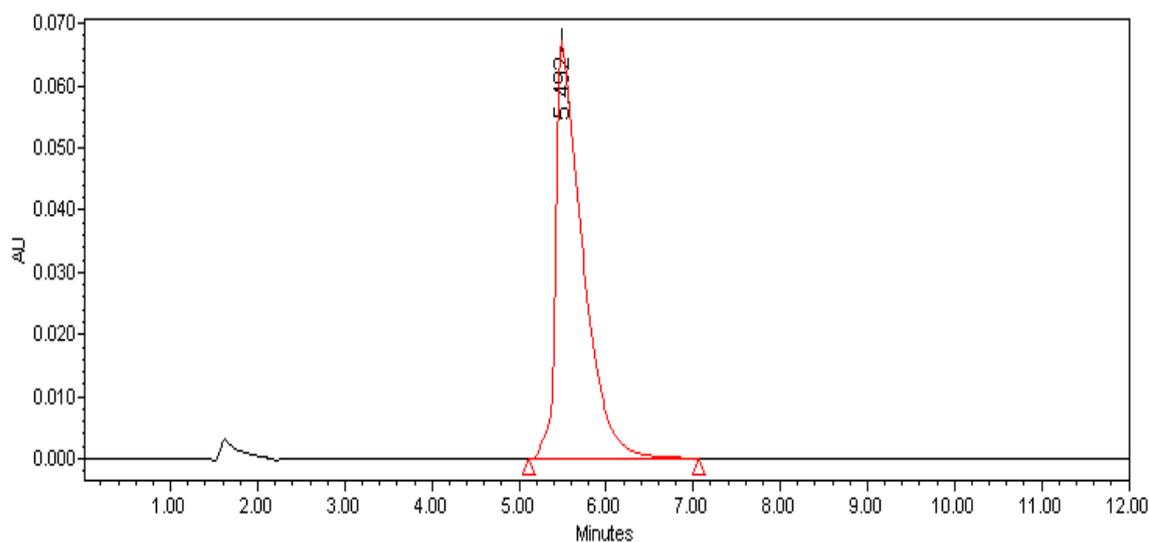


Figura 3-6 Cromatograma correspondiente a una solución de propranolol (C=15µg/mL)

Puede observarse, en estas figuras, la buena resolución de los picos, no presentan colas ni interferencias por lo que la integración de los mismos resulta ser exacta.

3.1.1.1 *Selectividad*

De acuerdo con lo expuesto en el apartado 2.3.2.1, la metodología empleada para los estudios de absorción transmucosa de los betabloqueantes estudiados, es selectiva ya que no aparecen interferencias debidas a la mucosa o al solvente en el tiempo de retención en el que aparecen los diferentes betabloqueantes.

3.1.1.2 *Linealidad*

De acuerdo con lo expuesto en el apartado 2.3.2.2 de material y métodos, en las tablas 3-1 – 3-6 se muestran los resultados correspondientes a los valores de la pendiente, ordenada en el origen, coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r^2) de las rectas de validación para los diferentes fármacos estudiados. Las figuras 3-7 – 3-12 muestran la representación gráfica de las rectas de calibración utilizadas en la validación de la metodología analítica de los diferentes betabloqueantes.

Tabla 3-1 Valores de la pendiente y ordenada en el origen de las rectas de calibración en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 que correlacionan las concentraciones teóricas de acebutolol (x) y las concentraciones experimentales (y) para cada ámbito de concentraciones. Se acompañan del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r²).

Fármaco: Acebutolol				
Rango de concentraciones: 0.20 - 30 µg/mL				
Recta	Pendiente	Ordenada en el origen	Coeficiente de correlación (r)	Coeficiente de determinación (r²)
R1	1.027	-0.133	0.99940	0.99880
R2	0.928	0.246	0.99911	0.99822
R3	0.985	0.104	0.99981	0.99961
R4	1.013	-0.079	0.99952	0.99904
R5	1.141	-0.339	0.99938	0.99876
R6	0.943	0.192	0.99947	0.99894

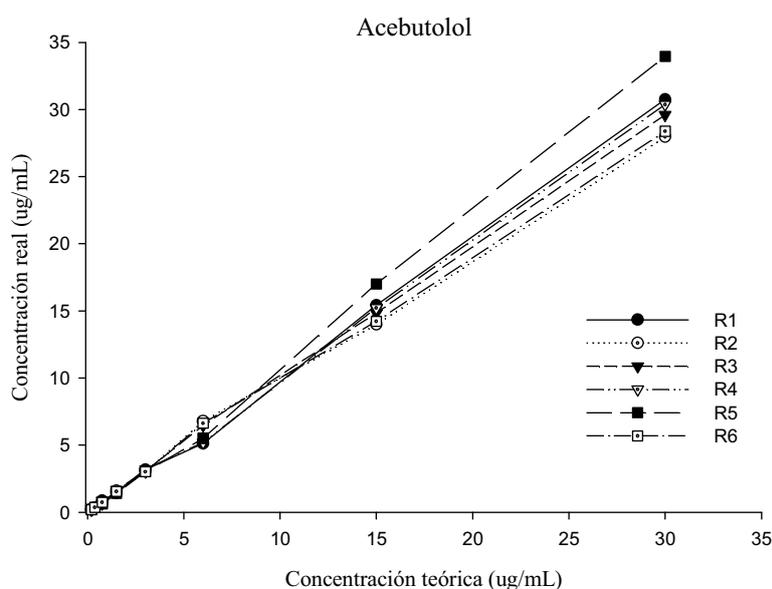


Figura 3-7 Representación gráfica de las rectas de calibración de acebutolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 utilizadas para los diferentes márgenes de concentración

La relación entre las concentraciones reales y teóricas del acebutolol, en los distintos replicados, presenta muy poca variabilidad.

Tabla 3-2 Valores de la pendiente y ordenada en el origen de las rectas de calibración en solución reguladora de fosfatos a pH 7.4 que correlacionan las concentraciones teóricas de atenolol (x) y las concentraciones experimentales (y) para cada ámbito de concentraciones. Se acompañan del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r²).

Fármaco: Atenolol				
Rango de concentraciones: 0.05 - 30 µg/mL				
Recta	Pendiente	Ordenada en el origen	Coefficiente de correlación (r)	Coefficiente de determinación (r ²)
R1	1.071	-0.085	0.99997	0.99993
R2	1.049	-0.050	0.99996	0.99992
R3	1.005	-0.010	0.99999	0.99999
R4	1.009	-0.032	0.99985	0.99971
R5	1.021	-0.035	0.99997	0.99994
R6	1.021	-0.015	1.00000	0.99999

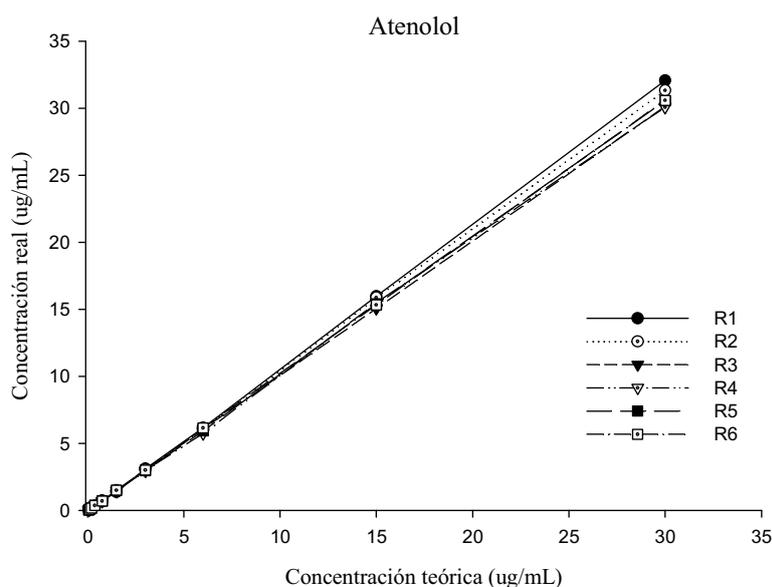


Figura 3-8 Representación gráfica de las rectas de calibración de atenolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 utilizadas para los diferentes márgenes de concentración

Los distintos replicados que relacionan las concentraciones reales y teóricas del atenolol, son prácticamente superponibles.

Tabla 3-3 Valores de la pendiente y ordenada en el origen de las rectas de calibración en solución reguladora de fosfatos a pH 7.4 que correlacionan las concentraciones teóricas de labetalol (x) y las concentraciones experimentales (y) para cada ámbito de concentraciones. Se acompañan del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r²).

Fármaco: Labetalol				
Rango de concentraciones: 0.05 - 30 µg/mL				
Recta	Pendiente	Ordenada en el origen	Coefficiente de correlación (r)	Coefficiente de determinación (r ²)
R1	1.066	-0.116	0.99982	0.99963
R2	1.024	-0.084	0.99950	0.99899
R3	1.025	-0.079	0.99930	0.99861
R4	1.028	0.036	0.99968	0.99936
R5	1.030	-0.083	0.99996	0.99992
R6	1.076	-0.095	0.99978	0.99956

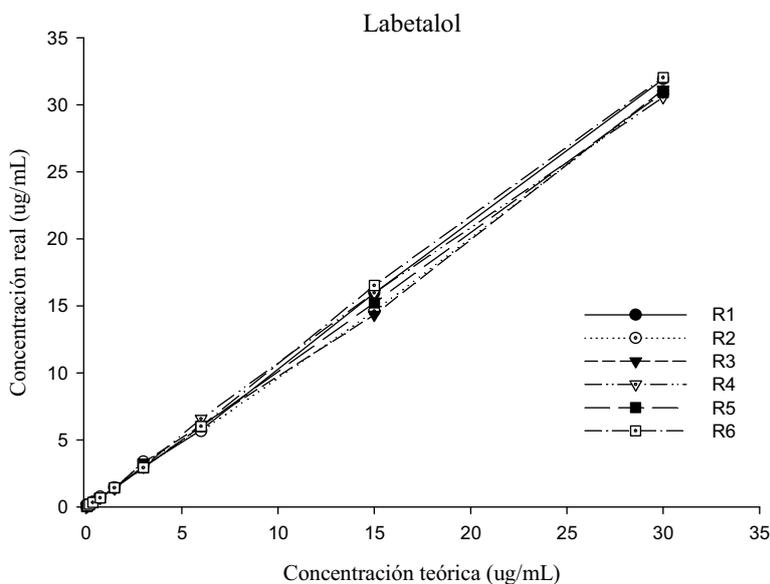


Figura 3-9 Representación gráfica de las rectas de calibración de labetalol en solución reguladora de fosfatos pH de 7.4 utilizadas para los diferentes márgenes de concentración

En el caso del labetalol, las rectas de calibrado, presentan muy poca variabilidad.

Tabla 3-4 Valores de la pendiente y ordenada en el origen de las rectas de calibración en solución reguladora de fosfatos a pH 7.4 que correlacionan las concentraciones teóricas de metoprolol (x) y las concentraciones experimentales (y) para cada ámbito de concentraciones. Se acompañan del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r²).

Fármaco: Metoprolol				
Rango de concentraciones: 0.20 - 30 µg/mL				
Recta	Pendiente	Ordenada en el origen	Coefficiente de correlación (r)	Coefficiente de determinación (r ²)
R1	1.000	0.000	1.00000	0.99999
R2	1.024	-0.097	0.99992	0.99984
R3	1.007	-0.053	0.99996	0.99993
R4	1.000	0.000	0.99998	0.99996
R5	1.022	-0.089	0.99992	0.99985
R6	1.000	-0.005	0.99997	0.99994

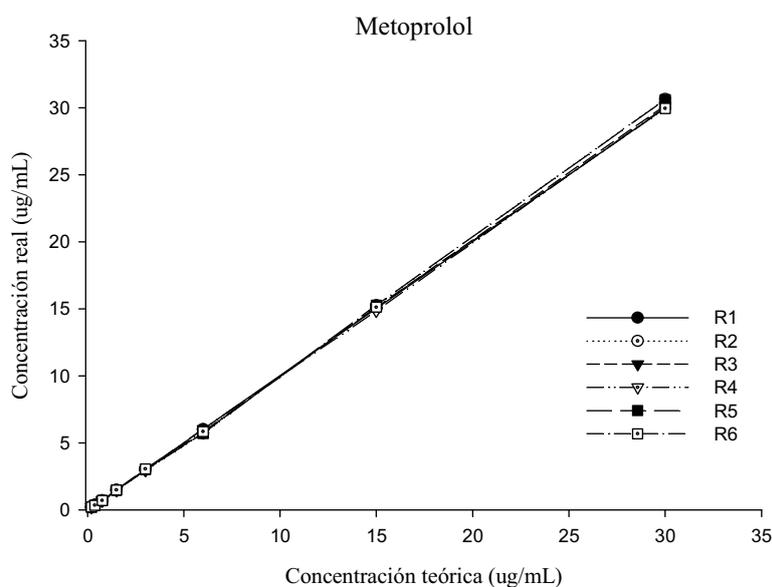


Figura 3-10 Representación gráfica de las rectas de calibración de metoprolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 utilizadas para los diferentes márgenes de concentración

La relación entre las concentraciones reales y teóricas del metoprolol da lugar a rectas superponibles.

Tabla 3-5 Valores de la pendiente y ordenada en el origen de las rectas de calibración en solución reguladora de fosfatos a pH 7.4 que correlacionan las concentraciones teóricas de oxprenolol (x) y las concentraciones experimentales (y) para cada ámbito de concentraciones. Se acompañan del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r²).

Fármaco: Oxprenolol				
Rango de concentraciones: 0.20 - 30 µg/mL				
Recta	Pendiente	Ordenada en el origen	Coefficiente de correlación (r)	Coefficiente de determinación (r ²)
R1	1.010	-0.072	0.99997	0.99994
R2	1.001	-0.013	0.99997	0.99993
R3	1.010	-0.077	0.99996	0.99992
R4	1.011	-0.083	0.99995	0.99990
R5	1.000	-0.009	0.99997	0.99994
R6	1.009	-0.067	0.99997	0.99994

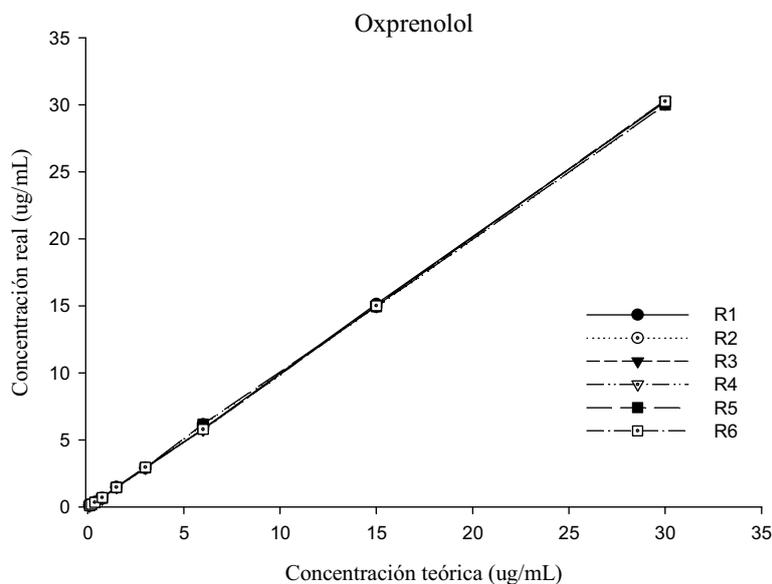


Figura 3-11 Representación gráfica de las rectas de calibración de oxprenolol en solución reguladora de fosfatos pH 7.4 utilizadas para los diferentes márgenes de concentración

Las rectas de calibrado para la valoración analítica del oxprenolol, han resultado ser superponibles.

Tabla 3-6 Valores de la pendiente y ordenada en el origen de las rectas de calibración en solución reguladora de fosfatos a pH 7.4 que correlacionan las concentraciones teóricas de propranolol (x) y las concentraciones experimentales (y) para cada ámbito de concentraciones. Se acompañan del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r²)

Fármaco: Propranolol				
Rango de concentraciones: 0.05 - 30 µg/mL				
Recta	Pendiente	Ordenada en el origen	Coefficiente de correlación (r)	Coefficiente de determinación (r ²)
R1	1.020	0.030	0.99984	0.99968
R2	1.019	-0.044	0.99992	0.99984
R3	1.115	-0.161	0.99983	0.99966
R4	1.148	-0.242	0.99954	0.99907
R5	0.995	0.056	0.99963	0.99926
R6	0.998	0.012	0.99998	0.99996

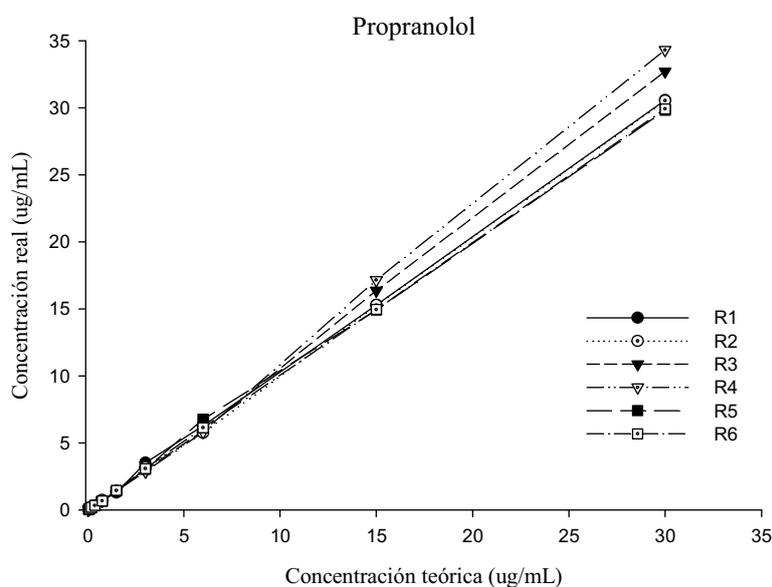


Figura 3-12 Representación gráfica de las rectas de calibración de propranolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 utilizadas para los diferentes márgenes de concentración

La variabilidad que presentan las rectas de calibrado, correspondientes a los distintos replicados del propranolol, es muy baja.

3.1.1.3 Precisión y exactitud

En las tablas 3-7 - 3-12 se muestran los valores de los coeficientes de variación porcentuales (CV%), y errores relativos porcentuales (Er%) correspondientes respectivamente a la precisión y exactitud de la validación de la metodología analítica interdiaria para los diferentes betabloqueantes en solución reguladora de fosfatos pH 7.4, obtenidos de acuerdo con lo expuesto en el apartado 2.3.2.4 de material y métodos.

Tabla 3-7 Concentraciones teóricas y experimentales correspondientes a cada recta de validación de la metodología analítica interdiaria del acebutolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 en el ámbito de concentraciones entre 0.2 – 30 µg/mL. Se acompañan de los valores medios, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y error relativo porcentual (Er%)

Fármaco: Acebutolol								
Recta	Concentración (µg/ml)							
	0.20	0.375	0.75	1.50	3.0	6.0	15.0	30.0
R1	0.21	0.322	0.87	1.44	3.2	5.1	15.4	30.8
R2	0.20	0.364	0.69	1.60	3.0	6.8	14.0	28.0
R3	0.21	0.331	0.65	1.67	3.0	6.5	14.8	29.6
R4	0.20	0.344	0.86	1.52	3.2	5.2	15.2	30.4
R5	0.21	0.369	0.62	1.40	3.0	5.5	17.0	34.0
R6	0.20	0.358	0.74	1.55	3.0	6.6	14.2	28.4
Media	0.21	0.348	0.74	1.53	3.1	6.0	15.1	30.2
DE	0.01	0.019	0.11	0.10	0.1	0.8	1.1	2.2
CV (%)	3.0	5.4	14.3	6.6	2.5	12.8	7.1	7.1
Er (%)	3.4	-7.2	-1.5	1.8	2.8	-0.7	0.8	0.6

Tanto el coeficiente de variación como el error relativo correspondiente a la validación analítica del acebutolol son bajos. El error relativo se distribuye de forma asimétrica.

Tabla 3-8 Concentraciones teóricas y experimentales correspondientes a cada recta de validación de la metodología analítica interdiaria del atenolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 en el ámbito de concentraciones entre 0.05 – 30 µg/mL. Se acompañan de los valores medios, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y error relativo porcentual (Er%)

Fármaco: Atenolol										
Recta	Concentración (µg/ml)									
	0.050	0.10	0.20	0.375	0.75	1.50	3.0	6.0	15.0	30.0
R1	0.054	0.11	0.19	0.340	0.73	1.39	3.1	6.2	16.0	32.1
R2	0.055	0.09	0.19	0.339	0.70	1.50	3.1	6.1	15.9	31.3
R3	0.053	0.09	0.18	0.401	0.71	1.50	3.0	6.1	15.1	30.1
R4	0.060	0.09	0.19	0.367	0.69	1.44	3.0	5.7	15.5	30.1
R5	0.054	0.09	0.19	0.389	0.72	1.50	3.0	5.9	15.4	30.6
R6	0.055	0.09	0.18	0.381	0.71	1.51	3.0	6.2	15.3	30.6
Media	0.055	0.09	0.18	0.369	0.71	1.47	3.0	6.0	15.5	30.8
DE	0.003	0.01	0.01	0.026	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.8
CV (%)	4.7	8.0	3.5	7.0	1.9	3.2	2.2	2.7	2.2	2.5
Er (%)	10.3	-8.0	-7.6	-1.5	-5.6	-1.9	0.6	0.6	3.5	2.7

Los valores del coeficiente de variación porcentual en la validación analítica del atenolol son inferiores al 9%. La distribución del error relativo ha resultado ser asimétrica.

Tabla 3-9 Concentraciones teóricas y experimentales correspondientes a cada recta de validación de la metodología analítica interdiaria de labetalol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 en el ámbito de concentraciones entre 0.05 – 30 µg/mL. Se acompañan de los valores medios, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y error relativo porcentual (Er%)

Fármaco: Labetalol										
Recta	Concentración (µg/ml)									
	0.050	0.10	0.20	0.375	0.75	1.50	3.0	6.0	15.0	30.0
R1	0.052	0.09	0.20	0.379	0.73	1.46	3.0	5.7	16.0	31.9
R2	0.052	0.11	0.19	0.298	0.77	1.43	3.4	5.7	14.6	31.0
R3	0.055	0.10	0.19	0.289	0.73	1.38	3.3	6.1	14.3	31.1
R4	0.050	0.10	0.20	0.351	0.69	1.41	3.0	6.6	16.0	30.6
R5	0.052	0.10	0.21	0.326	0.68	1.42	2.9	6.0	15.2	30.9
R6	0.050	0.10	0.20	0.343	0.69	1.44	2.9	6.0	16.5	32.0
Media	0.052	0.10	0.20	0.331	0.71	1.42	3.1	6.0	15.4	31.3
DE	0.002	0.01	0.01	0.034	0.03	0.03	0.2	0.3	0.9	0.6
CV (%)	3.6	5.2	4.9	10.2	4.6	1.9	6.4	5.4	5.5	1.9
Er (%)	3.8	2.1	-1.6	-11.7	-4.7	-5.2	3.4	0.3	3.0	4.2

La validación analítica del labetalol, concreta valores para el coeficiente de variación porcentual que no superan el 11% y el error relativo se distribuye de forma asimétrica.

Tabla 3-10 Concentraciones teóricas y experimentales correspondientes a cada recta de validación de la metodología analítica interdiaria de metoprolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 en el ámbito de concentraciones entre 0.2 – 30 µg/mL. Se acompañan de los valores medios, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y error relativo porcentual (Er%)

Fármaco: Metoprolol								
Recta	Concentración (µg/ml)							
	0.20	0.375	0.75	1.50	3.0	6.0	15.0	30.0
R1	0.21	0.390	0.69	1.50	3.0	6.0	15.0	30.0
R2	0.22	0.354	0.72	1.46	3.0	5.7	15.3	30.7
R3	0.22	0.382	0.70	1.48	3.0	5.8	15.1	30.2
R4	0.23	0.401	0.74	1.48	3.0	6.1	14.9	30.1
R5	0.22	0.358	0.71	1.46	3.0	5.7	15.3	30.6
R6	0.23	0.358	0.71	1.50	3.1	5.8	15.1	30.0
Media	0.22	0.374	0.71	1.48	3.0	5.9	15.1	30.2
DE	0.01	0.020	0.02	0.02	0.0	0.1	0.2	0.3
CV (%)	3.8	5.3	2.8	1.1	1.1	2.5	1.0	1.0
Er (%)	10.0	-0.3	-5.3	-1.4	0.2	-2.4	0.8	0.8

El coeficiente de variación porcentual en la validación analítica del metoprolol es, en todos los casos, inferior al 6%. El error relativo, menor del 10%, presenta valores positivos y negativos aleatoriamente.

Tabla 3-11 Concentraciones teóricas y experimentales correspondientes a cada recta de validación de la metodología analítica interdiaria de oxprenolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 en el ámbito de concentraciones entre 0.2 – 30 µg/mL. Se acompañan de los valores medios, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y error relativo porcentual (Er%)

Fármaco: Oxprenolol								
Recta	Concentración (µg/ml)							
	0.20	0.375	0.75	1.50	3.0	6.0	15.0	30.0
R1	0.20	0.355	0.68	1.47	2.9	5.8	15.1	30.2
R2	0.22	0.365	0.64	1.49	2.9	6.2	14.9	30.0
R3	0.20	0.340	0.71	1.50	2.9	5.8	15.1	30.3
R4	0.21	0.351	0.62	1.50	3.0	5.8	15.0	30.3
R5	0.21	0.359	0.67	1.48	2.9	6.2	14.9	30.0
R6	0.20	0.351	0.71	1.48	3.0	5.8	15.0	30.3
Media	0.21	0.354	0.67	1.49	2.9	5.9	15.0	30.2
DE	0.01	0.008	0.04	0.01	0.0	0.2	0.1	0.1
CV (%)	4.0	2.4	5.3	0.9	1.2	3.3	0.5	0.5
Er (%)	3.0	-5.7	-10.3	-0.9	-2.0	-1.2	0.1	0.6

En la validación de la metodología analítica del oxprenolol, el coeficiente de variación porcentual es en todos los casos inferior al 6% y presenta un error relativo porcentual asimétrico e inferior al 11%.

Tabla 3-12 Concentraciones teóricas y experimentales correspondientes a cada recta de validación de la metodología analítica interdiaria de propranolol en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 en el ámbito de concentraciones entre 0.05 – 30 µg/mL. Se acompañan de los valores medios, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y error relativo porcentual (Er%)

Fármaco: Propranolol										
Recta	Concentración (µg/ml)									
	0.050	0.10	0.20	0.375	0.75	1.50	3.0	6.0	15.0	30.0
R1	0.052	0.10	0.20	0.343	0.72	1.31	3.5	6.3	15.3	30.6
R2	0.057	0.10	0.18	0.319	0.74	1.43	3.2	5.8	15.3	30.5
R3	0.053	0.10	0.19	0.326	0.67	1.45	3.0	5.9	16.4	32.7
R4	0.053	0.09	0.20	0.317	0.75	1.44	2.9	5.8	17.2	34.3
R5	0.059	0.09	0.18	0.333	0.65	1.42	3.0	6.8	14.9	29.8
R6	0.050	0.11	0.20	0.345	0.69	1.46	3.1	6.1	15.0	29.9
Media	0.054	0.10	0.19	0.330	0.70	1.42	3.1	6.1	15.7	31.3
DE	0.003	0.01	0.01	0.012	0.04	0.06	0.2	0.4	0.9	1.8
CV (%)	6.0	7.5	5.8	3.6	5.8	3.9	7.3	6.2	5.8	5.8
Er (%)	7.7	-2.5	-3.5	-11.9	-6.3	-5.5	3.7	1.9	4.4	4.4

En la validación analítica del propranolol, el coeficiente de variación porcentual es, en todos los casos, inferior al 8%. Los valores del error relativo, distribuidos de forma aleatoria, no superan el 12%.

3.1.1.4 Límite de cuantificación y límite de detección

En la tabla 3-13 se muestran los valores correspondientes al límite de detección y límite de cuantificación para la metodología analítica empleada para la cuantificación de los diferentes betabloqueantes en el estudio de permeación, obtenidos de acuerdo con el apartado 2.3.2.5. de material y métodos.

Tabla 3-13 Valores medios y desviación estándar (DE) de los límites de detección y cuantificación de cada uno de los betabloqueantes obtenidos en la validación inter día de las metodologías analíticas

FÁRMACO	LÍMITE DE DETECCIÓN		LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	
	Media ($\mu\text{g/mL}$)	DE	Media ($\mu\text{g/mL}$)	DE
acebutolol	0.532	0.120	1.611	0.363
atenolol	0.102	0.065	0.308	0.197
labetalol	0.303	0.127	0.918	0.385
metoprolol	0.138	0.061	0.418	0.184
oxprenolol	0.134	0.014	0.407	0.041
propranolol	0.238	0.112	0.722	0.112

Los límites de detección son relativamente bajos y los de cuantificación, lo suficientemente sensibles para cuantificar los fármacos en las muestras de trabajo.

3.2 ESTUDIO DE PERMEACION BUCAL EX VIVO

En el presente trabajo se han realizado distintos estudios de absorción bucal de betabloqueantes según lo descrito en el apartado 2.3.5 de material y métodos.

3.2.1 Estudio de permeación intrínseca

Con el fin de estudiar la capacidad intrínseca de los fármacos para atravesar la mucosa bucal, se ha realizado un estudio de permeación transmucosa de los betabloqueantes en solución saturada y filtrada a pH 7.4 utilizando mucosa bucal porcina como membrana de permeación.

En la tabla 3-14 se muestran los valores de concentración de las soluciones saturadas (C_0) de cada uno de los betabloqueantes utilizados en los ensayos de permeación. La concentración de betabloqueante de las soluciones saturadas se ha determinado por CLAE utilizando la metódica analítica descrita en el apartado 2.3.1. de material y métodos.

Tabla 3-14 Concentración de las soluciones saturadas (C_0) utilizadas en el ensayo de permeación bucal intrínseca

Fármaco	C_0 ($\mu\text{g/mL}$)
acebutolol	71005
atenolol	13921
labetalol	1126
metoprolol	32131
oxprenolol	10006
propranolol	82357

En el solvente empleado, la menor solubilidad la presenta el labetalol, siendo el propranolol el más soluble.

3.2.1.1 Cantidades permeadas acumuladas en función del tiempo

Estudio comparativo de las condiciones de almacenamiento de la mucosa (fresca vs congelada)

De acuerdo con lo expuesto en el capítulo Material y Métodos, a fin de comprobar la influencia del proceso de congelación/descongelación de la mucosa bucal de cerdo en la permeación de los fármacos, tomando el propranolol como fármaco de referencia, se ha llevado a cabo un estudio comparativo del proceso utilizando mucosa congelada y fresca.

Las cantidades acumuladas (μg) obtenidas en el estudio de permeación intrínseca para el propranolol en solución saturada y replicado en cada tiempo de muestreo para la mucosa bucal fresca y la mucosa bucal congelada, junto con los valores promedios, desviación estándar (DE), coeficientes de variación porcentual (CV%), mediana, valores mínimo y máximo se muestran en las tablas 3-15 – 3-18.

La representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas (μg) de propranolol junto con los valores medios y DE en el transcurso de la experiencia de permeación intrínseca utilizando mucosa fresca y mucosa congelada se muestra en las figuras 3-13 – 3-16.

Tabla 3-15 Cantidades permeadas acumuladas en mucosa bucal fresca a los tiempos prefijados

Mucosa bucal fresca									
Cerdo	Replicado	Cantidades permeadas acumuladas (μg)							
		0.25 (h)	0.5 (h)	1 (h)	2 (h)	3 (h)	4 (h)	5 (h)	6 (h)
2	1	0.082	1.037	26.77	171.7	424.2	844.6	1228	1811
2	2	0.559	0.810	17.70	141.8	277.1	529.4	1017	1197
2	3	8.845	60.43	287.3	1074	1910	2676	3377	4488
2	4	0.015	4.727	41.59	461.3	905.8	1206	1738	2329
3	5	12.84	697.1	916.2	1616	2439	3896	4403	5998
3	6	0.378	8.294	23.56	60.17	119.0	196.8	280.8	377.9
3	7	0.935	7.638	27.96	85.59	245.3	356.0	490.4	634.2
4	8	0.850	4.260	37.11	186.6	480.2	959.3	1414	1965
4	9	6.760	50.24	327.1	1106	2003	3085	3726	4520
5	10	1.158	28.43	223.7	872.9	1608	2700	3089	3564
5	11	1.246	6.603	56.39	289.2	734.3	1341	1892	2240
6	12	0.516	2.588	29.25	141.3	308.8	659.9	673.7	663.1
7	13	81.32	234.6	889.0	2236	3501	4743	5885	6639
8	14	10.89	42.32	226.1	781.5	1695	2383	2935	3820
8	15	85.67	245.3	870.8	2138	3538	5277	6376	7587
9	16	9.80	21.94	181.7	722.9	1418	1922	2707	3883
10	17	10.00	17.99	66.58	265.6	768.1	1281	1774	2200
10	18	100.5	109.3	162.2	419.3	944.3	1617	2116	2571
11	19	38.16	28.11	88.05	292.9	751.1	1208	1674	2269
11	20	35.93	61.87	128.4	575.5	1248	2022	2487	2859
12	21	113.0	55.98	324.7	1204	2266	3354	4158	4944
12	22	5.101	12.95	32.60	189.6	444.0	804.3	1152	1419
13	23	69.80	139.8	255.8	1079	1922	2740	3383	4238
14	24	17.43	25.00	80.06	442.9	993.7	1615	2224	2673
14	25	15.63	19.61	74.78	371.2	771.5	1210	1485	1852
15	26	41.81	83.33	125.0	730.1	1446	2173	2865	3373
15	27	33.06	81.74	306.2	891.3	1959	2426	2484	2624

Tabla 3-16 Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas en mucosa fresca a los tiempos prefijados

Tiempo (h)	Media (μg)	DE	CV (%)	Mediana	Mínimo	Máximo	n
0.25	26.01	34.08	131.0	10.00	0.0148	113.0	27
0.5	76.00	139.9	184.1	28.11	0.8103	697.1	27
1	215.8	264.0	122.3	125.0	17.70	916.2	27
2	686.8	591.6	86.1	461.3	60.17	2236	27
3	1301	926.7	71.2	993.7	119.0	3538	27
4	1971	1295	65.7	1617	196.8	5277	27
5	2483	1508	60.7	2224	280.8	6376	27
6	3064	1809	59.0	2624	377.9	7587	27

Las cantidades permeadas de propranolol a través de mucosa de cerdo fresca, a los tiempos prefijados, presentan una gran variabilidad entre los distintos animales empleados consecuencia del material biológico utilizado.

Tabla 3-17 Cantidades permeadas acumuladas en mucosa bucal congelada a los tiempos prefijados

Mucosa bucal congelada									
Cerdo	Replicado	Cantidades permeadas acumuladas (μg)							
		0.25 (h)	0.5 (h)	1 (h)	2 (h)	3 (h)	4 (h)	5 (h)	6 (h)
2	1	4.569	11.59	58.65	282.7	569.8	873.6	840.8	982
2	2	8.024	24.84	122.1	438.0	784.7	1114	1472	1860
2	3	22.39	637.9	506.8	1263	2052	2836	3566	4379
4	4	5.525	9.028	57.55	523.4	606.3	1085	2792	3151
4	5	28.33	111.9	489.3	1065	1090	1115	1459	1909
5	6	54.29	39.68	182.1	798.8	1255	2795	3129	3564
6	7	*	368.1	448.5	495.5	679.3	1280	1523	1962
7	8	147.2	164.8	262.2	834.5	1254	2078	2317	2691
8	9	678.5	704.4	634.1	956.6	1621	1789	2005	3160
9	10	27.68	71.91	260.7	1179	1441	1695	1667	3114
10	11	5.648	10.18	28.83	131.5	454.3	902.7	2129	1383
10	12	14.54	31.77	92.75	156.2	271.4	1220	1969	2039
11	13	12.19	24.63	38.84	33.84	492.5	958	1194	1813
11	14	25.02	108.1	369.7	951.4	2166	3099	3021	3334
12	15	13.66	42.06	135.4	365.2	1123	1516	1829	1912
12	16	7.562	26.14	90.16	220.7	647.5	866.2	1127	1251
13	17	14.22	47.14	181.2	223.4	1478	1722	2403	3359
13	18	9.361	18.41	70.02	319.7	433.6	1255	1565	2015
14	19	45.66	197.8	557.1	1370	2518	3281	4195	4585
14	20	10.99	37.52	113.2	312.7	783.4	1608	1974	2219
15	21	11.19	14.57	19.19	17.20	74.02	250.5	2401	3989
15	22	13.33	54.63	181.4	912.5	1944	2368	3031	3695

*: No value

Tabla 3-18 Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas en mucosa congelada a los tiempos prefijados

Tiempo (h)	Media (μg)	DE	CV (%)	Mediana	Mínimo	Máximo	n
0.25	55.23	146.1	264.6	13.66	4.569	678.5	21
0.5	125.3	195.5	156.0	40.87	9.028	704.4	22
1	222.7	191.2	85.9	158.3	19.19	634.1	22
2	584.1	422.2	72.3	466.8	17.20	1370	22
3	1079	669.4	62.0	937.4	74.02	2518	22
4	1623	810.4	49.9	1398	250.5	3281	22
5	2164	845.5	39.1	1990	840.8	4195	22
6	2653	1032	38.9	2455	982.5	4585	22

Cuando se estudia el proceso de permeación del propranolol a través de mucosa de cerdo congelada en distintos animales, los valores medios obtenidos son similares a los estimados cuando se emplea mucosa fresca.

Solución Saturada de Propranolol en Mucosa Fresca

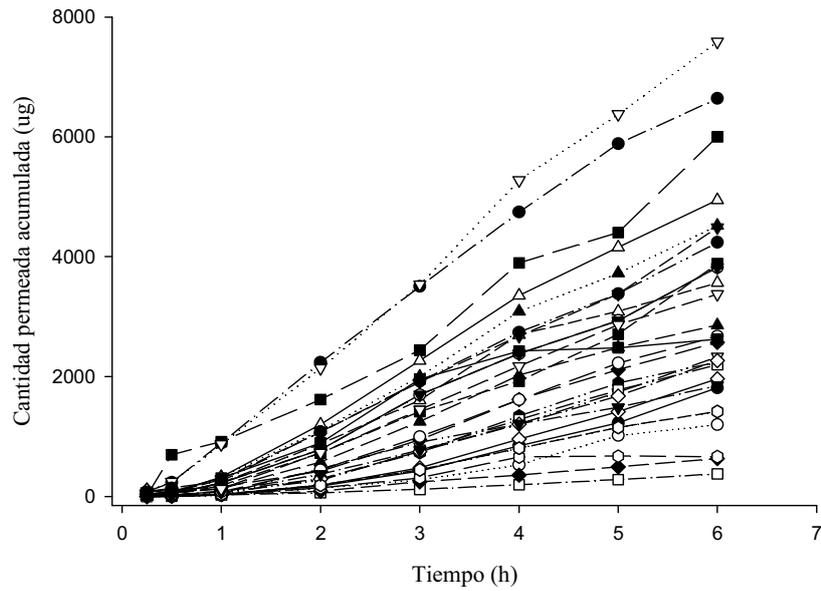


Figura 3-13 Cantidades permeadas acumuladas de propranolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación bucal de la solución saturada de propranolol a través de mucosa bucal fresca

Solución Saturada de Propranolol en Mucosa Congelada

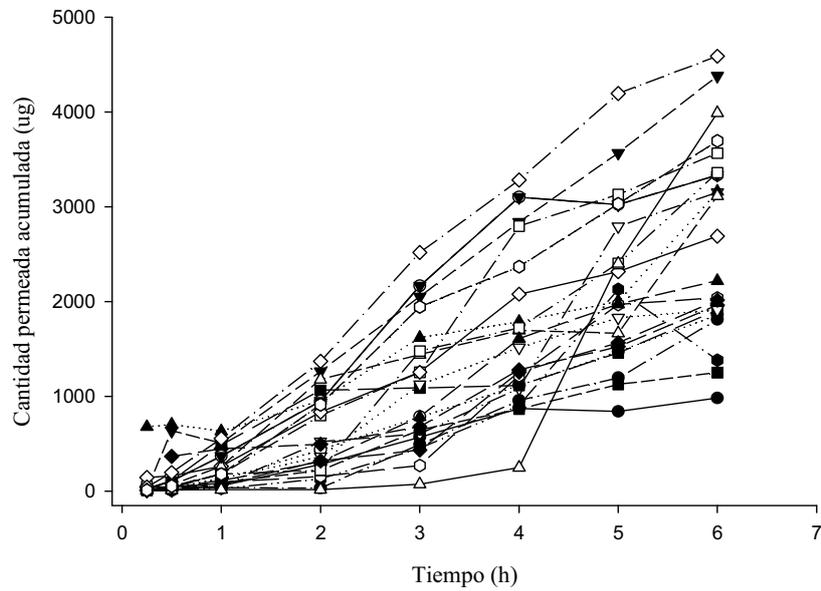


Figura 3-14 Cantidades permeadas acumuladas de propranolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de propranolol a través de mucosa bucal congelada

Solución Saturada de Propranolol en Mucosa Fresca

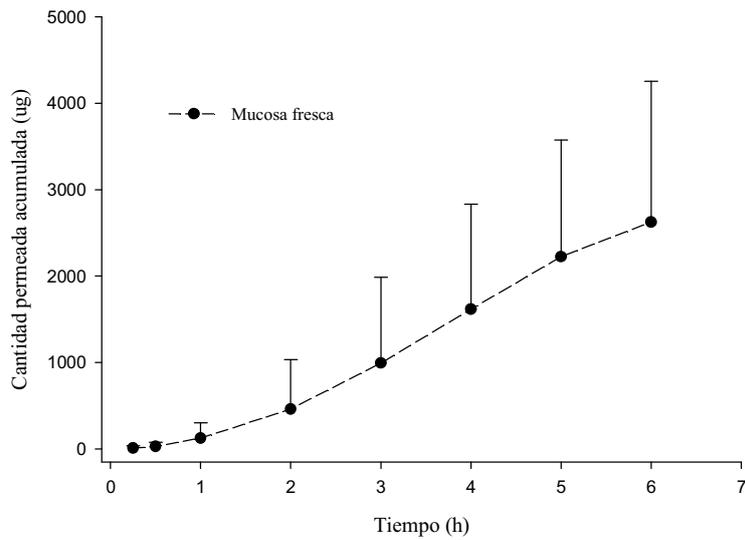


Figura 3-15 Cantidades medias \pm DE permeadas acumuladas de propranolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación bucal de la solución saturada de propranolol a través de mucosa bucal fresca

Solución Saturada de Propranolol en Mucosa Congelada

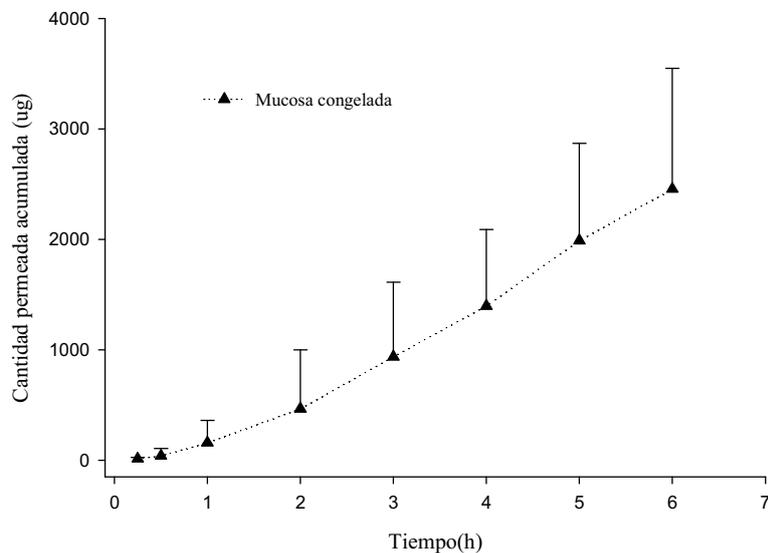


Figura 3-16 Cantidades medias \pm DE permeadas acumuladas de propranolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de propranolol a través de mucosa bucal congelada

La representación gráfica de los valores medios de propranolol permeada a través de mucosa fresca y congelada, obtenidos de los valores individuales expuestos en las figuras 3-13 y 3-14, son muy parecidos. Obsérvese que la cantidad máxima permeada, en los dos casos, es aproximadamente de 3000 μg .

Estudio comparativo de los distintos betabloqueantes

El estudio comparativo de la permeación intrínseca de los betabloqueantes estudiados en la presente Memoria, se ha llevado a cabo utilizando mucosa de cerdo fresca.

Las cantidades acumuladas (μg) obtenidas en el estudio de permeación bucal intrínseca para cada betabloqueante en solución saturada y replicado en cada tiempo de muestreo, junto con los valores promedios, desviación estándar (DE), coeficientes de variación porcentual (CV%), mediana, valores mínimo y máximo se muestran en las tablas 3-19 – 3-30.

La representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas (μg) para cada betabloqueante en el transcurso de la experiencia de permeación bucal intrínseca se muestra en las figuras 3-17 – 3-28.

Tabla 3-19 Cantidades permeadas acumuladas de acebutolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas de acebutolol (μg)							
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8
0.25	0.999	1.859	3.437	1.027	1.346	n.d.	2.856	2.263
0.5	1.253	1.922	3.603	1.440	2.918	2.396	n.d.	3.493
1	1.414	n.d.	4.253	n.d.	n.d.	2.717	3.597	n.d.
2	1.860	n.d.	4.922	n.d.	3.738	2.881	3.629	n.d.
3	1.959	n.d.	6.060	1.827	n.d.	4.034	4.867	3.467
4	2.007	n.d.	6.723	3.580	6.176	4.407	6.126	7.716
5	2.570	2.248	9.376	5.926	12.27	7.433	6.957	13.90
6	5.016	2.920	12.42	15.98	26.18	17.61	10.36	30.70

Tabla 3-20 Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas de acebutolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados

Tiempo (h)	Media	DE	CV (%)	Mediana	Mínimo	Máximo
0.25	1.970	0.9360	47.5	1.859	0.9993	3.437
0.5	2.432	0.9458	38.9	2.396	1.253	3.603
1	2.995	1.228	41.0	3.157	1.414	4.253
2	3.406	1.132	33.2	3.629	1.860	4.922
3	3.703	1.651	44.6	3.751	1.827	6.060
4	5.248	1.995	38.0	6.126	2.007	7.716
5	7.584	4.170	55.0	7.195	2.248	13.90
6	15.15	9.659	63.8	14.20	2.920	30.70

Las cantidades permeadas de acebutolol a través de mucosa fresca de cerdo, son relativamente bajas.

Tabla 3-21 Cantidades permeadas acumuladas de atenolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas de atenolol (µg)							
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8
0.25	39.09	37.80	4.004	n.d.	n.d.	n.d.	11.24	51.64
0.5	61.41	49.01	8.024	n.d.	n.d.	n.d.	48.89	135.8
1	85.59	60.86	9.291	n.d.	n.d.	0.6583	148.4	333.3
2	114.7	88.73	10.86	n.d.	n.d.	2.021	369.1	637.5
3	127.2	113.9	36.30	0.7491	0.5853	4.136	599.2	1053
4	130.1	128.5	44.52	0.7853	0.7314	6.557	771.6	1280
5	137.4	148.2	52.43	0.9498	1.138	9.728	944.7	1578
6	154.1	189.7	61.47	2.610	2.520	13.94	1231	2000

Tabla 3-22 Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas de atenolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados

Tiempo (h)	Media	DE	CV (%)	Mediana	Mínimo	Máximo
0.25	28.75	20.20	70.2	37.80	4.004	51.64
0.5	60.63	46.62	76.9	49.01	8.024	135.8
1	106.4	123.6	116.2	73.22	0.6583	333.3
2	203.8	250.8	123.1	101.7	2.021	637.5
3	241.8	383.5	158.6	75.08	0.5853	1053
4	295.4	473.8	160.4	86.50	0.7314	1280
5	359.1	585.1	162.9	94.91	0.9498	1578
6	456.9	747.3	163.6	107.8	2.520	2000

En el caso del atenolol, el valor medio de las cantidades permeadas a través de mucosa biológica, son aproximadamente, 25 veces superiores a las obtenidas con el acebutolol.

Tabla 3-23 Cantidades permeadas acumuladas de labetalol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas de labetalol (μg)					
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
0.25	2.178	0.9638	2.269	n.d.	4.291	2.354
0.5	2.576	2.256	4.660	3.635	4.957	n.d.
1	2.842	2.678	6.532	3.151	20.65	2.818
2	4.652	3.615	12.36	11.63	55.80	2.966
3	5.403	3.937	19.40	24.05	92.29	4.903
4	6.414	3.949	31.85	39.53	150.4	5.003
5	6.528	8.336	54.67	71.51	200.3	7.199
6	13.26	12.24	77.27	104.8	252.3	n.d.

Tabla 3-24 Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas de labetalol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados

Tiempo (h)	Media	DE	CV (%)	Mediana	Mínimo	Máximo
0.25	2.411	1.194	49.5	2.269	0.9638	4.291
0.5	3.617	1.206	33.3	3.635	2.256	4.957
1	6.445	7.113	110.4	2.996	2.678	20.65
2	15.17	20.32	134.0	8.139	2.966	55.80
3	25.00	34.03	136.2	12.40	3.937	92.29
4	39.53	56.41	142.7	19.13	3.949	150.4
5	58.09	75.02	129.1	31.50	6.528	200.3
6	91.97	98.28	106.9	77.27	12.24	252.3

Las cantidades medias permeadas de labetalol, son relativamente bajas en todos los replicados realizados.

Tabla 3-25 CANTIDADES PERMEADAS ACUMULADAS DE METOPROLOL EN MUCOSA BUCAL DE CERDO A LOS TIEMPOS PREFIJADOS

Tiempo (h)	CANTIDADES PERMEADAS ACUMULADAS DE METOPROLOL (µg)							
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8
0.25	n.d.	n.d.	5.412	n.d.	15.58	n.d.	21.46	15.37
0.5	n.d.	n.d.	47.04	24.93	66.61	11.44	77.01	46.35
1	19.97	n.d.	174.0	221.8	39.94	74.03	246.2	156.5
2	144.8	74.30	462.3	182.2	592.1	234.3	543.0	482.4
3	436.9	287.5	763.3	341.9	1012	469.0	951.6	827.5
4	736.0	513.7	1240	611.1	1557	707.8	1177	1293
5	1079	804.3	1603	746.7	1995	996.1	1647	1697
6	1250	1266	1764	974.6	2023	1198	1904	1969

Tabla 3-26 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LAS CANTIDADES PERMEADAS ACUMULADAS DE METOPROLOL EN MUCOSA BUCAL DE CERDO A LOS TIEMPOS PREFIJADOS

Tiempo (h)	Media	DE	CV (%)	Mediana	Mínimo	Máximo
0.25	14.46	6.658	46.1	15.48	5.412	21.46
0.5	45.56	24.60	54.0	46.69	11.44	77.01
1	133.2	89.31	67.0	156.5	19.97	246.2
2	339.4	201.7	59.4	348.3	74.30	592.1
3	636.2	285.2	44.8	616.1	287.5	1012
4	979.6	382.7	39.1	956.4	513.7	1557
5	1321	469.4	35.5	1341	746.7	1995
6	1543	413.2	26.8	1515	974.6	2023

El metoprolol permea, a través de mucosa fresca de cerdo, presentando, a los tiempos prefijados cantidades altas de fármaco y, presenta, una baja variabilidad respecto a los otros betabloqueantes estudiados.

Tabla 3-27 Cantidades permeadas acumuladas de oxprenolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas de oxprenolol (µg)							
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8
0.25	14.21	n.d.	0.0534	0.1445	n.d.	0.1136	n.d.	0.3846
0.5	42.57	7.913	n.d.	7.005	23.36	0.2367	23.29	n.d.
1	176.3	78.33	n.d.	87.60	109.4	14.91	115.2	n.d.
2	674.0	435.7	5.125	392.0	532.5	127.0	493.0	n.d.
3	1033	767.2	33.21	695.3	774.9	268.2	872.0	11.77
4	1568	1059	75.66	1016	1083	406.2	1429	26.03
5	1896	1464	184.2	1231	n.d.	643.1	1764	28.75
6	2054	1934	181.8	1828	2140	847.8	1850	54.66

Tabla 3-28 Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas de oxprenolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados

Tiempo (h)	Media	DE	CV (%)	Mediana	Mínimo	Máximo
0.25	2.981	6.278	210.6	0.1445	0.05339	14.21
0.5	17.40	15.47	88.9	15.60	0.2367	42.57
1	96.95	52.81	54.5	98.51	14.91	176.3
2	379.9	234.6	61.8	435.7	5.125	674.0
3	556.9	394.8	70.9	731.3	11.77	1033
4	832.9	591.6	71.0	1037	26.03	1568
5	1030	751.0	72.9	1231	28.75	1896
6	1361	864.5	63.5	1839	54.66	2140

El oxprenolol presenta una gran variabilidad en las cantidades permeadas, especialmente a los tiempos tempranos. Sin embargo, las cantidades permeadas son relativamente elevadas.

Tabla 3-29 Cantidades permeadas acumuladas de propranolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados

Tiempo (h)	Cantidades permeadas acumuladas de propranolol (μg)							
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8
0.25	0.4158	1.561	1.107	3.031	1.268	3.584	0.7087	4.124
0.5	3.337	7.825	1.224	4.133	11.30	31.33	1.255	16.00
2	277.5	277.5	383.1	276.5	233.2	711.9	261.2	469.0
3	666.2	711.4	1006	659.0	577.1	1484	358.9	1035
4	1656	1512	1586	1107	1020	2696	1334	1837
5	2552	2082	1649	1919	1574	2842	1641	2737
6	2857	2349	2170	1894	2084	3460	1808	2865

Tabla 3-30 Estadística descriptiva de las cantidades permeadas acumuladas de propranolol en mucosa bucal de cerdo a los tiempos prefijados

Tiempo (h)	Media	DE	CV (%)	Mediana	Mínimo	Máximo
0.25	1.975	1.403	71.0	1.415	0.4158	4.124
0.5	9.550	10.20	106.8	5.979	1.224	31.33
2	361.2	161.5	44.7	277.5	233.2	711.9
3	812.2	349.4	43.0	688.8	358.9	1484
4	1594	523.3	32.8	1549	1020	2696
5	2125	518.2	24.4	2000	1574	2842
6	2436	573.1	23.5	2260	1808	3460

Aunque la variabilidad en el proceso de permeación del propranolol es alta, este betabloqueante es el que presenta una cantidad mayor de fármaco comparado con los otros betabloqueantes estudiados.

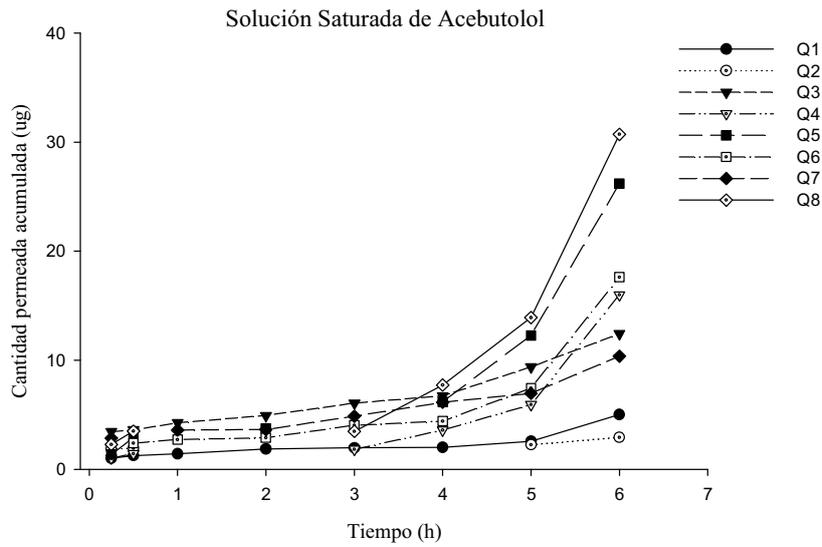


Figura 3-17 Cantidades permeadas acumuladas de acebutolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de acebutolol

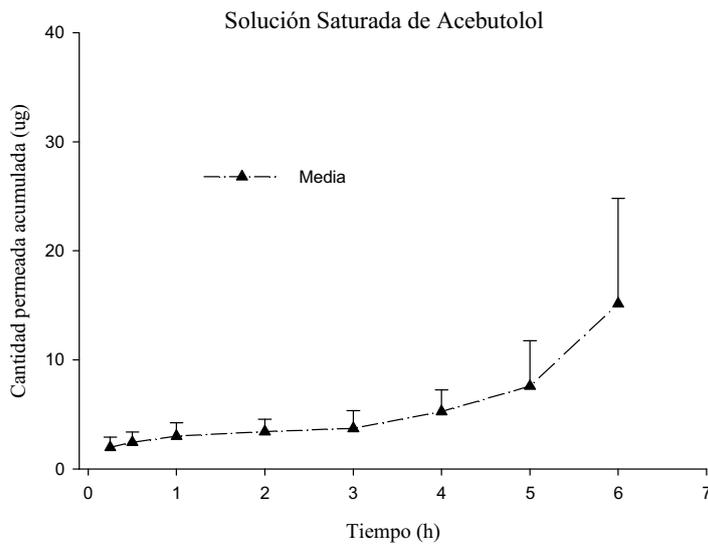


Figura 3-18 Cantidades medias \pm DE permeadas acumuladas de acebutolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de acebutolol

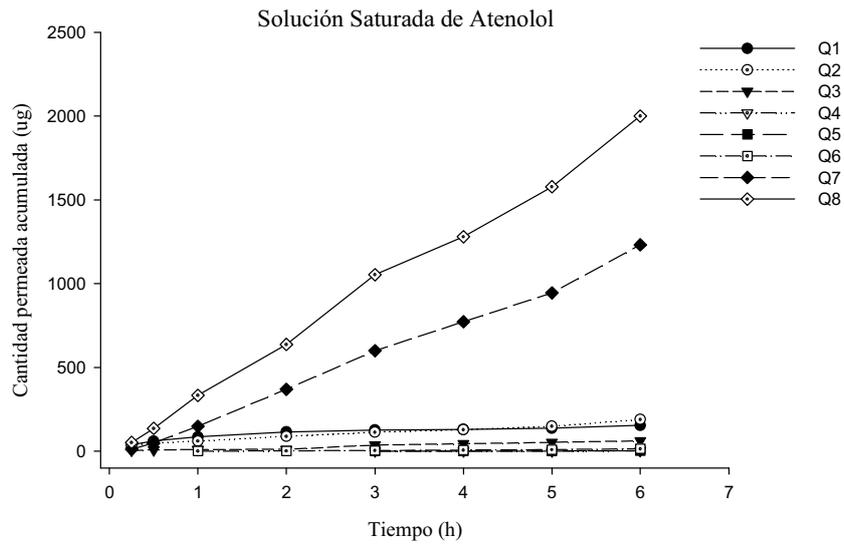


Figura 3-19 Cantidades permeadas acumuladas de atenolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de atenolol

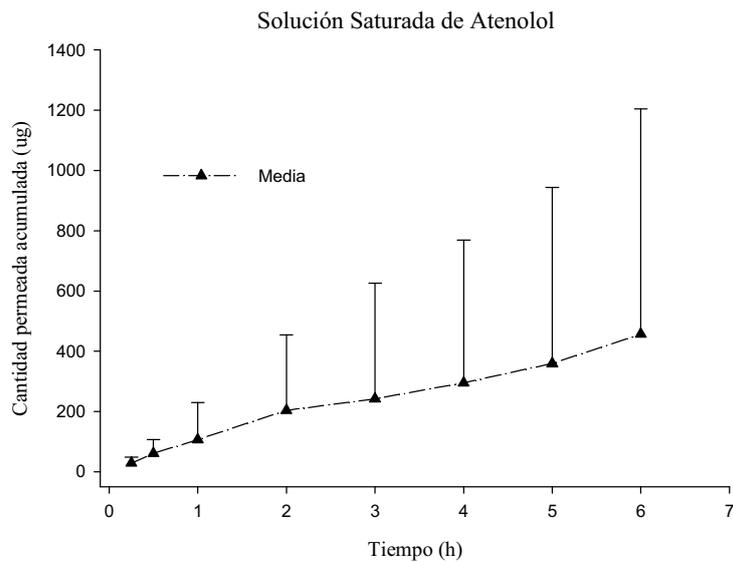


Figura 3-20 Cantidades medias \pm DE permeadas acumuladas de atenolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de atenolol

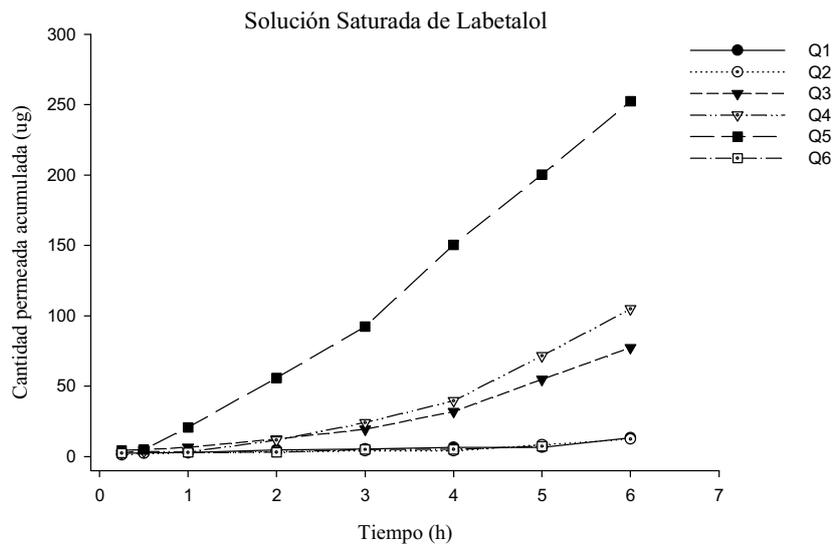


Figura 3-21 Cantidades permeadas acumuladas de labetalol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de labetalol

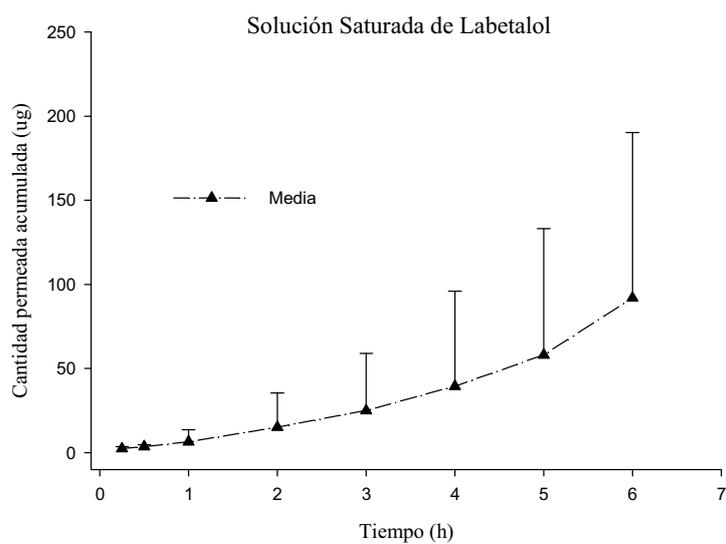


Figura 3-22 Cantidades medias \pm DE permeadas acumuladas de labetalol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de labetalol

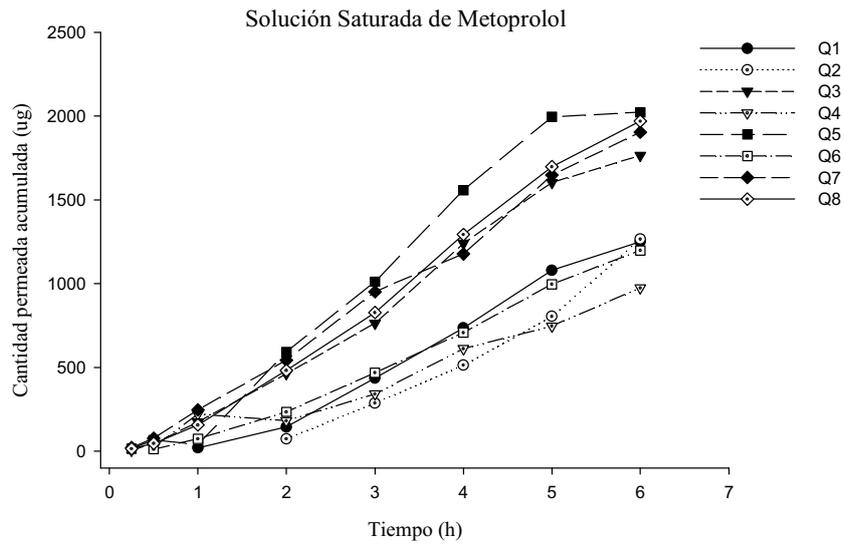


Figura 3-23 Cantidades permeadas acumuladas de metoprolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de metoprolol

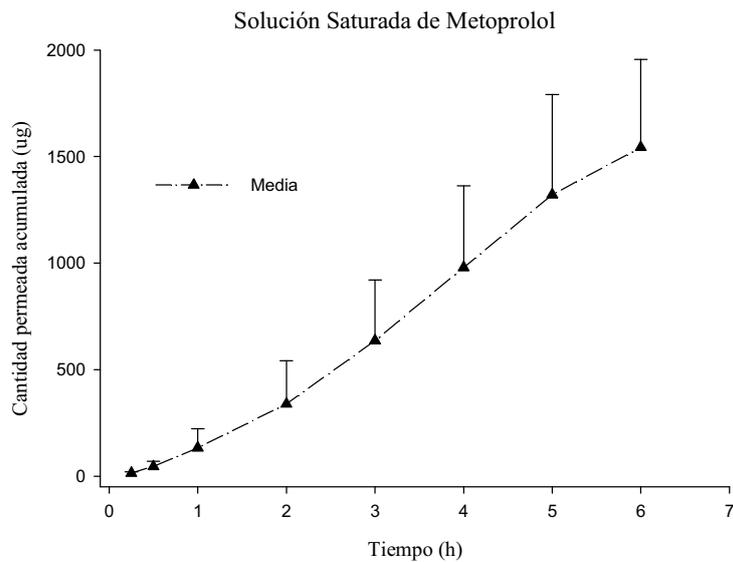


Figura 3-24 Cantidades medias \pm DE permeadas acumuladas de metoprolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de metoprolol

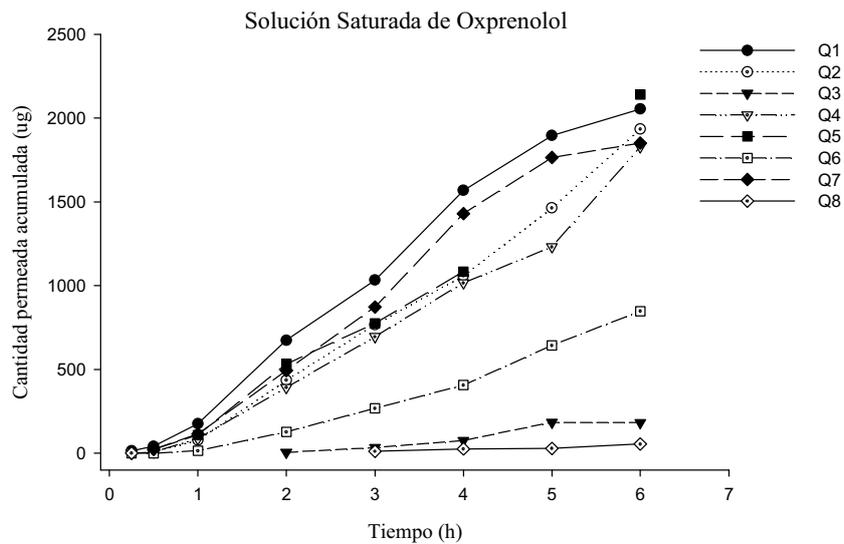


Figura 3-25 Cantidades permeadas acumuladas de oxprenolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de oxprenolol

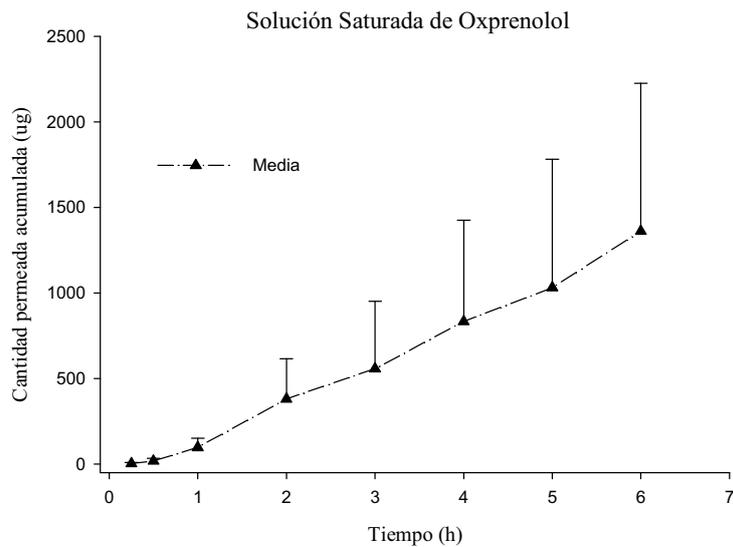


Figura 3-26 Cantidades medias \pm DE permeadas acumuladas de oxprenolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de oxprenolol

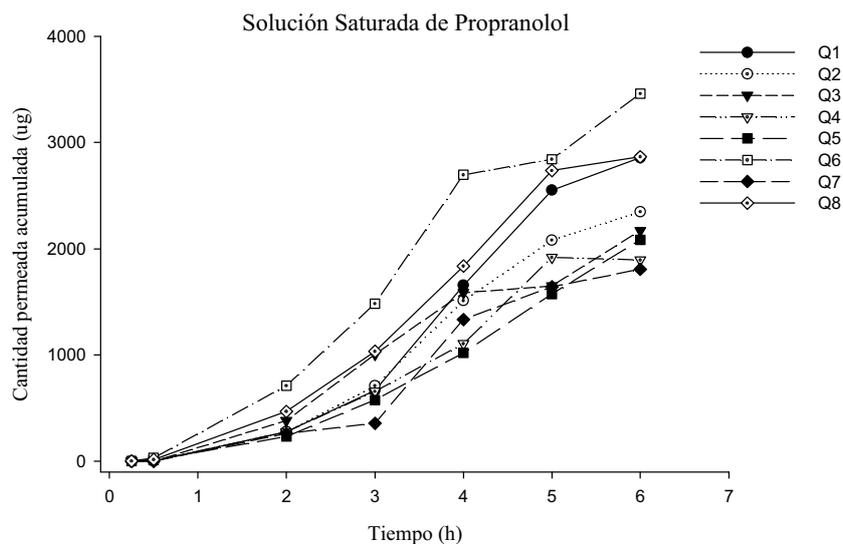


Figura 3-27 Cantidades permeadas acumuladas de propranolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de propranolol

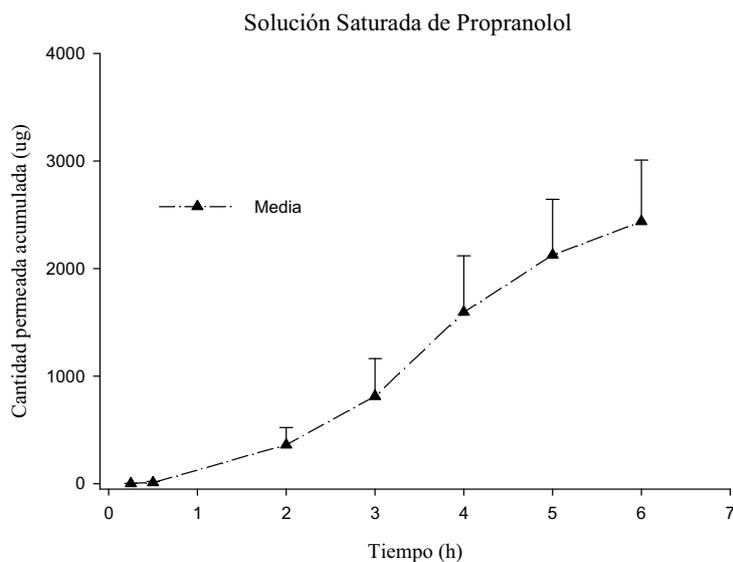


Figura 3-28 Cantidades medias \pm DE permeadas acumuladas de propranolol (μg) respecto al tiempo (h) obtenidas en el estudio de permeación de la solución saturada de propranolol

En las representaciones gráficas de las cantidades de betabloqueantes permeados respecto al tiempo, puede deducirse que el fármaco que presenta mayor permeación es el propranolol, cuyo valor medio es aproximadamente 2500 μg en el último tiempo de toma de muestras.

3.2.1.2 Parámetros de permeación

Estudio comparativo de las condiciones de almacenamiento de la mucosa bucal (fresca vs congelada)

A fin de confirmar la influencia del proceso de congelación de la mucosa de cerdo en el paso del propranolol (betabloqueante de referencia), se lleva a cabo un estudio estadístico de los parámetros de permeación obtenidos utilizando mucosa fresca y congelada.

En las tablas 3-31 y 3-32 se muestran los valores individuales, mediana, mínimo y máximo, de los distintos parámetros de permeación: parámetros P_1 y P_2 , coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo en estado de equilibrio estacionario (J), período de latencia (TI) y $TMWL$ obtenidos de acuerdo con un modelo de dosis infinitas para el propranolol a través de mucosa bucal porcina fresca y congelada.

Tabla 3-31 Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P_1 , P_2 , K_p , J , TI y $TMWL$) obtenidos para la solución de propranolol a través de mucosa fresca aplicando un modelo de dosis infinitas

Mucosa bucal fresca							
Cerdo	Replicado	Parámetros de permeación					
		P_1 (cm)	P_2 (h ⁻¹)	$K_p \cdot 10^2$ (cm/h)	J ($\mu\text{g}/\text{h} \cdot \text{cm}^2$)	TI (h)	$TMWL$ (g/hm ²)
2	1	0.0816	0.0923	0.7530	337.4	1.805	9.2
2	2	0.0618	0.0936	0.5785	259.2	1.781	6.9
2	3	0.0746	0.2255	1.6832	754.1	0.739	8.0
2	4	0.0608	0.1525	0.9269	415.3	1.093	2.5
3	5	0.0576	0.2881	1.6589	975.5	0.579	3.3
3	6	0.0104	0.1186	0.1233	72.5	1.405	5.1
3	7	0.0162	0.1281	0.2075	122.0	1.301	9.9
4	8	0.0179	0.0941	0.1685	408.2	1.771	12.5
4	9	0.0248	0.2674	0.6622	777.5	0.623	18.6
5	10	0.0176	0.3020	0.5315	624.0	0.552	18.5
5	11	0.0337	0.1164	0.3918	460.0	1.432	8.2
6	12	0.0034	0.3170	0.1091	128.1	0.526	10.1
7	13	0.0052	1.7470	0.9060	1063.6	0.095	3.7
8	14	0.0267	0.2019	0.5391	665.3	0.826	2.6
8	15	0.0226	0.4479	1.0122	1249.1	0.372	5.1
9	16	0.0404	0.1389	0.5606	691.8	1.200	7.4
10	17	0.0706	0.1174	0.8282	443.1	1.420	16.4
10	18	0.0669	0.1390	0.9303	497.7	1.199	9.0
11	19	0.0725	0.1143	0.8284	443.2	1.458	22.4
11	20	0.0494	0.1998	0.9867	527.9	0.834	15.3
12	21	0.0566	0.2770	1.5692	852.1	0.602	25.5
12	22	0.0467	0.1135	0.5304	288.0	1.468	15.2
13	23	0.0441	0.2952	1.3022	707.1	0.565	12.1
14	24	0.0689	0.1382	0.9526	517.3	1.206	11.3
14	25	0.0334	0.1844	0.6153	334.1	0.904	14.1
15	26	0.0567	0.1979	1.1226	609.5	0.842	21.2
15	27	0.0154	0.6391	0.9859	535.4	0.261	12.7
Media		0.0421	0.2647	0.7950	546.6	0.995	11.4
DE		0.0237	0.3207	0.4330	283.7	0.482	6.3
CV (%)		56.4	121.2	54.5	51.9	48.5	55.0
Mediana		0.0441	0.1844	0.8282	517.3	0.904	10.1
Mínimo		0.0034	0.0923	0.1091	72.5	0.095	2.5
Máximo		0.0816	1.7470	1.6832	1249.1	1.805	25.5

Tabla 3-32 Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P1, P2, Kp, J, Tl y TMWL) obtenidos para la solución de propranolol a través de mucosa congelada aplicando un modelo de dosis infinitas

Mucosa bucal congelada							
Cerdo	Replicado	Parámetros de permeación					
		P1 (cm)	P2 (h ⁻¹)	Kp·10 ² (cm/h)	J (μg/h·cm ²)	Tl (h)	TMWL (g/hm ²)
2	1	0.0079	0.5383	0.4231	171.4	0.310	19.5
2	2	0.0376	0.2110	0.7928	321.1	0.790	11.7
2	3	0.0376	0.4623	1.7387	704.2	0.361	16.9
4	4	0.1196	0.0922	1.1035	676.5	1.807	14.6
4	5	0.0438	0.1346	0.5892	361.2	1.238	25.7
5	6	0.0582	0.1888	1.0982	673.2	0.883	25.9
6	7	0.0288	0.1949	0.5603	343.5	0.855	21.9
7	8	0.0067	1.0549	0.7083	434.2	0.158	23.8
8	9	0.0009	7.8137	0.7105	435.5	0.021	21.7
9	10	0.0035	1.9578	0.6773	415.2	0.085	23.9
10	11	0.0701	0.1038	0.7276	379.8	1.606	21.4
10	12	0.1102	0.0864	0.9516	496.7	1.930	28.3
11	13	0.0842	0.0881	0.7417	387.2	1.891	19.5
11	14	0.0352	0.3720	1.3112	684.5	0.448	28.2
12	15	0.0179	0.3705	0.6620	345.5	0.450	26.1
12	16	0.0202	0.2186	0.4424	230.9	0.762	19.8
13	17	0.0878	0.1152	1.0112	654.3	1.447	25.3
13	18	0.0582	0.1091	0.6352	411.0	1.528	22.8
14	19	0.0045	2.5379	1.1392	737.1	0.066	17.8
14	20	0.0524	0.1341	0.7031	454.9	1.243	14.0
15	21	0.2328	0.0620	1.4430	933.6	2.689	16.5
15	22	0.0228	0.4100	0.9345	604.6	0.407	25.9
Media		0.0519	0.7844	0.8684	493.5	0.953	21.4
DE		0.0530	1.6920	0.3311	188.7	0.738	4.7
CV (%)		102.2	215.7	38.1	38.2	77.4	22.0
Mediana		0.0376	0.2029	0.7347	434.9	0.823	21.8
Mínimo		0.0009	0.0620	0.4231	171.4	0.021	11.7
Máximo		0.2328	7.8137	1.7387	933.6	2.689	28.3

Estudio comparativo de los distintos betabloqueantes

Empleando mucosa de cerdo fresca, se procede al cálculo de los parámetros de permeación correspondientes a los betabloqueantes ensayados en la presente Memoria.

Los distintos parámetros de permeación: parámetros P_1 y P_2 , coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo en estado de equilibrio estacionario (J) y período de latencia (TL), obtenidos de acuerdo con un modelo de dosis infinitas para cada betabloqueante en solución saturada, junto con la media, DE, CV(%), mediana, valores mínimo y máximo se muestran en las tablas 3-33 – 3-38.

Tabla 3-33 Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P_1 , P_2 , K_p , J , y TL) obtenidos para la solución de acebutolol a través de mucosa bucal porcina aplicando un modelo de dosis infinitas

Acebutolol					
Replicado	Parámetros de permeación				
	P_1 (cm)	P_2 (h ⁻¹)	$K_p \cdot 10^2$ (cm/h)	J ($\mu\text{g}/\text{h} \cdot \text{cm}^2$)	TL (h)
1	0.0001	0.1118	0.0012	0.9	1.491
2	0.0001	0.5180	0.0026	1.9	0.524
3	0.0030	0.0319	0.0097	6.8	3.630
4	0.0047	0.0339	0.0160	11.4	3.512
5	0.0071	0.0250	0.0179	6.6	3.516
6	0.0000	0.8503	0.0021	1.5	0.408
7	0.0050	0.0345	0.0174	12.4	3.482
Media	0.0029	0.2293	0.0096	5.9	2.366
DE	0.0029	0.3265	0.0076	4.7	1.499
CV (%)	100.4	142.4	79.3	79.8	63.3
Mediana	0.0030	0.0345	0.0097	6.6	3.482
Mínimo	0.0000	0.0250	0.0012	0.9	0.408
Máximo	0.0071	0.8503	0.0179	12.4	3.630

El acebutolol presenta un bajo valor de su constante de velocidad de permeación y del flujo. El periodo de latencia es relativamente elevado. El bajo valor del flujo, puede ser debido al bajo valor de P_1 que conlleva un valor bajo de K_p ($K_p = P_1 \cdot P_2$) y como consecuencia un flujo poco productivo ($J = K_p \cdot C_0$). El hecho de que el valor de P_2 es alto respecto al de P_1 , es indicativo de que en el proceso de permeación del acebutolol prevalece la difusión sobre el coeficiente de reparto del fármaco entre el solvente y los lípidos de la membrana.

Tabla 3-34 Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P1, P2, Kp, J, y TL) obtenidos para la solución de atenolol a través de mucosa bucal porcina aplicando un modelo de dosis infinitas

Atenolol					
Replicado	Parámetros de permeación				
	P1 (cm)	P2 (h ⁻¹)	Kp·10 ² (cm/h)	J (µg/h·cm ²)	TL (h)
1	0.0016	0.4561	0.0740	10.3	0.493
2	0.0008	0.0563	0.0043	0.6	2.279
3	0.0011	0.0474	0.0052	0.7	2.492
4	0.0023	0.0887	0.0207	2.9	1.535
5	0.0203	0.6658	1.3501	187.8	0.215
6	0.0090	2.2886	2.0576	277.4	0.046
Media	0.0058	0.6005	0.5853	79.9	1.177
DE	0.0077	0.8647	0.8952	121.6	1.072
CV (%)	131.7	144.0	152.9	152.1	91.1
Mediana	0.0020	0.2724	0.0473	6.6	1.014
Mínimo	0.0008	0.0474	0.0043	0.6	0.046
Máximo	0.0203	2.2886	2.0576	277.4	2.492

En el caso del atenolol, el período de latencia es más bajo comparado con el que presenta el acebutolol. El valor de Kp y del flujo también son más altos que los correspondientes al acebutolol, seguramente debido al alto valor que presenta P₂.

Tabla 3-35 Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P1, P2, Kp, J, y TL) obtenidos para la solución de labetalol a través de mucosa bucal porcina aplicando un modelo de dosis infinitas

Labetalol					
Replicado	Parámetros de permeación				
	P1 (cm)	P2 (h ⁻¹)	Kp·10 ² (cm/h)	J (µg/h·cm ²)	TL (h)
1	0.0070	0.2369	0.1667	1.9	1.167
2	0.0182	0.1078	0.1959	2.2	2.070
3	0.2569	0.0066	0.1703	19.2	2.167
4	0.4670	0.0553	2.5822	31.6	2.313
5	0.2601	0.1566	4.0730	44.7	1.219
Media	0.2018	0.1127	1.4376	19.9	1.787
DE	0.1926	0.0893	1.8041	18.6	0.550
CV (%)	95.4	79.3	125.5	93.6	30.8
Mediana	0.2569	0.1078	0.1959	19.2	2.070
Mínimo	0.0070	0.0066	0.1667	1.9	1.167
Máximo	0.4670	0.2369	4.0730	44.7	2.313

El labetalol tiene un período de latencia parecido al atenolol, seguramente por presentar un valor de P₂ del mismo orden, sin embargo el valor del flujo es menor, seguramente porque su solubilidad (C₀) es muy baja (J=Kp·C₀). Los valores de P₁ y P₂ son del mismo orden por lo que en el proceso de permeación de este fármaco, la influencia de la difusión y del coeficiente de reparto son similares.

Tabla 3-36 Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P1, P2, Kp, J, y Tl) obtenidos para la solución de metoprolol a través de mucosa bucal porcina aplicando un modelo de dosis infinitas

Metoprolol					
Replicado	Parámetros de permeación				
	P1 (cm)	P2 (h ⁻¹)	Kp·10 ² (cm/h)	J (µg/h·cm ²)	Tl (h)
1	0.00008	0.1024	0.0008	268.9	1.568
2	0.00017	0.0586	0.0010	315.4	1.762
3	0.00002	0.4749	0.0009	291.8	0.891
4	0.00003	0.1827	0.0005	169.4	1.103
5	0.00005	0.2494	0.0012	380.4	0.788
6	0.00005	0.1519	0.0007	222.8	1.116
7	0.00002	0.4834	0.0010	306.9	0.448
8	0.00005	0.2284	0.0011	344.9	0.883
Media	0.00006	0.2415	0.0009	287.6	1.070
DE	0.00005	0.1592	0.0002	67.2	0.425
CV (%)	85.7	66.0	23.4	23.4	39.7
Mediana	0.00005	0.2056	0.0009	299.4	0.997
Mínimo	0.00002	0.0586	0.0005	169.4	0.448
Máximo	0.00017	0.4834	0.0012	380.4	1.762

Este fármaco, aunque tiene un valor de la constante de permeabilidad (Kp) muy bajo, el valor del flujo es relativamente elevado, consecuencia de que el valor de su solubilidad es alto (C₀). Para este fármaco, el valor de P₂ es mucho más alto que P₁, por lo que puede deducirse que su proceso de permeación, mayoritariamente es debido a su difusión a través de la mucosa de cerdo.

Tabla 3-37 Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P1, P2, Kp, J, y Tl) obtenidos para la solución de oxprenolol a través de mucosa bucal porcina aplicando un modelo de dosis infinitas

Oxprenolol					
Replicado	Parámetros de permeación				
	P1 (cm)	P2 (h ⁻¹)	Kp·10 ² (cm/h)	J (µg/h·cm ²)	Tl (h)
1	0.0151	0.2570	0.3891	389.3	1.353
2	0.0206	0.1644	0.3392	339.4	0.935
3	0.0091	0.0593	0.0540	54.0	2.097
4	0.0194	0.1608	0.3121	312.3	0.970
5	0.0246	0.1535	0.3784	378.6	0.976
6	0.0192	0.0923	0.1776	177.7	1.476
7	0.0117	0.2867	0.3341	334.3	0.446
8	0.0023	0.0597	0.0135	13.5	2.194
Media	0.0153	0.1542	0.2497	249.9	1.306
DE	0.0073	0.0846	0.1485	148.6	0.603
CV (%)	47.6	54.8	59.4	59.4	46.2
Mediana	0.0172	0.1572	0.3231	323.3	1.164
Mínimo	0.0023	0.0593	0.0135	13.5	0.446
Máximo	0.0246	0.2867	0.3891	389.3	2.194

El período de latencia del oxprenolol es alto, debido al bajo valor que tiene de P₂. El flujo es alto como consecuencia de que también es elevado el valor de Kp (J=Kp·C₀). En este caso la difusión del fármaco a través de la membrana, pesa más que el coeficiente de reparto entre el solvente y los lípidos de la cara externa de la membrana.

Tabla 3-38 Valores individuales, media, DE, CV(%), mediana, mínimo y máximo de los parámetros de permeación (P1, P2, Kp, J, y Tl) obtenidos para la solución de propranolol a través de mucosa bucal porcina aplicando un modelo de dosis infinitas

Propranolol					
Replicado	Parámetros de permeación				
	P1 (cm)	P2 (h⁻¹)	Kp·10² (cm/h)	J (μg/h·cm²)	Tl (h)
1	0.1142	0.0761	0.8698	716.3	1.912
2	0.0630	0.0999	0.6297	518.6	1.466
3	0.0213	0.2157	0.4601	378.9	1.006
4	0.0482	0.1064	0.5129	422.4	1.412
5	0.0807	0.0743	0.5993	493.6	1.911
6	0.0062	0.8583	0.5339	439.7	0.186
7	0.0520	0.0966	0.5019	413.3	1.739
8	0.0570	0.1265	0.7217	594.4	1.184
Media	0.0553	0.2067	0.6037	497.2	1.352
DE	0.0334	0.2671	0.1360	112.0	0.573
CV (%)	60.3	129.2	22.5	22.5	42.4
Mediana	0.0545	0.1032	0.5666	466.6	1.439
Mínimo	0.0062	0.0743	0.4601	378.9	0.186
Máximo	0.1142	0.8583	0.8698	716.3	1.912

El propranolol es el fármaco que presenta un mayor flujo de todos los betabloqueantes estudiados. Este hecho es consecuencia del alto valor que tiene Kp y de que su solubilidad es elevada en el medio dador ($J=Kp \cdot C_0$). También para el propranolol, el valor de P₂ es de un orden más elevado que P₁, por lo que la difusión del fármaco a través de la membrana es preponderante.

3.2.1.3 Concentraciones teóricas de fármaco en estado de equilibrio estacionario

De acuerdo con la ecuación 2-5 del apartado 2.3.5.6 de material y métodos, se calculan las concentraciones teóricas de fármaco en estado de equilibrio estacionario. En la tabla 3-39, se exponen los valores de las concentraciones experimentales, terapéuticas y el aclaramiento plasmático correspondiente a los betabloqueantes ensayados.

Tabla 3-39 Valores de los parámetros correspondientes a los betabloqueantes ensayados. C_{ee(t)}=valor teórico, C_{ee(T)}=valor terapéutico. Se considera un área de permeación efectiva de 2.5cm².

Fármaco	Cl _p (L/h)	C _{ee(t)} (µg/mL)	C _{ee(T)} (µg/mL)
Acebutolol	48.51	0.00034	0.5-2
Atenolol	9.72	0.00170	0.2-1.3
Labetalol	135.6	0.00035	0.025-0.2
Metoprolol	63.65	0.01176	0.025-0.1
Oxprenolol	30.66	0.02636	0.04-0.1
Propranolol	70.07	0.01665	0.05-0.10

La concentración plasmática teórica de fármaco en estado de equilibrio estacionario más alta la presenta el oxprenolol por tener un flujo elevado y un bajo valor de su aclaramiento plasmático ($C_{ee} = J \cdot S / Cl_p$). Con los valores de flujo obtenidos experimentalmente de todos los betabloqueantes ensayados, no se alcanzan concentraciones plasmáticas de fármaco terapéuticas en estado de equilibrio estacionario. Sin embargo, si se adiciona a la formulación una sustancia penetrante (ácido oleico, transcutool, terpenos, etc.) seguramente con el metoprolol, oxprenolol y propranolol se alcanzarían concentraciones terapéuticas en estado de equilibrio estacionario.

3.3 Estudio estadístico

3.3.1 Estudio comparativo entre la mucosa bucal fresca y congelada

A continuación se muestran los resultados del estudio estadístico comparativo de las cantidades permeadas acumuladas y de los parámetros de permeación del propranolol, fármaco de referencia, entre mucosa fresca y congelada, realizados según lo descrito en el apartado 2.3.6 de material y métodos.

3.3.1.1 Cantidades permeadas

En la tablas 3-40, se presenta un cuadro resumen sobre la homogeneidad de variancias y la normalidad obtenidos tras el estudio comparativo de las cantidades permeadas acumuladas de propranolol a través de mucosa fresca y congelada. En la figura 3-29 se representa las cantidades medias acumuladas para el propranolol a través de mucosa fresca y congelada junto con el valor del test de Friedman.

Tabla 3-40 Homogeneidad de variancias y normalidad obtenidos para el estudio comparativo de las cantidades permeadas acumuladas de propranolol a través de mucosa fresca y congelada

Test de Kolmogorov-Smirnov		Test de Levene
Mucosa fresca	Mucosa congelada	p<0.01
p<0.010	p<0.010	

p<0.05: Diferencias estadísticamente significativas

De acuerdo con estos resultados, los valores de las cantidades permeadas acumuladas de propranolol, no presentan homogeneidad de variancias ni distribución normal. En consecuencia, se lleva a cabo el test de Friedman (test no paramétrico).

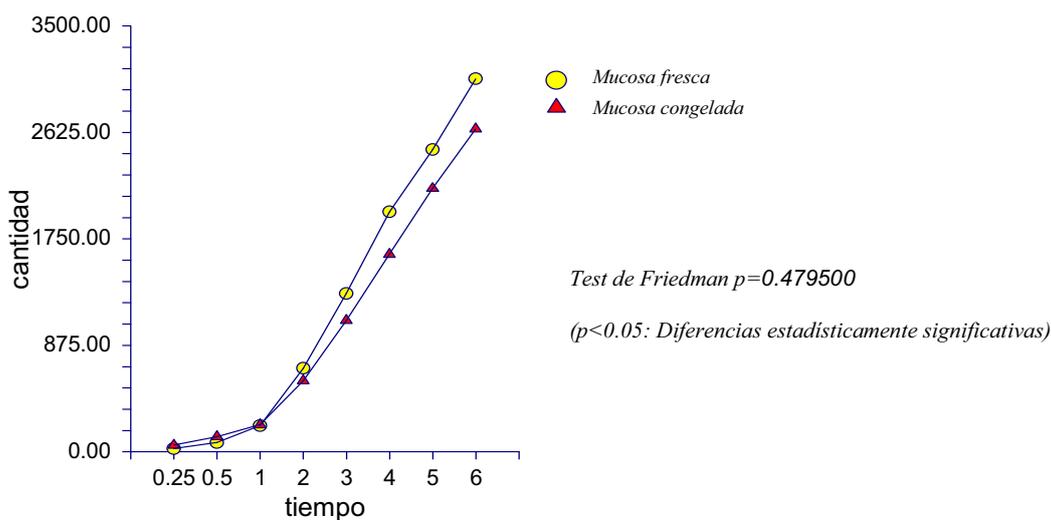


Figura 3-29 Representación de las cantidades medias permeadas acumuladas de propranolol a través de mucosa fresca y congelada. Se acompaña el valor del test de Friedman

La representación gráfica de las cantidades permeadas de propranolol a través de mucosa fresca y congelada muestra que éstas son muy similares.

En la figura 3-29, se pone de manifiesto, de acuerdo con el test de Friedman, que no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades permeadas de propranolol a través de mucosa bucal de cerdo fresca y congelada.

3.3.1.2 Parámetros de permeación

En la tabla 3-41 se presenta un cuadro resumen de la homogeneidad de variancias y la normalidad obtenidos tras el estudio comparativo de los parámetros de permeación del propranolol a través de mucosa fresca y congelada. En la tabla 3-42 se presenta el estudio estadístico realizado para poner de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de permeación obtenidos para el propranolol a través de mucosa fresca y congelada.

Tabla 3-41 Homogeneidad de variancias y normalidad de los parámetros de permeación obtenidos para el propranolol a través de mucosa fresca y congelada

Parámetro	Test de Kolmogorov-Smirnov		Test de Levene
	Mucosa fresca	Mucosa congelada	
J	p>0.150	p=0.089	p=0.0948
Kp	p>0.150	p=0.029	p=0.2148
P1	p>0.150	p=0.065	p=0.1109
P2	p<0.010	p<0.010	p=0.1959
TMWL	p>0.150	p>0.150	p=0.1381
TI	p>0.150	p=0.138	p=0.0295

p<0.05: Diferencias estadísticamente significativas

Tabla 3-42 Análisis estadístico aplicado a los parámetros de permeación del propranolol obtenidos a través de mucosa fresca y congelada

Parámetro	Test	
	ANOVA	Kruskal-Wallis
J	p=0.4552	-
Kp	-	p=0.4570
P1	p=0.3946	-
P2	-	p=0.6439
TMWL	p<0.0001	-
TI	-	p=0.6439

p<0.05: Diferencias estadísticamente significativas

Para los parámetros de representativos del proceso de permeación del propranolol a través de mucosa de cerdo fresca y congelada, no se presentan diferencias estadísticamente significativas excepto para el TMWL. Este hecho es debido a que en la mucosa congelada hay más retención de agua.

3.3.2 Estudio comparativo entre los betabloqueantes ensayados

A continuación se muestran los resultados del estudio comparativo de las cantidades permeadas acumuladas y de los parámetros de permeación de los betabloqueantes estudiados, a través de mucosa de cerdo fresca, según lo descrito en el apartado 2.3.6. de material y métodos.

3.3.2.1 Cantidades permeadas

En la tabla 3-43, se presenta un cuadro resumen sobre la homogeneidad de variancias y la normalidad obtenidos tras el estudio comparativo de las cantidades permeadas, de los distintos betabloqueantes estudiados. En la figura 3-30 se representa las cantidades medias acumuladas para los betabloqueantes a través de mucosa de cerdo fresca junto con el valor del test de Friedman.

Tabla 3-43 Homogeneidad de variancias y normalidad obtenidos para el estudio comparativo de las cantidades permeadas acumuladas de una serie de betabloqueantes a través de mucosa bucal

Fármaco	Test	
	Kolmogorov-Smirnov	Levene
acebutolol	p<0.010	p<0.0001
atenolol	p<0.010	
labetalol	p<0.010	
metoprolol	p=0.012	
oxprenolol	p<0.010	
propranolol	p<0.010	

p<0.05: Diferencias estadísticamente significativas

En este caso tampoco se presentan homogeneidad de variancias ni normalidad. El test de Friedman pone de manifiesto diferencias estadísticamente significativas en las cantidades de fármaco a través de mucosa de cerdo fresca.

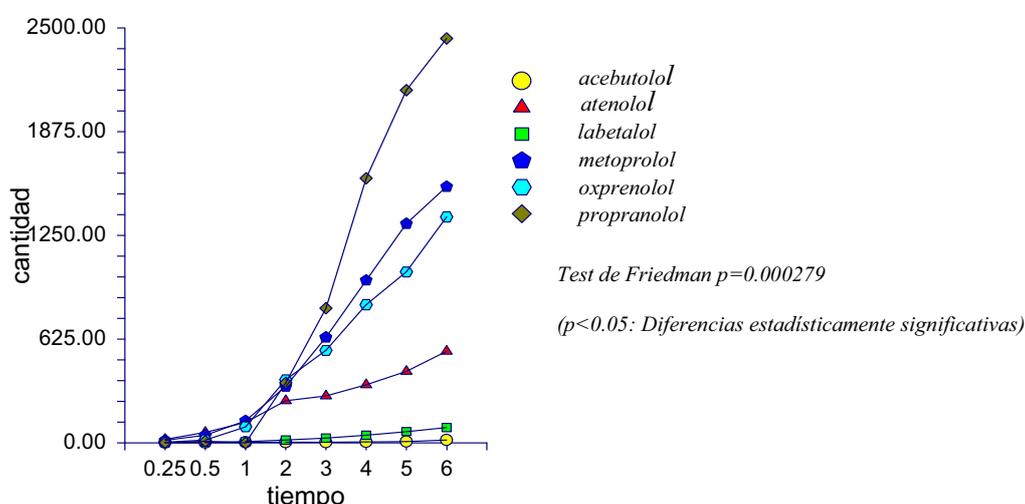


Figura 3-30 Representación de las cantidades medias permeadas acumuladas de los betabloqueantes a través de mucosa. Se acompaña el valor del test de Friedman

En la representación gráfica de las cantidades de betabloqueantes permeadas frente al tiempo, se pone de manifiesto la gran variabilidad de estos fármacos en el proceso de permeación, por lo que se presentan diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades de fármaco permeadas a los tiempos prefijados.

3.3.2.2 Parámetros de permeación

A continuación se muestran dos cuadros resumen de la homogeneidad de variancias y la normalidad, tabla 3-44 y 3-45 respectivamente, obtenidos tras el estudio comparativo de los parámetros de permeación de los distintos betabloqueantes estudiados a través de mucosa bucal de cerdo fresca. En la tabla 3-46 se presenta el estudio estadístico realizado para poner de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de permeación obtenidos para los betabloqueantes estudiados a través de mucosa bucal de cerdo.

Tabla 3-44 Homogeneidad de variancias obtenidos para el estudio comparativo de los parámetros de permeación de una serie de betabloqueantes a través de mucosa bucal

Test de Kolmogorov-Smirnov					
Fármaco	Parámetro				
	J	Kp	P1	P2	Tl
acebutolol	p>0.150	p>0.150	p>0.15	p<0.010	p=0.014
atenolol	p<0.010	p<0.010	p=0.025	p=0.083	p>0.150
labetalol	p>0.150	p=0.038	p>0.150	p>0.150	p>0.150
metoprolol	p>0.150	p>0.150	p=0.012	p>0.150	p>0.150
oxprenolol	p=0.049	p=0.049	p>0.150	p>0.150	p>0.150
propranolol	p>0.150	p>0.150	p>0.150	p<0.010	p>0.150

p<0.05: Diferencias estadísticamente significativas

Tabla 3-45 Normalidad obtenida para el estudio comparativo de los parámetros de permeación de una serie de betabloqueantes a través de mucosa bucal

Parámetro	Test de Levene
J	p=0.0275
Kp	p<0.0001
P1	p<0.0001
P2	p=0.0945
Tl	p<0.0001

p<0.05: Diferencias estadísticamente significativas

Los valores de los parámetros representativos del proceso de permeación a través de mucosa fresca de cerdo de los betabloqueantes estudiados, excepto P₂, no presentan distribución normal.

Tabla 3-46 Análisis estadístico aplicado a los parámetros de permeación obtenidos de una serie de betabloqueantes a través de mucosa bucal

Parámetro	Test de Kruskal-Wallis
J	p<0.0001
Kp	p<0.0001
P1	p<0.0001
P2	p=0.5823
Tl	p=0.2959

p<0.05: Diferencias estadísticamente significativas

De acuerdo con los valores expuestos en la tabla 3-46, excepto para P₂ y el Tl, los parámetros de permeación referenciados, presentan diferencias estadísticamente significativas. El hecho de que no se presenten diferencias estadísticamente significativas para el parámetro P₂, es indicativo de que, en todos los casos la difusión de los fármacos a través de la membrana interviene en el proceso. Por otra parte, el período de latencia es similar en el proceso de permeación de todos los betabloqueantes estudiados.

3.4 Estimación del coeficiente de reparto

Los coeficientes de reparto (P) para los distintos betabloqueantes, estimados en un sistema octanol/solución reguladora de fosfatos de pH 7.4, se han obtenido tal y como está descrito en el apartado 2.3.7 de material y métodos.

En la tabla 3-47 se muestran los valores de pK_a para cada fármaco, los logaritmos de los coeficientes de distribución a pH 7.4 ($\log D_{pH7.4}$) obtenidos de la bibliografía, el logaritmo del coeficiente de reparto ($\log P$) para cada fármaco calculado aplicando la ecuación 2.8 descrita en el apartado 2.3.7. de material y métodos y su correspondiente coeficiente de reparto.

Tabla 3-47 Valores de pK_a , logaritmo del coeficiente de distribución a pH 7.4 ($\log D_{pH7.4}$), logaritmo del coeficiente de reparto ($\log P$) y coeficiente de reparto (P) obtenidos para los distintos betabloqueantes

Fármaco	pK_a	$\log D_{pH7.4}^*$	$\log P$	P
acebutolol	9.1	-0.23	1.478	30.06
atenolol	9.16	-0.8	0.967	9.27
labetalol	9.2	0.52	2.326	211.84
metoprolol	9.17	-0.07	1.707	50.93
oxprenolol	9.6	0.88	3.082	1207.81
propranolol	9.14	1.28	3.028	1066.6

*: Valores tomados de la bibliografía [1]

A partir de los valores bibliográficos del coeficiente de reparto y, por aplicación de la ecuación correspondiente, se ha calculado el valor de $\log D$ teniendo en cuenta el valor de pK_a . Éste valor de pK_a es prácticamente el mismo para todos los betabloqueantes y, dado que el pH es constante (pH 7.4), en todos los casos, la fracción no ionizada de fármaco será prácticamente la misma. El fármaco más lipófilo es el oxprenolol y el menos lipófilo el atenolol.

3.5 Resumen de los valores de los parámetros estudiados

A modo de resumen, en la tabla 3-48, se exponen los resultados, expresados como mediana, de los parámetros biofarmacéuticos y fisicoquímicos utilizados en este trabajo.

Tabla 3-48 Resumen de los valores de los parámetros biofarmacéuticos y fisicoquímicos de los distintos betabloqueantes

Fármaco	P1 (cm)	P2 (h^{-1})	$K_p \cdot 10^2$ (cm/h)	J ($\mu g/h \cdot cm^2$)	TL (h)	C_0 ($\mu g/mL$)	P (-)
acebutolol	0.0030	0.0345	0.0097	6.6	3.482	71005	30.06
atenolol	0.0020	0.2724	0.0473	6.6	1.014	13921	9.27
labetalol	0.2569	0.1078	0.1959	19.2	2.070	1126	211.84
metoprolol	0.00005	0.2056	0.0009	299.4	0.997	32131	50.93
oxprenolol	0.0172	0.1572	0.3231	323.3	1.164	10006	1207.81
propranolol	0.0545	0.1032	0.5666	466.6	1.439	82357	1066.6

De los datos expuestos en esta tabla, puede deducirse que el mayor flujo (J) lo presenta el propranolol y el menor el acebutolol y el atenolol. El propranolol también tiene el

mayor valor de la constante de velocidad de permeación (K_p) debido a los valores relativamente altos de P_1 y P_2 ($K_p=P_1 \cdot P_2$). Este hecho, y debido a la alta solubilidad (C_0) del propranolol en el medio de trabajo, son los factores que permiten a este betabloqueante poseer el flujo más elevado ($J=K_p \cdot C_0$). El mayor período de latencia (TI), lo tiene el acebutolol, indicativo de que este fármaco es el que más se demora en iniciar el proceso de permeación a través de la mucosa de cerdo, debido a que presenta el menor valor de P_2 ($TI=1/6 \cdot P_2$). En todos los casos, el valor de P_2 es mayor que el de P_1 , por lo que la difusión de los fármacos a través de membrana es preponderante en el proceso de permeación de los mismos en atravesar la mucosa de cerdo.

3.6 Estudio de la relación estructura-actividad (QSAR)

De acuerdo con lo expuesto en el epígrafe 2.3.8 de material y métodos, tras llevar a cabo el ajustado de la constante de permeabilidad de los betabloqueantes ensayados y los descriptores electrónicos, estéricos, fisicoquímicos y topológicos descritos en el referido epígrafe, la ecuación que mejor ajusta estadísticamente la variable independiente (K_p) y las variables dependientes (descriptores) es la siguiente:

$$K_p = 0.42961 - 0.07574 (\pm 0.0237) \cdot nRotB + 0.18437 (\pm 0.0377) \cdot \log D \quad (r^2=0.951)$$

(Ecuación 3-1)

Esta ecuación es indicativa de que el coeficiente de reparto del fármaco entre el líquido disolvente y los lípidos de la membrana influye positivamente en el proceso de permeación de los betabloqueantes estudiados. Ni los descriptores electrónicos, estéricos y fisicoquímicos, influyen en el proceso de permeación de los fármacos. Sólo el descriptor topológico relativo al número de enlaces rotacionales ($nRotB$) influye negativamente en la permeabilidad de los betabloqueantes ensayados en el proceso de permeación, seguramente, debido a la flexibilidad de las moléculas.

3.7 REFERENCIAS

- 1 Nielsen H., Romer R. "TR 146 cells on filters as a model of human buccal epithelium: IV. Permeability of water, mannitol, testosterone and beta adrenoreceptor antagonists. Comparison to human, monkey and porcine buccal mucosa". International Journal of Pharmaceutics 194 (2000) 155-167
- 2 The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 14th edition (2006)
- 3 Formulario Nacional Ed. Boletin Oficial del Estado (2003)
- 4 Catálogo de Medicamentos. Consejo general de Oficiales de Farmacéuticos (2011)

DISCUSIÓN

4 DISCUSIÓN

Las figuras 3.1-3.6 muestran los cromatogramas representativos de los diferentes betabloqueantes estudiados. En estas figuras se exponen los tiempos de retención que aparecen en los cromatogramas correspondientes de una solución de 15 microgramos/mL de acebutolol, atenolol, labetalol, metoprolol, oxprenolol y propranolol, respectivamente. La observación de estas figuras permite indicar que la metodología empleada es selectiva ya que no se producen interferencias en el tiempo de retención en el que aparecen los picos cromatográficos de los diferentes betabloqueantes ensayados.

Las tablas 3-1 a 3-6 consignan los resultados correspondientes a los valores de la pendiente y ordenada en el origen de las rectas de calibración obtenidas en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 que correlacionan las concentraciones teóricas frente a las concentraciones experimentales obtenidas para cada ámbito de concentraciones empleadas para los seis betabloqueantes utilizados en este estudio. Se acompañan del coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r^2). Estos resultados, ponen de manifiesto la excelente correlación entre las concentraciones teóricas y experimentales de los betabloqueantes ensayados.

Las figuras 3-7 a 3-12 muestran la representación gráfica de las rectas de calibración de los seis betabloqueantes en solución reguladora de fosfatos de pH 7.4 utilizadas para los diferentes márgenes de concentración utilizados en la validación de la metodología analítica de los diferentes betabloqueantes. Puede considerarse que entre las concentraciones de los betabloqueantes utilizados en el estudio, se presenta linealidad analítica.

Las tablas 3-7 a 3-12 muestran las concentraciones teóricas y experimentales correspondientes a cada recta de calibración de la metodología analítica interdiaria de los distintos betabloqueantes en solución reguladora de pH 7.4 obtenidas de acuerdo con lo expuesto en el apartado 2.3.2.4 de material y métodos. Se acompañan de los valores medios, desviación estándar (DE), coeficiente de variación porcentual (CV%) y error relativo porcentual (Er%). De todo ello, puede deducirse la operatividad de la metodología analítica empleada.

El desarrollo analítico de la presente Memoria, ha dado lugar a una metodología analítica por HPLC selectiva para los betabloqueantes estudiados. La misma ha resultado exacta, con un error relativo (Er%) global comprendido entre el 10.3% y -11.9% y precisa, con un coeficiente de variación global (CV%) comprendido entre el 0.5% y el 14.3%. La metodología analítica ha resultado ser lineal entre las concentraciones de 0.20 – 30 $\mu\text{g/mL}$ para el acebutolol, metoprolol y oxprenolol, y de 0.05-30 $\mu\text{g/mL}$ para el atenolol, labetalol y propranolol. El coeficiente de correlación que relaciona la concentración teórica de los betabloqueantes y la real, ha sido en todos los casos, de $r = 0.999$.

En la tabla 3-13 se muestran los valores medios y desviación estándar (DE) de los límites de detección y cuantificación de cada uno de los betabloqueantes utilizados en la validación interdiaria de las metodologías analíticas utilizadas en la presente Memoria. El límite de detección, está comprendido entre 0.102 $\mu\text{g/mL}$ para el atenolol y 0.532 $\mu\text{g/mL}$ para el acebutolol y el límite de cuantificación, se ha estimado entre 0.308 $\mu\text{g/mL}$ para el atenolol y 1.611 $\mu\text{g/mL}$ para el acebutolol. Estos resultados permiten cuantificar la cantidad de fármaco en cada una

de las muestras tomadas a los tiempos prefijados en el desarrollo del trabajo realizado en la presente Memoria.

Como se ha comentado, la mucosa de cerdo posee unas características anatómicas, en términos de estructura y composición, similares a la humana debido a que no está queratinizada [1, 2, 3]. Por este motivo, los estudios de permeabilidad de los fármacos a través de mucosa, empleando mucosa de cerdo, los resultados obtenidos, pueden ser similares a los que se obtendrían en humanos. Por otra parte, la superficie del área de la mucosa bucal de cerdo, es relativamente grande, lo cual conlleva a minimizar la variabilidad interindividual. Este hecho, permite que los resultados experimentales obtenidos en este trabajo, sean muy orientativos en la utilización de esta vía de administración en humanos para los fármacos ensayados.

La difusión de los betabloqueantes a través de la mucosa bucal de cerdo se realiza por difusión pasiva de la fracción no ionizada independientemente de la concentración inicial de fármaco [4]. Dado que el valor de pK_a es similar para todos los betabloqueantes estudiados y el pH del medio es constante, la fracción no ionizada de fármaco, en este caso, será prácticamente la misma en las condiciones de trabajo con las que se ha realizado la presente Memoria.

En el presente trabajo se han realizado distintos estudios sobre la absorción a través de la mucosa bucal de cerdo utilizando fármacos betabloqueantes según lo descrito en el apartado 2.3.5 de material y métodos. Debido a que la mayoría de estos fármacos, presentan un gran efecto de primer paso por vía oral, se pretende poner de manifiesto si este efecto de primer paso disminuye cuando se administran por vía bucal.

Para realizar el estudio de permeación transbucal exvivo se ha estudiado la capacidad intrínseca de los fármacos para atravesar la mucosa bucal, para ello se ha realizado un estudio de permeación a través de la mucosa de los betabloqueantes en solución saturada y filtrada a pH 7.4 utilizando mucosa bucal porcina como membrana de permeación, de forma que la solución medicamentosa presenta la máxima actividad termodinámica.

En la tabla 3-14 se muestran los valores de concentración de las soluciones saturadas (C_0) de cada uno de los betabloqueantes utilizados en los ensayos de permeación. La concentración de betabloqueante de las soluciones saturadas se ha determinado por CLAE utilizando la metodología analítica descrita en el apartado 2.3.1 de material y métodos. Puede observarse la gran variabilidad que se presenta en las concentraciones a saturación de los fármacos, hecho que influye en la permeación a través de la mucosa de los mismos.

Para estudiar la permeabilidad a través de mucosa de cerdo de los betabloqueantes ensayados, se han utilizado células de Franz, por considerarse que es una de las metodologías más apropiadas para este tipo de estudios [5, 6, 7].

La integridad de la mucosa se ha llevado a cabo empleando el TMWL (Trans Mucosa Water Loss) la cual, a partir de un valor de referencia, permite poner de manifiesto, tras montar la mucosa en las células de Franz, la integridad de la misma. Asimismo, se han cortado las membranas a 400 micrómetros y se ha comprobado su amplitud mediante un micrómetro

adecuado. El empleo del TMWL es más operativo que utilizar colorantes para comprobar la integridad de la mucosa.

El estudio comparativo de la permeación intrínseca de los betabloqueantes estudiados en la presente Memoria, se ha llevado a cabo utilizando mucosa de cerdo fresca. Las cantidades acumuladas (μg) obtenidas en el estudio de permeación bucal intrínseca para cada betabloqueante en solución saturada y replicado en cada tiempo de muestreo, junto con los valores promedios, desviación estándar (DE), coeficientes de variación porcentual (CV%), mediana, valores mínimo y máximo se muestran en las tablas 3-19 - 3-30. Considerando la base biológica del estudio, la DE y el CV% pueden considerarse, en general, aceptables.

La representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas (μg) para cada betabloqueante en el transcurso de la experiencia de permeación bucal intrínseca se muestra en las figuras 3-17 - 3-28. Las figuras muestran, por una parte, la variabilidad intraexperiencia y, por otra, las diferencias que se presentan para los fármacos en la permeación entre los betabloqueantes ensayados.

Los coeficientes de reparto (P) para los distintos betabloqueantes, estimados en un sistema octanol/solución reguladora de fosfatos de pH 7.4, se han obtenido tal y como está descrito en el apartado 2.3.7 de material y métodos.

En la tabla 3-47 se muestran los valores de pKa para cada fármaco, los logaritmos de los coeficientes de distribución a pH 7.4 ($\log D_{\text{pH}7.4}$) obtenidos de la bibliografía, el logaritmo del coeficiente de reparto ($\log P$) para cada fármaco calculado aplicando la ecuación 2.8 descrita en el apartado 2.3.7. de material y métodos y su correspondiente coeficiente de reparto. Puede deducirse que los betabloqueantes ensayados presentan grandes diferencias en su propiedad lipofílica, hecho que influye en la permeabilidad de los mismos a través de la mucosa bucal.

De acuerdo con los valores de la mediana obtenidos para los parámetros biofarmacéuticos de los betabloqueantes estudiados (Tabla 3-48), el mayor flujo lo presenta el propranolol ($466.6 \mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$). Este hecho puede ser debido, por una parte, debido a que es el betabloqueante que presenta un elevado valor de C_0 ($82357 \mu\text{g}/\text{mL}$), siendo el flujo igual a: $J = C_0 \cdot k_p$. Por otra parte porque los valores de P_1 y P_2 son relativamente altos 0.0545 cm y 0.1032 h^{-1} respectivamente ($k_p = P_1 \cdot P_2$). En este sentido, para este fármaco el valor de P_2 es prácticamente el doble del de P_1 , indicativo de que el coeficiente de difusión del propranolol a través de la mucosa (relacionado directamente con el valor de P_2) tiene un papel preponderante en la permeación del betabloqueante respecto a su coeficiente de reparto relacionado con P_1 .

Los betabloqueantes que presentan menor flujo son el acebutolol ($6.6 \mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$) y el atenolol ($6.6 \mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$) siendo además el primero el que presenta mayor periodo de latencia (3.48 h). En el caso del atenolol el valor de P_2 (0.2724 h^{-1}) es superior al del acebutolol (0.0345 h^{-1}) y para ambos fármacos el valor de P_1 es del mismo orden 0.0030 cm y 0.0020 cm respectivamente, lo que indica que el mecanismo de permeación de estos fármacos a través de la mucosa es distinto, preferentemente influye el coeficiente de difusión en el caso del atenolol y para el acebutolol, es similar la influencia del coeficiente de difusión y el

coeficiente de reparto. Aunque el valor de k_p para el atenolol, respecto al del acebutolol es superior, por ser mayor el valor de P_2 y similar el valor de P_1 , el valor del flujo de estos fármacos es similar, debido a que el valor de C_0 es muy superior para el acebutolol (71005 $\mu\text{g/mL}$) que para el atenolol (13921 $\mu\text{g/mL}$).

La menor solubilidad la presenta el labetalol (1126 $\mu\text{g/mL}$), sin embargo, posee un valor de flujo superior al acebutolol y atenolol que son más solubles, 71005 $\mu\text{g/mL}$ y 13921 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Este hecho puede ser debido a que el labetalol posee una mayor difusión a través de la membrana consecuencia de que su coeficiente de reparto (211.84) es superior al del acebutolol y atenolol (30.06 y 9.27) y, por consiguiente también es mayor el valor de P_1 . Por otra parte, el valor de P_2 del labetalol (0.1078 h^{-1}) es del mismo orden que el correspondiente al atenolol (0.2724 h^{-1}) y superior al del acebutolol (0.0345 h^{-1}). La consecuencia final es que el valor de k_p ($P_1 \cdot P_2$) del labetalol ($0.196 \cdot 10^2 \text{ cm/h}$) es superior al del acebutolol ($0.0097 \cdot 10^2 \text{ cm/h}$) y atenolol ($0.0473 \cdot 10^2 \text{ cm/h}$). Dado que el flujo equivale a: $J = C_0 \cdot k_p$, aunque el valor de C_0 del labetalol es inferior al del acebutolol y atenolol, el valor del flujo es superior.

Los resultados obtenidos permiten describir una secuencia de los betabloqueantes estudiados, respecto a la velocidad de permeación a través de mucosa, como sigue:

Propranolol > Oxprenolol > Metoprolol > Labetolol > Acebutolol > Atenolol

De acuerdo con lo expuesto en el epígrafe 2.3.8 de material y métodos, tras llevar a cabo el ajustado de la constante de permeabilidad de los betabloqueantes ensayados y los descriptores electrónicos, estéricos, físicoquímicos y topológicos descritos en el referido epígrafe, la ecuación (Ecuación 3-1) que mejor ajusta estadísticamente la variable independiente (K_p) y las variables dependientes (descriptores) es la siguiente:

$$K_p = 0.42961 - 0.07574 (\pm 0.0237) \cdot n\text{RotB} + 0.18437 (\pm 0.0377) \cdot \log D \quad (r^2=0.951)$$

A partir de la ecuación anterior se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. La correlación obtenida no incluye descriptores electrónicos, es decir, no incluye las cargas asociadas a los átomos de nitrógeno, carbono alquílico, oxígeno y carbono arílico de la estructura química general de los betabloqueantes. Tampoco incluye los descriptores orbitales HOMO y LUMO relacionados con la mayor o menor energía molecular.
2. La capacidad de permeación a través de la mucosa de los betabloqueantes ensayados, no depende de la formación de puentes de hidrógeno aceptores o dadores según se desprende de la correlación lineal múltiple obtenida. Este hecho es indicativo de que no se presenta ninguna limitación por la cual, los fármacos permeen a través del entorno no polar de la mucosa.
3. Ni el volumen molar (VM), ni la superficie molecular (SM), en este caso, influyen en el valor de la constante de permeabilidad de la serie de betabloqueantes estudiados.
4. El peso molecular de los betabloqueantes (PM), no tiene incidencia en la constante de permeabilidad de estos fármacos, seguramente porque excepto el metoprolol (PM = 684.8), el

resto de fármacos posee un peso molecular similar, alrededor de 300 kD. Tampoco influye la solubilidad en la constante de permeabilidad, debido a que todos los betabloqueantes ensayados son solubles en agua y, dado que el pK_a de los mismos es similar en todos los casos (9.1 – 9.6) y valor del pH del medio de la solución dadora es común (pH = 7.4), la fracción no ionizada de los fármacos es prácticamente la misma. El punto de fusión de los fármacos no está incluido en la correlación, debido a que su valor es prácticamente el mismo en todos los casos (140°C – 220°C).

5. Como era de esperar, el valor de la constante de permeabilidad de los fármacos viene influida por el coeficiente de reparto (P) de los mismos (octanol – agua) [8] de forma positiva, a mayor coeficiente de reparto mayor valor de k_p . Efectivamente, el oxprenolol (P = 1207.81) y el propranolol (P = 1066.6) presentan los mayores valores de k_p , $0.3231 \cdot 10^2$ cm/h y $0.5666 \cdot 10^2$ cm/h respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con la teoría pH de reparto que gobiernan los procesos de permeación y absorción [4, 9, 10].

6. La correlación lineal múltiple obtenida, incluye, en sentido negativo, el número de enlaces rotacionales (nRotB). Al aumentar el valor de este descriptor disminuye la velocidad de permeación del fármaco, seguramente influenciado por la flexibilidad de la molécula. Este hecho, a nivel de la permeación, representa que un aumento del valor de este predictor disminuye la biodisponibilidad de los fármacos. Por otra parte, al aumentar el coeficiente de reparto de los fármacos, se incrementa el valor de nRotB, lo cual repercute en un efecto negativo en la permeación a través de mucosa de los fármacos. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por Veber y Ajay [11, 12].

En otro orden de cosas, se muestran los resultados del estudio estadístico comparativo de las cantidades permeadas acumuladas y de los parámetros de permeación de los betabloqueantes estudiados, a través de mucosa de cerdo fresca, según lo descrito en el apartado 2.3.6 de material y métodos.

Se determina la homogeneidad de variancias y la normalidad, tabla 3-44 y tabla 3-45, respectivamente de los valores obtenidos tras el estudio comparativo de los parámetros de permeación de los distintos betabloqueantes estudiados a través de mucosa bucal de cerdo fresca. De acuerdo con los valores expuestos en la tabla 3-46, el test de Friedman pone de manifiesto diferencias estadísticamente significativas, excepto para P_2 y el T1, en las cantidades de fármaco a través de mucosa de cerdo fresca. Asimismo, los valores de los parámetros representativos del proceso de permeación a través de la mucosa fresca de cerdo de los betabloqueantes estudiados, excepto P_2 , no presentan distribución normal y no presentan homogeneidad de varianzas. Como consecuencia de este hecho los datos experimentales se han sometido a un test no paramétrico, el test de Friedman. En la figura 3-30 se representan las cantidades medias acumuladas para los betabloqueantes a través de mucosa de cerdo fresca junto con el valor del test de Friedman (test no paramétrico).

Por otra parte, en las condiciones de trabajo desarrolladas en la presente Memoria, una potencial formulación bucal de liberación controlada conteniendo los betabloqueantes ensayados, no permitiría alcanzar concentraciones terapéuticas en estado de equilibrio estacionario (Tabla 3-39). Sin embargo, se podrían aumentar las concentraciones de fármaco en estado de equilibrio estacionario de los betabloqueantes, si se adicionan a la formulación

sustancias penetrantes, por ejemplo ácido oléico al 5% [13, 14] que aumentan considerablemente el flujo transmucosa con lo que aumentaría el rendimiento terapéutico de estos fármacos administrados por vía bucal.

En el presente trabajo, a fin de disponer de una mayor operatividad en estudios posteriores, se ha investigado la influencia que tiene la permeación de estos fármacos a través de mucosa de cerdo congelada. Para comprobar que no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros biofarmacéuticos de los betabloqueantes empleando mucosa fresca o congelada, se utilizó el propranolol como fármaco de referencia por ser el que presenta una mayor velocidad de absorción de los betabloqueantes ensayados y uno de los más utilizados en la práctica clínica diaria.

De acuerdo con lo expuesto en el capítulo material y métodos, a fin de comprobar la influencia del proceso de congelación/descongelación de la mucosa bucal de cerdo en la permeación de los fármacos, tomando el propranolol como fármaco de referencia, se ha llevado a cabo un estudio comparativo del proceso utilizando mucosa congelada y fresca.

Las cantidades acumuladas (μg) obtenidas en el estudio de permeación intrínseca para el propranolol en solución saturada y replicado en cada tiempo de muestreo para la mucosa bucal fresca y la mucosa bucal congelada, junto con los valores promedios, desviación estándar (DE), coeficientes de variación porcentual (CV%), mediana, valores mínimo y máximo se muestran en las tablas 3-15 - 3-18.

La representación gráfica de las cantidades permeadas acumuladas (μg) de propranolol junto con los valores medios y DE en el transcurso de la experiencia de permeación intrínseca utilizando mucosa fresca y mucosa congelada se muestra en las figuras 3-13 - 3-16. A fin de confirmar la influencia del proceso de congelación de la mucosa de cerdo en el paso del propranolol (betabloqueante de referencia), se lleva a cabo un estudio estadístico de los parámetros de permeación obtenidos utilizando mucosa fresca y congelada. En las tablas 3-31 y 3-32 se muestran los valores individuales, mediana, mínimo y máximo, de los distintos parámetros de permeación: parámetros P_1 y P_2 , coeficiente de permeabilidad (K_p), flujo en estado de equilibrio estacionario (J), período de latencia (T_l) y $TMWL$ obtenidos de acuerdo con un modelo de dosis infinitas para el propranolol a través de mucosa bucal porcina fresca y congelada. A continuación se muestran los resultados del estudio estadístico comparativo de las cantidades permeadas acumuladas y de los parámetros de permeación del propranolol, fármaco de referencia, entre mucosa fresca y congelada, realizados según lo descrito en el apartado 2.3.6 de material y métodos.

En la tabla 3-40, se presenta un cuadro resumen sobre la homogeneidad de variancias y la normalidad obtenidos tras el estudio comparativo de las cantidades permeadas acumuladas de propranolol a través de mucosa fresca y congelada. De acuerdo con estos resultados, los valores de las cantidades permeadas acumuladas de propranolol, no presentan homogeneidad de variancias ni distribución normal. En consecuencia, se lleva a cabo el test de Friedman (test no paramétrico). En la figura 3-29 se representa las cantidades medias acumuladas para el propranolol a través de mucosa fresca y congelada junto con el valor del test de Friedman.

En la figura 3-29, se pone de manifiesto, de acuerdo con el test de Friedman, que no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades permeadas de propranolol a través de mucosa bucal de cerdo fresca y congelada.

En la tabla 3-41 se presenta un cuadro resumen de la homogeneidad de variancias y la normalidad obtenidos tras el estudio comparativo de los parámetros de permeación del propranolol a través de mucosa fresca y congelada. En la tabla 3-42 se presenta el estudio estadístico realizado para poner de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de permeación obtenidos para el propranolol a través de mucosa fresca y congelada.

Para los parámetros representativos del proceso de permeación del propranolol a través de mucosa de cerdo fresca y congelada, no se presentan diferencias estadísticamente significativas excepto para el TMWL. No obstante, cabe concretar que el valor del TMWL, en todos los casos, se encuentra dentro del margen establecido, lo que asegura la integridad de la membrana.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el flujo (J), constante de permeabilidad (k_p), P_1 , P_2 y periodo de latencia (Tl) para el propranolol después de su permeación a través de mucosa fresca y congelada. Estos resultados, respecto a utilizar mucosa fresca o congelada, están de acuerdo con los publicados por Van de Bijl [15].

El estudio de permeación realizado con el propranolol utilizando mucosa de cerdo fresca y congelada, permite obtener unos resultados que proporcionan una nueva visión más operativa para futuros estudios en este campo.

De acuerdo con lo expuesto en esta discusión, puede deducirse, que la vía bucal es una muy buena alternativa a la vía oral en el tratamiento de pacientes susceptibles de ser tratados con betabloqueantes. El diseño de una formulación óptima con estos fármacos aumentaría considerablemente el rendimiento terapéutico de los mismos.

4.1 REFERENCIAS

- 1 Ceschel G. C., Maffei P., Moretti M.D.L., Demantis S., Peana A.T. "In vitro permeation through porcine buccal mucosa of Salvia desoleane Atzei and Pucci essential oil from topical formulations". *International Journal of Pharmaceutics*, 195, 1-2, 171-177 (2000).
- 2 Liu Chen, Xu H.N., Li X.L. "In vitro permeation of tetramethyleporazine across porcine buccal mucosa". *Acta Pharmacol Science*, 23 (9), 792-796 (2002).
- 3 Junginer H.E., Hoohstraate J.A., Coos Verohoef J. "Recent advances in buccal drug delivery and absorption in vitro and in vivo studies". *Journal Controlled Release*, 62, 149-159 (1999).
- 4 Schürman W., Turner P. "A membrane model of de oral mucosa as derived from buccal absorption performance and physicochemical properties of the β -blocking drug atenolol and propranolol". *J. Pharm. Pharmacol.* 30, 137-147 (1978).
- 5 Veullez F., Falson Rieg F., Guy R.H., Deshusses J. and Buri P. "Permeation of a myristoylated dipeptide across the buccal mucosa: topological distribution and evaluation of tissue integrity". *International Journal of Pharmaceutics*, 211, 1, 1-9 (2002).
- 6 Ceschel G.C., Maffei P. Lombardi Borgia S. "Design and evaluation of new mucoadhesive bi-layered containing nimesulide for buccal administration". *S.T.P. Pharma Sciences*, 11, 2, 151-156 (2001).
- 7 Sequier C.A., Senel S., Wertz P.W. "Oral (buccal) mucosa drug delivery promises and possibilities". *S-T-P- Pharma Practiques*, 10, 47-54 (2000).
- 8 Mashru R., Sutariya V., Sakalia M, Sakalia J. "Trans buccal delivery of lamotrigine across porcine buccal mucosa: in vitro determination of routes of buccal transport". *J. Pharmaceut. Sciences*, 8, 54-62, (2005).
- 9 Domenech Berrozpe J., Martinez Lanao J., Pla Delfina J.M. *Biofarmacia y Farmacocinética*. Vol II. Ed. Síntesis, 193-200 (1998).
- 10 Florence A.T., Attwood D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*. Second Edition. Ed. Mac Millan, 240-242 (1991).
- 11 Veber D.F., Johnson S.R., Cheng H.Y. Smith B.R., Ward R.H. Kopple K.D. "Molecular properties that influence the oral Bioavailability of drugs candidates". *J. Med. Chem.* 45, 2615-2623 (2001).
- 12 Ajay A., Walters W.P. Murcko A.M. "Can we learn to distinguish between drug-like and nondrug-like molecules?". *J. Med. Chem.* 41, 3714-3717 (1998). Ajay A., Walters W.P. Murcko A.M. "Can we learn to distinguish between drug-like and nondrug-like molecules?". *J. Med. Chem.* 41, 3714-3717 (1998).
- 13 Magnaro A.M., Wertz P.W. "The effects of permeabilizers on the in vitro permeation of propranolol porcine buccal epithelium" *Military Medicine*, 161, 60-66 (1996).
- 14 Jinson H., Heng P.W. "Buccal Delivery Systems". *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29, 8, 821-832 (2003).
- 15 Van der Bijl P., Van Eyk A.D., and Thomson I.O.C. "Effect of freezing on permeability of human mucosa and vaginal mucosa" *South African Journal of Science*. 94, 499-502 (1998).

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

1. La metodología analítica desarrollada en la presente Memoria, ha resultado ser específica, lineal, exacta y precisa entre las concentraciones de los fármacos ensayados.
2. La difusión de los betabloqueantes a través de la mucosa de cerdo, se lleva a cabo mediante difusión pasiva en el proceso de permeación de estos fármacos.
3. El TMWL (Trans Mucosa Water Loss), ha resultado ser operativo para comprobar la integridad de la mucosa.
4. Se han utilizado células de Franz para los estudios de permeabilidad de los betabloqueantes a través de mucosa de cerdo, poniéndose de manifiesto que es una metodología apropiada para este tipo de experiencias.
5. El estudio estadístico realizado, concreta que se presentan diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros biofarmacéuticos de permeación de los betabloqueantes ensayados.
6. El mayor flujo a través de la mucosa de cerdo fresca corresponde al propranolol ($466.6 \mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$). El coeficiente de difusión del fármaco es preponderante respecto a su coeficiente de reparto entre el disolvente y los lípidos de la membrana en su permeación a través de la mucosa.
7. Los betabloqueantes que presentan un menor flujo a través de la mucosa de cerdo, son el acebutolol ($6.6 \mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$) y el atenolol ($6.6 \mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$). Aunque los valores de flujo son similares, los mecanismos de permeación son distintos, predomina el coeficiente de difusión sobre el de reparto en el caso del atenolol, siendo similar la influencia de estos parámetros en el caso del acebutolol.
8. En la correlación lineal múltiple obtenida, no se incluyen ni descriptores electrónicos ni descriptores orbitales.
9. La capacidad de permeación a través de la mucosa bucal de cerdo de los betabloqueantes ensayados, no depende de la formación de puentes de hidrógeno entre la molécula de fármaco y la mucosa.
10. De acuerdo con la correlación lineal múltiple obtenida, el coeficiente de reparto de los fármacos influye de forma positiva en la permeación a través de la mucosa de los mismos cumpliéndose la teoría pH/reparto.
11. El número de enlaces rotacionales (n_{RotB}) tiene una influencia negativa en la permeación de los betabloqueantes a través de la mucosa de cerdo.
12. La congelación de la mucosa de cerdo, respecto a la fresca, no influye en el valor de los parámetros biofarmacéuticos del propranolol tomado como fármaco de referencia.

13. A partir del cálculo teórico de las concentraciones de fármaco en estado de equilibrio estacionario empleando una formulación que contenga los betabloqueantes estudiados, no se alcanzarían concentraciones plasmáticas terapéuticas. La inclusión en la formulación de sustancias penetrantes, permitiría aumentar el rendimiento terapéutico de estos fármacos.