



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Estudio de la permeación ex vivo e in vivo de antidepresivos tricíclicos en tejido biológico. Estudio de la actividad anestésica y analgésica

Álvaro Gimeno Sandig



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT FARMACIA

DEPARTAMENT

FARMACIA I TECNOLOGIA FARMACÉUTICA

**“ESTUDIO DE LA PERMEACIÓN EX VIVO E IN VIVO DE
ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS EN TEJIDO BIOLÓGICO.
ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANESTÉSICA Y ANALGÉSICA”**

ALVARO GIMENO SANDIG 2015

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

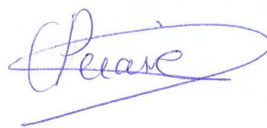
PROGRAMA DE DOCTORAT
RECERCA DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE MEDICAMENTS

**“ESTUDIO DE LA PERMEACIÓN EX VIVO E IN VIVO DE
ANTIDEPRESIVOS TRICÍCLICOS EN TEJIDO BIOLÓGICO.
ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANESTÉSICA Y ANALGÉSICA”**

Memòria presentada por Alvaro Gimeno Sandig para optar al título de doctor por la
Universitat de Barcelona

Directores:

ANA CRISTINA CALPENA CAMPMANY Y CONCEPCIÓN PERAIRE GUITART



Doctorando:

ALVARO GIMENO SANDIG



Tutor:

ANA CRISTINA CALPENA CAMPMANY



ÍNDICE

INDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.0	Abreviaturas.....	1
1.1	Dolor	3
1.2	Dolor Oncológico	9
1.3	Antidepresivos Tricíclicos como analgésicos y anestésicos: Imipramina y Doxepina	11
1.4	Anatomía y Fisiología de la cavidad bucal	17
1.5	Absorción de fármacos a través de mucosa oral	22
1.6	Formas farmacéuticas destinadas a acción tópica	25
1.7	Formas farmacéuticas de absorción sistémica	27
1.8	Administración bucal	28
1.9	Mucositis	30
1.10	La piel	34
1.11	Fisiología de la piel	34
1.12	Sistemas de administración transdérmica	37
1.13	Nanoemulsiones	40
1.14	Penetración transdérmica y transmucosa	49
1.15	Factores que influyen en la absorción percutánea	53

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

2.1	Objetivos del estudio y plan de trabajo	69
-----	---	----

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1	Relación de trabajos científicos publicados	73
3.2	Resumen primer artículo	75
3.3	Primer artículo	77
3.4	Resumen segundo artículo	85
3.5	Segundo artículo	87
3.6	Resumen tercer artículo	93
3.7	Tercer artículo	95

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

4.1	Discusión	103
-----	-----------------	-----

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

5.1	Conclusiones	119
-----	--------------------	-----

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFIA

6.1	Bibliografía	123
-----	--------------------	-----

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.0 - ABREVIATURAS

ADT :	Antidepresivos tricíclicos
AINES:	Antiinflamatorios no esteroideos
DLS:	Dynamic Light Scattering
DMSO:	Dimetil sulfóxido
IASP :	Asociación Mundial para el estudio del Dolor
NCI:	Nacional Cancer Institute
OMS:	Organización Mundial de la Salud
O/W:	Nanoemulsión de fase externa acuosa
PBS:	Phosphate Buffered Saline
SLN:	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
SNC :	Sistema Nervioso Central
SNP:	Sistema Nervioso Periférico
TEM:	Microscopía de Transmisión Electrónica
TEWL	Transmucosal Water Loss
W/O :	Nanoemulsión de fase externa oleosa

1.1 - DOLOR

Es difícil realizar una buena descripción del dolor, pero la más aceptada actualmente es la de la Asociación Mundial para el estudio del Dolor (IASP), que lo define como “una experiencia sensitiva y emocional desagradable, asociada a una lesión tisular real o potencial, o descrita en términos de dicho daño” (F. López Timoneda, 1996) (E. Blanco).

Existen varias clasificaciones de tipos de dolor en función de su duración, patogenia, localización, curso, intensidad, factores pronóstico de control del dolor y según su farmacología.

Una de las clasificaciones más aceptadas (Clifford J. y col. 2004) describen 4 tipos primarios de dolor: Nociceptivo, inflamatorio, neuropático y funcional (Ver fig.1).

- 1) **Dolor nociceptivo**: Dolor transitorio en respuesta a un estímulo nocivo.
- 2) **Dolor inflamatorio**: Dolor espontáneo e hipersensibilidad al dolor en respuesta a daños en los tejidos y a la inflamación.
- 3) **Dolor neuropático**: Dolor espontáneo e hipersensibilidad al dolor en asociación con daño o lesión del sistema nervioso.
- 4) **Dolor funcional**: Hipersensibilidad al dolor como resultado de un procesamiento anormal a nivel central de un estímulo normal.

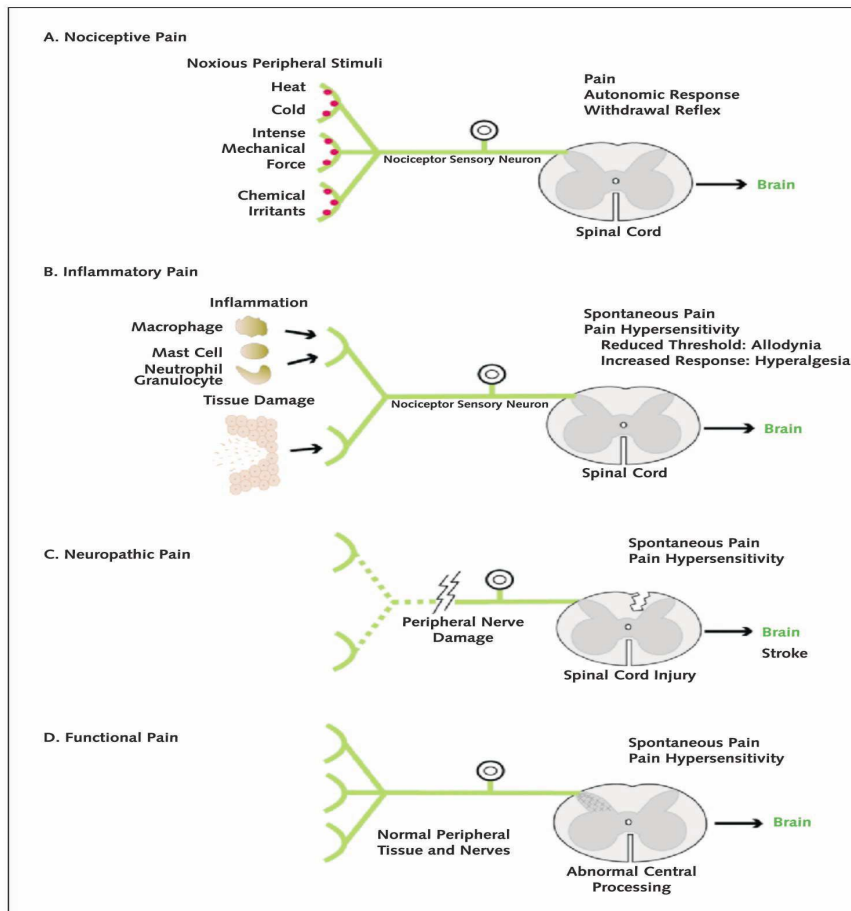


Figura 1- Clasificación de tipos de dolor

La transmisión y percepción del dolor se realiza por un sistema neuronal sensitivo (nociceptores) y unas vías nerviosas aferentes que responden a estímulos nociceptores tisulares (E.Romera y col, 2000).

La transmisión nociceptiva experimenta una compleja modulación desde la génesis del impulso nervioso a nivel periférico hasta su percepción como sensación dolorosa.

Se conocen algunos neurotransmisores implicados en la sensibilización e inhibición de los nociceptores que determinan la aparición clínica del dolor.

Desde un punto de vista neurofisiológico, la percepción del dolor precisa de la participación del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP).

PROCESOS NEUROFISIOLÓGICOS QUE PARTICIPAN EN EL DOLOR

1. Activación y sensibilización de los nociceptores periféricos.
2. Transmisión de los estímulos nociceptivos a través de las aferencias primarias.
3. Modulación e integración de la respuesta nociceptiva a nivel del asta dorsal medular.
4. Transmisión por las vías ascendentes (espino-encefálicas) (Figura 2).
5. Integración de la respuesta en los centros superiores (estructuras encefálicas).
6. Control descendente por las vías encéfalo-espinales.

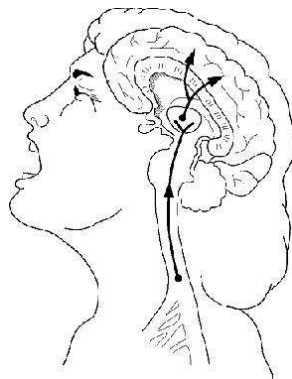


Figura 2- Transmisión neurofisiológica del dolor

Los cambios bioquímicos que tienen lugar en la transmisión y/o modulación del dolor, los podemos agrupar en tres niveles:

1.Periférico: mecanismo por el cual una serie de estímulos son capaces de excitar los receptores periféricos.

2. Medular: mecanismos de transmisión y modulación en el asta posterior.

3. Central : aquellos neurotransmisores y mecanismos implicados en la percepción cerebral y medular del dolor y los mecanismos inhibidores de dicha sensación.

Los nociceptores son los receptores periféricos del dolor que por medio de neurotransmisores envían sus mensajes hacia la vía central.

Los estímulos nociceptivos tienen en común mantener la integridad del cuerpo y desencadenar respuestas (somáticas o vegetativas) asociadas a sensaciones dolorosas.

Su principal función es diferenciar los estímulos inocuos de los lesivos, esta función la realizan ignorando los estímulos de baja intensidad y codificando el estímulo lesivo dentro de un rango de intensidades y transmitiéndolo al SNC.

Tiene tres propiedades básicas: un alto umbral para la estimulación cutánea, una capacidad de codificar la intensidad de los estímulos en el rango lesivo y una falta de actividad espontánea en ausencia de estimulación nociva previa.

Histológicamente son terminaciones periféricas de las neuronas bipolares que tienen su soma en los ganglios raquídeos y cuyo axon centrípeto penetra en el asta dorsal de la médula espinal.

Las fibras nerviosas aferentes nociceptivas son de 3 tipos, fibras A - delta, fibras A-beta y fibras C

Fibras A- delta :

- Fibras mielínicas
- Su diámetro es de 1-5 mm
- La velocidad de conducción rápida, de media entre 4 a 30 m/s
- Conducen señales de dolor de corta latencia que precisan de respuestas rápidas.

Fibras A-beta:

- Son táctiles
- Umbral de estimulación bajo

Fibras C:

- Fibras amielínicas
- Su diámetro es de 0,3 a 1,5 mm
- La velocidad de conducción es lenta, entre 0,4 a 2 m/s
- Es el grupo más numeroso
- Transmiten los estímulos nociceptivos térmicos, mecánicos y químicos
- Informan sobre sensaciones de dolor quemante y de latencia más larga
- Son nociceptores polimodales, es decir, responden a múltiples estímulos (térmico, mecánico y químico)

Se ha descrito la presencia de nociceptores de tipo A-delta y de tipo C en piel, músculos, ligamentos y articulaciones.

A nivel visceral son básicamente terminaciones de fibras C.

En la figura 3 podemos observar los componentes del sistema nervioso relacionados con el dolor (Tendillo y col, 2001).

N. Musculares: Fibras nerv. A que responden también a sust. productoras dolor (K, bradiquinina, serotonina) y fibras C que responden a la presión, calor y a la isquemia muscular.

N. Articulares: Fibras C y responden a sust liberadas en la inflamación

N. Viscerales: Receptores C

Piel: A/C=1/2 , Visceras: A/C=1/8-1/10

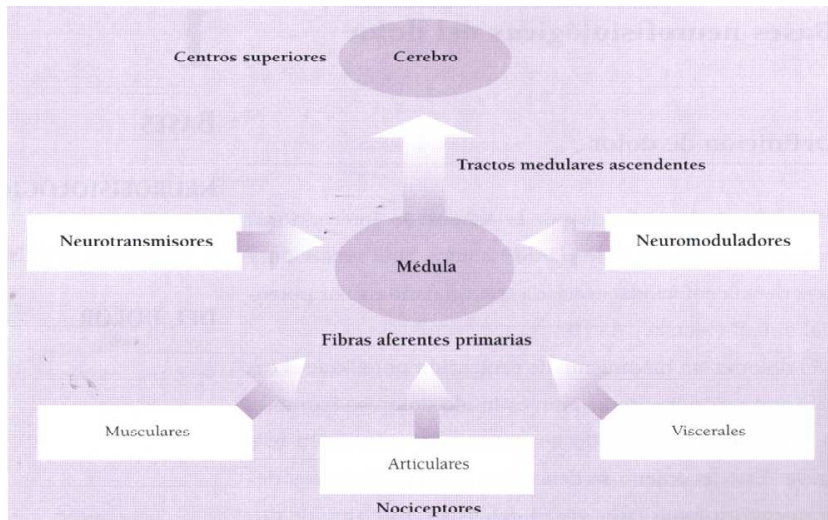


Figura 3- Componentes del sistema nervioso relacionados con el dolor

Las condiciones del nociceptor son especialmente importantes en la génesis del dolor, el cual desencadena dos tipos de respuestas: una fisiológica de activación ante los estímulos y otra de sensibilización que origina la hiperalgesia.

La activación de los nociceptores puede realizarse directamente, pero normalmente se realiza a través de diversos mediadores que ejercen una acción excitatoria o inhibitoria de las terminaciones nerviosas aferentes, actuando sobre receptores específicos o en los canales iónicos de la membrana.

El resultado final es la modificación de la permeabilidad iónica y la génesis de impulsos nerviosos que viajan al SNC.

La mayoría de los nociceptores son quimioceptores: los mediadores químicos son capaces de modificar la actividad de las fibras aferentes.

La sensibilización implica a sustancias como:

Mediadores: Bradiquinina, citocinas, eicosanoides

Neurotransmisores: Serotonina, noradrenalina, los iones potasio (K⁺) e hidrógeno (H⁺), el ácido láctico, la histamina, diversos péptidos (la sustancia P, opioides), y ciertas sustancias como las prostaglandinas y los leucotrienos que disminuyen la activación de los nociceptores.

Un estímulo doloroso es capaz de despolarizar la membrana nerviosa.

A veces después de cesar el estímulo nociceptivo, persisten fenómenos de reducción del umbral del dolor (alodinia), de aumento de la respuesta frente a estímulos nociceptivos (hiperalgesia), de dolor persistente con aumento en la duración de la respuesta a estímulos breves, o de dolor referido y de hiperalgesia secundaria (Costa D, 1993), (Coderre TJ, 1993)

1.2 - DOLOR ONCOLÓGICO

El dolor es un problema muy frecuente en los pacientes con cáncer, con una prevalencia del 90% en los estadios avanzados (P.Khosravi y cols. 2007).

El manejo del dolor oncológico es complejo, y un enfoque multidimensional es preciso para su manejo óptimo.

Los opioides, de los cuales la morfina es el prototipo, son los fármacos más importantes en el tratamiento del dolor oncológico.

Los fármacos coadyuvantes son usados en el tratamiento del dolor oncológico, con el objetivo de potenciar la eficacia de los opioides, y para tratar algunos tipos específicos del dolor.

El dolor oncológico puede ser aliviado aproximadamente en el 90% de los casos mediante el uso correcto, y a menudo combinado de los tratamientos farmacológicos y no farmacológicos. Las causas del dolor oncológico son muy variadas, y habitualmente en el paciente con cáncer hay múltiples causas y localizaciones de dolor.

Las principales causas del dolor oncológico son:

a) La invasión tumoral de estructuras adyacentes (70%):

Como puede ser la invasión de estructuras óseas, invasión de elementos vasculares o nerviosos, obstrucción intestinal o la infiltración de vísceras huecas.

b) Procedimientos diagnósticos y terapéuticos (20%):

Entre los que cabe mencionar las intervenciones quirúrgicas, los efectos secundarios propios de la quimioterapia (mucositis gastrointestinal y bucofaríngea, neurotoxicidad) y/o de la radioterapia (enteritis rádica, cistitis rádica, osteonecrosis rádica).

c) Síndromes inducidos por la neoplasia (<10%):

Como son los síndromes paraneoplásicos.

d) Otras causas extraoncológicas:

como la artrosis, osteoporosis, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio,

Corresponde al médico, muchas veces más preocupado por la enfermedad de base (cáncer) que por el cuadro de dolor asociado que presentan estos pacientes, el disponer de factores de alivio para mitigar el dolor oncológico y minimizar el efecto que produce sobre la actividad diaria, como por ejemplo la dificultad de deglución provocada por la mucositis tras quimio y/o radioterapia.

Muchas veces, estas limitaciones llevan a una mayor depresión del estado de ánimo y ésta a su vez causar un mayor dolor.

En cuanto al tratamiento farmacológico del dolor (F. Puebla Diaz , 2005), podemos basarnos en la escala analgésica de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que establece 3 niveles en función de la percepción subjetiva del dolor por parte del paciente. Con ello podemos ajustar de una forma más exacta el uso de los fármacos analgésicos.

El tratamiento del dolor debe incidir en los distintos aspectos del dolor, incluyendo las posibles causas, factores desencadenantes o de alivio, el tipo de dolor y la intensidad del mismo. La vía de administración recomendada es la oral y en los pacientes con dificultades para la deglución se puede recurrir a las formas transdérmicas o transmucosas.

El primer escalón de la analgesia desarrollada por la OMS (ver figura 4) está formado por el paracetamol, la aspirina y los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y su uso solo está indicado en dolores leves o moderados.

El segundo escalón está formado por los opioides menores, entre los que cabe destacar la codeína, y el tramadol, siendo el tramadol el más utilizado por el poco efecto analgésico de la codeína y el estreñimiento que deriva su uso.

En el tercer escalón tenemos a los opioides mayores (buprenorfina, fentanilo (vías transdérmica o transmucosa), metadona, oxicodona y la morfina que es el de referencia. Los fármacos del tercer escalón no tienen un techo analgésico y la dosis limitante viene condicionada por la aparición de efectos secundarios graves (depresión respiratoria, sedación excesiva, o el síndrome de neurotoxicidad inducida por opioides).

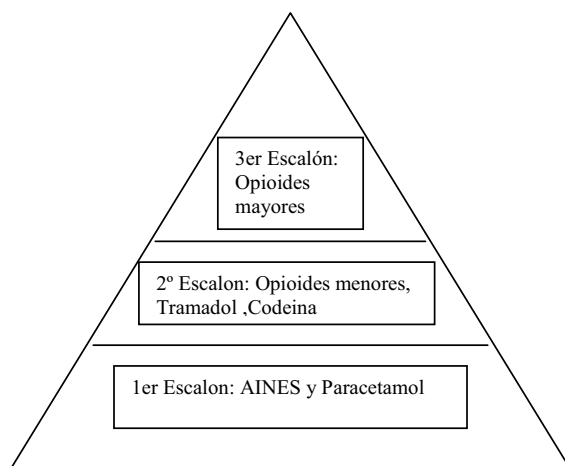


Figura 4 - Escalera Analgésica de la OMS

Independientemente de esta escala de administración de analgésicos por vía oral, podemos recurrir a las formas transdérmicas y transmucosas, como coadyuvantes especialmente en pacientes seniles y con dificultades de deglución.

Los fármacos que podemos considerar coadyuvantes en el dolor son:

Antidepresivos, Anticonvulsivos, Corticoides, Benzodiazepinas, Anestésicos

1.3 - ANTIDEPRESIVOS TRICICLICOS (ADT) COMO ANALGÉSICOS Y ANESTÉSICOS: IMIPRAMINA Y DOXEPINA

El efecto principal de los ADT consiste en bloquear la recaptación de monoaminas (serotonina y noradrenalina) por parte de las terminaciones nerviosas mediante la competición por el lugar de unión de la proteína transportadora (H.P. Rang,2000)

Algunos ADT parecen aumentar indirectamente la liberación del transmisor bloqueando los receptores adrenérgicos α_2 presinápticos. La mayoría de los ADT inhiben la

recaptación mediante sinaptosomas cerebrales de noradrenalina y serotonina en un grado similar, pero tienen un efecto mucho menor sobre la recaptación de dopamina.

Los principales metabolitos de los ADT tienen una actividad farmacológica considerable y en algunos casos mayor que la del fármaco original (Ej. Imipramina => Desmetilimipramina).

Aunque ejercen su efecto antidepresivo por su acción sobre los sistemas neurotransmisores noradrenérgico y serotoninérgico, también actúan sobre los receptores colinérgicos e histaminérgicos, lo que se relaciona con sus efectos indeseables (sedación, sequedad de boca, visión borrosa, estreñimiento, retención urinaria y taquicardia) (Travé Rodríguez y cols. 2002).

Todos los ADT se absorben con rapidez cuando se administran por vía oral y se unen intensamente a la albúmina plasmática, la mayoría con una proporción del 90-95%

Se unen a los tejidos extravasculares, lo cual explica su gran volumen de distribución y su lenta velocidad de eliminación.













Las principales aplicaciones de los ADT son para el tratamiento de patologías tales como la depresión, ansiedad, hiperactividad y dolor.

Dentro de los ADT distinguimos al grupo de las aminas terciarias, que incluyen la imipramina, doxepina, amitriptilina, clomipramina y trimipramina.

El grupo de las aminas secundarias incluye la desipramina, nortriptilina y protriptilina.

A tenor de la estructura química de su anillo tricíclico, los podemos clasificar (Tabla 1):

Tabla1- Estructura de los antidepresivos tricíclicos

Ddos Imino-clibenzo	Ddos Dibenzocicloheptadieno	Ddos Dibenzocicloheptano	Ddos Dibenzobicyclooctadieno	Ddos Triazolopiridina	Ddos Carbazólico	Ddos Piperazinoazepínico	Ddos Dibenzoxepina	Ddos Dibenzazepina	Ddos Triazolona	Ddos Dibenzoxacepina	Novedades
											
Imipramina	Amitriptilina	Amineptina	Maprotilina	Trazodona	Pirlindol	Mirtazapina	Doxepina	Lofepramina	Etoperidona	Amosapina	Duloxetina
Clomipramina	Nortriptilina					Mianserina		Trimipramina			Milnacipran
Trimipramina											
Desipramina (amina 2.ª)											
Lofepramina											

Los antidepresivos tricíclicos presentan una ampliamente conocida y fuerte actividad analgésica y anestésica cuando se administran tópicamente, (James L. y cols 2014) por lo que son indicados en el tratamiento del dolor crónico inducido por el tratamiento oncológico y/o problemas neuropáticos.

Los antidepresivos tricíclicos son potentes inhibidores de los canales de sodio, limitando la conducción de los estímulos nocivos de los nociceptores cutáneos mecanismo de acción de los anestésicos locales.

Los ADT además de su uso por vía oral se han utilizado con éxito en estudios in vivo como anestésicos locales, produciendo en ratas un bloqueo del nervio ciático más duradero que la inyección local de bupivacaina (Yukari Sudoh y cols ,2003).

En concreto los ADT probados fueron amitriptilina, doxepina e imipramina a 5mM.

Se sugirió que la capacidad de los ADT para atravesar las membranas dentro de los nervios periféricos es crucial para manifestar su efecto anestésico local, bloqueando los canales de Na⁺.

La duración del bloqueo de la nocicepción, propiocepción y función motora fue significativamente mayor con la amitriptilina y la doxepina que con la bupivacaina, mientras el efecto de la imipramina fue menor.

Así pues, no todos los ADT pueden ser usados como anestésicos locales de largo efecto. En diferentes estudios (Tura B ,1990), (Peter C,1994), (Korzeniewska-Rybicka I ,1998), (Onghena P, 1998),(Sudoh Y , 2003),(Micó JA , 2006),(McCleane G, 2007) se ha comprobado que algunos antidepresivos tricíclicos pueden tener efecto analgésico gracias a su acción bioquímica molecular ya que son capaces de aumentar la cantidad de noradrenalina y serotonina en el espacio sináptico. En este sentido la administración transbucal de clorhidrato de doxepina podría proveer de una potente actividad analgésica empleando bajas dosis y por tanto evitando los efectos adversos asociados a la administración sistémica de dichas sustancias.

DOXEPINA

Doxepina es un antidepresivo tricíclico derivado de dibenzoxepina. Actúa bloqueando la recaptación de neurotransmisores por la membrana neuronal, potenciando así los efectos de estos últimos. Se utiliza para tratar síndromes depresivos, síndromes de ansiedad, hiperactividad y dolor. Presenta actividad anticolinérgica pudiéndose ser utilizada en el tratamiento de ciertas patologías (eneuresis nocturna, incontinencia

urinaria) y, al mismo tiempo, siendo la causante de gran parte de sus efectos adversos, (sequedad de boca, retención urinaria, estreñimiento y visión borrosa).

La Doxepina, es la que presenta menos efectos anticolinérgicos y produce menos sedación, confusión e hipotensión dentro de los ADT.

El nombre químico de la Doxepina es: 11-(3-Dimethylaminopropylidene)-6,11-dihydrodibenz[b,e]oxepine hydrochloride (C₁₉H₂₁NO) (Ver figura 5).

Peso molecular: 315.84 Daltons

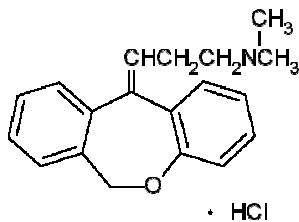


Figura 5 - Estructura desarrollada de la doxepina

IMIPRAMINA

Su mecanismo de acción radica en su capacidad de inhibir la recaptación de noradrenalina y serotonina, aumentando la disponibilidad de estos neurotransmisores en el sistema nervioso central, si bien también tiene numerosos efectos sobre receptores de otros muchos neurotransmisores, lo que explica sus frecuentes efectos adversos.

Al igual que la doxepina, se utiliza para tratar síndromes depresivos, síndromes de ansiedad, hiperactividad y dolor.

Su nombre químico es: 3-(10,11-dihidro-5H-dibenz[b,f]azepin-5-il)-NN-dimetilpropilamina.(Ver figura 6).

Se metaboliza en su primer paso por el hígado a 2-hidroxi-imipramina.

Peso molecular: 280 Daltons

Unión a proteínas: 90%

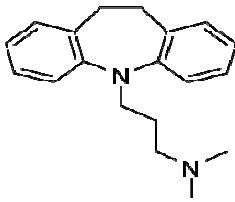


Figura 6- Estructura desarrollada de la imipramina

Aplicaciones de ADT en el tratamiento del dolor

Los fármacos antidepresivos, en conjunto, han probado su eficacia repetidas veces en el tratamiento de distintos cuadros dolorosos entre los que destacan diversos tipos de dolor crónico como el dolor neuropático, el dolor facial, las cefaleas, el dolor de espalda o el dolor oncológico, entre otros (Moreno-Brea, Dubois JJ,2006).

El promedio de pacientes con dolor crónico que mejora con el uso de antidepresivos llega hasta el 74%, así pues podemos afirmar que los antidepresivos pueden ser estimados como coadyuvantes analgésicos de primera línea.

Los antidepresivos tienen un efecto analgésico propio que es independiente del efecto sobre la esfera afectiva. En este efecto analgésico final participan estructuras supraespinales y espinales, siendo indispensable el mantenimiento de la integridad de las vías bulboespinales (E.Romera, 2000).

Los ADT se emplean a dosis menores a las antidepresivas en el tratamiento de los síndromes dolorosos, pues la acción analgésica es independiente.

Sin duda, existe una variabilidad interindividual importante en la dosis analgésica óptima sin que, hasta ahora, pueda atribuirse a causas farmacocinéticas.

La mayoría de los fármacos antidepresivos actúan sobre los sistemas de neurotransmisión noradrenérgico y serotoninérgico: La inhibición de la recaptación de noradrenalina y serotonina son los mecanismos iniciales más frecuentes, pareciendo que ambos son necesarios para que se produzca el efecto antidepresivo.

Estas acciones originan un aumento inicial de la disponibilidad sináptica de ambos neurotransmisores que desencadena una serie de modificaciones tardías sobre receptores y mecanismos intracelulares de transducción que conducen al efecto clínico final.

Los antidepresivos tricíclicos (ADT) se presentan como el tratamiento más efectivo del dolor neuropático, siempre que se empleen a dosis óptimas.

En la neuropatía periférica resultan analgésicos efectivos en aproximadamente la mitad de los pacientes incluidos en los estudios evaluados.

Cabe comentar que los ADT tienen un amplio abanico de efectos secundarios (sedación, confusión, sequedad de boca, retención urinaria, visión borrosa, taquicardias ,arritmias etc).

Así mismo los ADT se han mostrado eficaces en la neuropatía diabética y la neuralgia postherpética.

Todos los ADT poseen, además de su efecto farmacológico mayor como sedantes, presumiblemente por una acción central, efectos sobre los mecanismos neuro-humorales que participan en la micción, y más en concreto los siguientes: se les reconoce un efecto anticolinérgico, tanto central como periférico, al menos sobre algunos órganos; interfieren el sistema activo de transporte localizado en las terminaciones presinápticas neurales, hendidura sináptica bloqueando la recaptación de aminas neurotransmisoras como Serotonina (5-HT) y la Norepinefrina (NE) (Ver Figura 7).

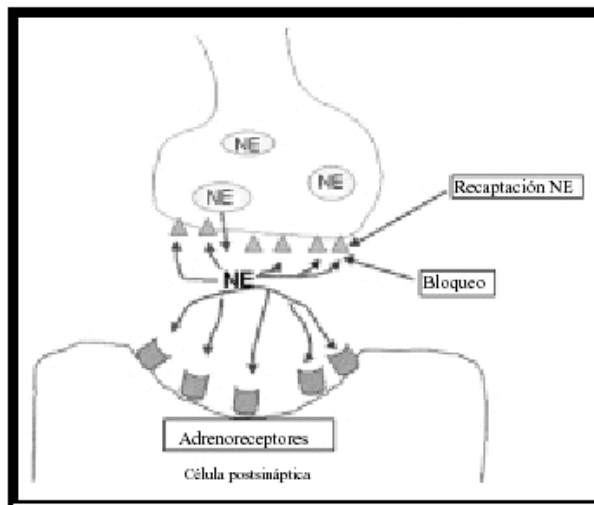


Figura7- Hendidura sináptica y acción de los ADT. Los ADT bloquean la recaptación de la orepinefrina (NE) potenciando su acción sobre los adrenoreceptores postsinápticos.

1.4 - 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 8 se expone la composición de la cavidad bucal.

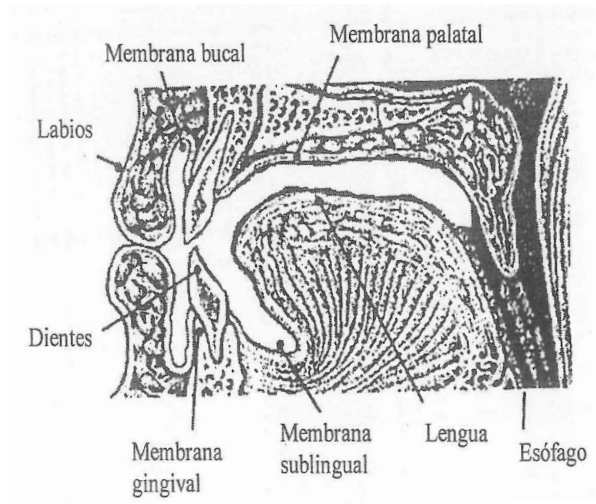


Figura 8 - Composición de la cavidad bucal
(Washintong y col. 2002)

En general, la mucosa bucal consta de:

- a) El epitelio bucal.
- b) La membrana basal, que conecta el epitelio bucal a la Lámina propia.
- c) La Lámina 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 9.



Figura 9 - Disposición de la mucosa bucal

(Washintong y col. 2002)

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 2).

Tabla 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

La mucosa oral recibe un importante flujo sanguíneo a través de la arteria maxilar, (2,4 ml/min./cm²), (Calpena AC, 2011) 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 Lámina 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.

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 al llegar al hígado, tras su absorción a través de la vena porta, 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.

Así mismo, se elude 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.

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 $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, 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.

Está compuesta principalmente por agua, sales minerales y algunas proteínas (amilasa, lisozima, albumina).

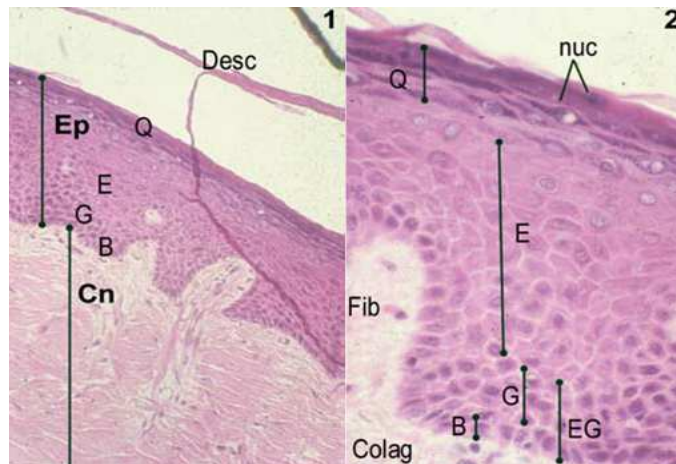


Figura 10- Mucosa bucal constituida por un epitelio (Ep) de recubrimiento y por tejido conectivo (Cn) laxo que lo sostiene y nutre, denominado córium o lámina basal. 2) Muestra desde el interior hacia la superficie de la mucosa, la capa basal (B) de aspecto poliédrico y más oscuro (basófila), que es la zona donde tiene lugar la replicación celular activa. Finalmente se encuentra la capa espinosa (E).

En las capas celulares más superficiales (Ver figura 10) el epitelio se pueden observar gránulos membranosos que parecen fundirse con la membrana de la célula epitelial, expulsando los lípidos que contienen al espacio extracelular. Estos gránulos son esféricos de unos $0.2 \mu\text{m}$ (Sudhakar y cols 2006).

En cuanto al moco, es otro componente que puede afectar a la liberación del fármaco en la mucosa oral. Su espesor varía entre 50 a $400 \mu\text{m}$. Su función es fundamentalmente la lubricación y protección de las células epiteliales de agresiones de tipo mecánico o químico. El mucus está formado por mucinas (glicoproteínas de alto peso molecular ($2-14 \times 10^6$ Da), capaces de formar un gel viscoelástico. El contenido de agua es del 95% aproximadamente. Además el moco es muy rico en ácido siálico y residuos de sulfato, por lo que a pH fisiológico se encuentra cargado negativamente, jugando un papel clave en la mucoadhesión (Rodríguez y cols.2000).

Independientemente del grado de queratinización de la mucosa oral, esta no posee un estrato córneo propiamente dicho por lo que es mucho más permeable que la piel, de 4 a 4000 veces más permeable (Galey y cols. 1976). La barrera de difusión de fármacos en la mucosa oral se debe principalmente al contenido lipídico de las capas superficiales del epitelio. Estos lípidos son secretados al medio intercelular en forma de desmosomas y gránulos membranosos, asegurando así la cohesión del epitelio (Shojaei, 1998). La composición de estos lípidos es aproximadamente 76% de fosfolípidos, 23% de glucoesfingolípidos y un 0.7% de ceramidas (Sudhakar y cols. 2006). Estos lípidos dificultan el paso de fármacos hidrófilos, pero el alto grado de hidratación el tejido conectivo dificulta el paso de fármacos lipófilos. La permeabilidad de la mucosa oral se encuentra todavía más incrementada en la mucosa enferma (liquen plano, ulceraciones u otras) (Sankar y cols. 2011).

1.5 - Absorción de fármacos a través de mucosa oral

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. 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 Lámina 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.

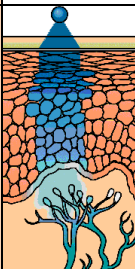
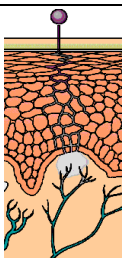
Transporte	Transcelular	Paracelular
Características	- Lipofílico - No ionizado	Hidrofílico Ionizado
Ejemplo	Fentanilo	Morfina
Ilustración		

Figura 11- Difusión transcelular y paracelular (Galan y col 2012)

- Transcelular (intracelular): principalmente utilizada por fármacos liposolubles.
- Paracelular (intercelular): principalmente usada por fármacos hidrófilos.

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.

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.

La cavidad oral presenta una temperatura relativamente uniforme y una superficie extensa. Los fármacos pasan a circulación sistémica de forma rápida y directa, sin sufrir un fenómeno de primer paso hepático. Aumentando así la biodisponibilidad.

Por otra parte, la irrigación sanguínea es muy buena, lo cual conduce a una absorción lucrativa si concurren los factores analizados.

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, 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. De forma parecida se observa en la siguiente figura (12).

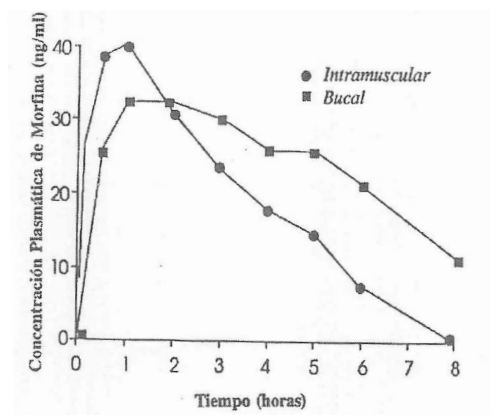


Figura 12 -Concentraciones plasmáticas subsiguientes a la administración bucal e intramuscular de la morfina- Bell M. D. D. et al. Lancet, 1.73 (1985)

1.6 - 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.

Se estima que el tiempo de residencia de un sistema de administración transbucal en la mucosa oral es de aproximadamente 4-6h (Alur y cols 2001).

Los colutorios se han centrado principalmente en el tratamiento con antimicrobianos de acción local. Ejemplos ampliamente conocidos como colutorios a base de clorhexidina, que pueden llegar a tener un efecto antibacteriano de hasta 7 horas tras la administración (Cousido y cols 2010).

El empleo de los geles se restringe principalmente a aquellos que tienen propiedades mucoadhesivas para aumentar el tiempo de residencia en la cavidad bucal, al igual que los comprimidos tienen la desventaja de que el fármaco puede ser deglutido al poseer una zona de difusión en todos los lados de la formulación. En la literatura se puede encontrar numerosas investigaciones de liberación de fármacos desde geles orales como analgésicos (Alsarra y cols 2007), antihipertensivos (Save y cols 1994), protectores de la mucosa (Innocenti y cols 2002), etc.

Existen principalmente tres tipos de parches oro-adhesivos (Madhav y cols. 2009). En primer lugar aquellos que poseen una matriz capaz de disolverse en la cavidad oral, de tal forma que liberan el fármaco totalmente de forma sostenida y por tanto no es necesario retirar ningún resto del dispositivo. Por otro lado, se encuentran parches que no se disuelven. Poseen una única superficie de difusión, gracias a la presencia en su estructura de una película protectora de la saliva. Como inconvenientes habría que destacar una pequeña área de difusión, limitando la dosis a administrar así como los restos del dispositivo que tras el tratamiento deben ser retirados por el paciente. Por último nos encontramos con los parches con una cubierta impermeable, los cuales son capaces de disolverse completamente sin dejar residuos.

Los films son laminas poliméricas capaz de disolverse en la lengua en menos de 30 segundos permitiendo su paso a través de la barrera epidérmica y su rápida llegada a la circulación sistémica. Se han investigado para el tratamiento de patologías como la impotencia, migrañas, mareos, dolor y nauseas (Hearnden y cols 2011).

1.7 - 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.

1.8 - Administración bucal

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 13.

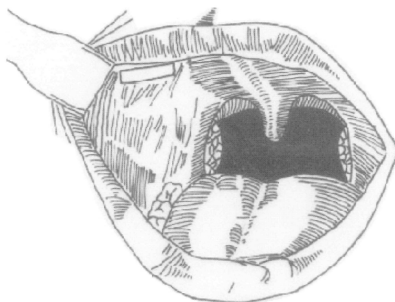


Figura 13- Zona anatómica de la mucosa bucal para la administración de fármacos mediante formas farmacéuticas mucoadhesivas – (Rathbone, M.J y cols 1996)

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

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.

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.).

1.9 - MUCOSITIS

El tratamiento del cáncer se basa en la administración de quimiorradioterapia asociada a cirugía, en función del tipo y estadiaje del tumor.

La mayor parte de fármacos antineoplásicos actúan de manera indiscriminada sobre las células de la capa basal del epitelio, alterando su capacidad de renovación. Esto conlleva la aparición de una serie de efectos secundarios tanto locales como sistémicos entre los que destacarían: la mielosupresión, la mucositis, las náuseas y vómitos y la alopecia (MM Sabater y cols. 2006).

La mucositis es una reacción inflamatoria que afecta a la mucosa de todo el tracto gastrointestinal, aunque suele adquirir un mayor protagonismo en el área orofaríngea. Presenta una prevalencia que oscila entre el 30-85% y es una de las causas más importantes de morbilidad tras la administración de quimiorradioterapia

Su etiopatogenia no está totalmente aclarada, aunque se han descrito una serie de factores de riesgo asociados a su aparición, relacionados principalmente con el tipo de tratamiento oncológico y con factores individuales del paciente.

Comienza habitualmente 3 a 7 días después de iniciada la quimioterapia, o al alcanzar dosis acumuladas de 30G y de radioterapia y dura aprox. 2-3 semanas (G.Ruiz-Esquide,2011).

Pautas de quimioterapia en las que intervengan ciclofosfamida, melfalán, busulfán, 5-fluoracilo o metotrexate se asocian a una mayor incidencia de mucositis (33-100%)

Asimismo, diversos autores relacionan un buen estado bucodental y una buena higiene oral durante el tratamiento oncológico, con una menor incidencia y gravedad de mucositis.

Clínicamente, la mucositis puede presentar diferentes grados de afectación, desde un mínimo eritema, edema o sensación de quemazón hasta grandes y dolorosas úlceras que impiden la alimentación por vía oral del paciente y necesitan de la administración de derivados opiáceos.

Cuando la mucositis es secundaria a quimioterapia, se localiza fundamentalmente en epitelio no queratinizado (paladar blando, mucosa vestibular, cara interna de labios, cara ventral de la lengua y suelo de boca). Si aparece tras la administración de radioterapia, la lesión afectará toda el área de irradiación por lo que no existirían zonas “inmunes” a la mucositis.

En cuanto a la afectación del epitelio de la mucosa bucal, se definen 4 fases en el desarrollo de la mucositis oral (Ver figura 14)

- Fase I: Iniciación
- Fase II: Amplificación de señales
- Fase III : Ulceración
- Fase IV : Cicatrización

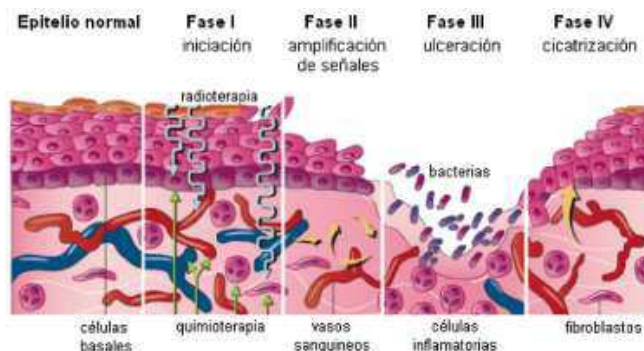


Figura 14- Fases desarrollo mucositis oral. (Elsevier Oncology, Peterson DE,2006)

El dolor que acompaña a la mucositis puede ser tan intenso, que altera la calidad de vida del paciente limitando funciones bucales básicas como hablar, deglutir saliva o alimentarse.

Asimismo, la administración de determinados citostáticos implica una mayor incidencia y gravedad de estas complicaciones.

La afectación de la cavidad bucal en forma de mucositis, es uno de los efectos secundarios más frecuentes del tratamiento oncológico, afectando en ocasiones su calidad de vida y causando un gran disconfort.

La presencia de mucositis puede requerir la parada, o espaciado en el tiempo, del tratamiento con radioterapia/quimioterapia lo que incide en un menor control del tumor y disminución de la eficacia del tratamiento.

Las escalas de severidad de la mucositis oral comunmente utilizadas son la de la OMS (Organización Mundial de la Salud) y la del Nacional Cancer Institute (NCI), ambas escalas definen 5 grados de severidad (Tabla 3).

Tabla 3 - Escalas de severidad de la mucositis oral

OMS		NCI	
0	Sin evidencias subjetivas u objetivas de mucositis	1	Asintomático o síntomas leves. Sin indicación de intervenir
1	Dolor oral con o sin eritema, sin úlceras	2	Dolor moderado, no interfiere con la ingesta oral. Se debe modificar la dieta
2	Eritema y ulceración: puede tragar sólidos	3	Dolor severo, interfiere con la ingesta oral
3	Eritema y ulceración: no puede tragar sólidos	4	Consecuencias potencialmente letales, se requiere intervención urgente
4	Eritema y ulceración: no puede alimentarse	5	Muerte

OMS = Organización Mundial de la Salud⁵. NCI = National Cancer Institute, Common Toxicity Criteria for Adverse Events⁶.

También son comunes la alteración del flujo salival, la sobreinfección de las lesiones orales y la posibilidad de hemorragias gingivales.

La sequedad bucal (Xerostomía) es asimismo un efecto secundario frecuente tras la administración de quimiorradioterapia.

Su aparición agravaría la mucositis convirtiendo a la mucosa oral en más susceptible tanto al factor traumático como a las posibles infecciones.

Epstein y cols. 2003, señalan que más de un 25% de las sepsis en los pacientes oncológicos, podrían tener su origen en la cavidad bucal.

Asimismo refieren que un 70% de los pacientes que reciben un trasplante de médula ósea y con mucositis podrían presentar bacteriemia por *Streptococcus viridans*.

Actualmente no existen protocolos estandarizados para tratar los efectos secundarios bucales de la quimiorradioterapia.

Se alteran funciones fundamentales como la fonación, la alimentación y la deglución acompañándose además de dolor.

A pesar que la literatura científica no recomienda un tratamiento específico para la mucositis, están descritos en la mayoría de hospitales oncológicos multitud de tratamientos, (MM Sabater y cols. 2006), (G.Ruiz-Esquide, 2011) y (Epstein y cols. 2003), con mayor o menor porcentaje de alivio para el enfermo y con resultados contradictorios.

No existe actualmente ningún protocolo preventivo o terapéutico que sea totalmente eficaz en el manejo de la mucositis.

Existen diferentes tratamientos descritos en la bibliografía: (MM Sabater y cols. 2006), (G.Ruiz-Esquide,2011), (Peterson DE, 2006), (James L. y cols 2014), (M.Puyal, 2003)

- Colutorio de clorhexidina al 0,12% cada 6-8 h
- Colutorio de bencidamina al 0,15% cada 2-3 h
- Colutorios de agua bicarbonatada y nistatina en solución cada 6h
- Colutorios de alopurinol (300 mg disueltos en agua o suero)
- Colutorios de doxepina al 0,5% y 1%
- Colutorios de morfina (30mg en 15cc agua cada 4h)
- Uso de glutamina en colutorio, vía oral y parenteral
- Crioterapia con hielo local (20-30 min) a modo preventivo antes tratamientos
- Fototerapia con laser de baja energia
- Combinaciones de hierbas tradicionales chinas

- Inyecciones subcutáneas de factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
- Inyecciones intramusculares de extractos de placenta humana
- Inyecciones intravenosas de factor de crecimiento de queratinocitos humano recombinante
- Fórmulas magistrales con antiinflamatorios (0,1% - 1%)
- Solución viscosa de lidocaina al 2%
- Geles a base de polivinilpirrolidona y ácido hialurónico (3 veces / día antes comidas)
- Aplicación de parches de fentanilo transmucosa (liberación rápida)

1.10 - LA PIEL

1.11 - Fisiología de la piel

La piel constituye el órgano corporal más extenso que separa al organismo del medio externo. En términos generales la piel realiza funciones de protección mecánica, regulación térmica, equilibrio hídrico, excretora, sensorial, inmunitaria.

Esta formada por tres capas (Figura 15) que desde el exterior al interior son la epidermis, dermis y tejido subcutáneo. Contiene además glándulas sebáceas, sudoríparas y folículos pilosos. La superficie de la piel está normalmente cubierta por una emulsión epicutánea o manto hidrolipídico que se forma a partir de los ácidos grasos de las secreciones sebáceas de los queratinocitos y el agua que proviene de las glándulas sudoríparas. Este coadyuva al mantenimiento de su función protectora y flora cutánea (Montagna, 1961).

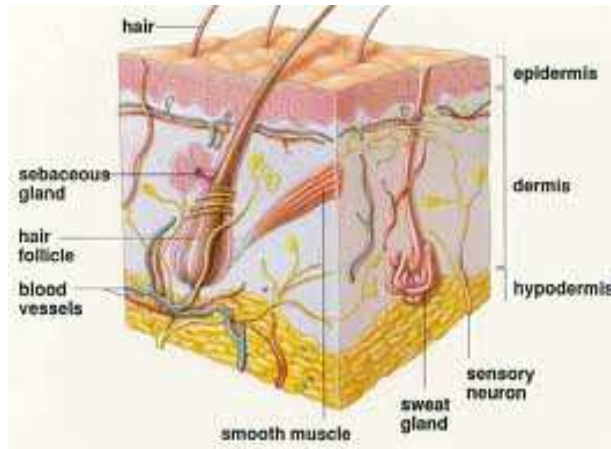


Figura 15- Estructura de la piel humana

La epidermis

Es un epitelio plano estratificado, queratinizado y no vascularizado de un espesor que varía entre 0.02 y 0.2 mm según la zona anatómica. Posee un alto contenido lipídico (colesterol, ceramidas y ácidos grasos) y muy bajo contenido en agua (20-30%). Los queratinocitos al ascender hacia la superficie se vuelven más anchas y aplanadas, perdiendo gradualmente el núcleo y orgánulos y se van enriqueciendo en queratina (Wertz, 1996).

En la epidermis puede diferenciarse cinco estratos:

- Estrato basal o germinativo: es una única capa de células casi cúbicas enlazadas entre sí por desmosomas y a la lámina basal sobre la que se apoya por hemidesmosomas. Este estrato es el encargado de la regeneración constante del resto de capas celulares epidérmicas por su continua replicación celular. Además de los queratinocitos también se encuentra melanocitos, células de Langerhans (relacionados con el sistema inmune) y células de Merkel (del sistema neuroendocrino).
- Estrato espinoso lo forman células que están unidas por puentes intercelulares a modo de espinas con continuidad citoplasmática.

- Estrato granuloso está compuesto por células que contienen gránulos de queratohialina (cuya degradación final produce sustancias higroscópicas responsables de la hidratación natural de la piel. Los gránulos también contienen glicolípidos y esteroides. Estos son excretados a medio extracelular, siendo uno de los responsables de la impermeabilidad de la epidermis.

- El estrato lúcido está ubicado entre la capa granulosa y el estrato corneo. En esta capa las células empiezan a perder los orgánulos celulares por la acción de proteasas y nucleasas.

- El estrato córneo es la parte más externa de la epidermis y la principal barrera del medio externa, siendo el principal responsable de la impermeabilidad de la piel y la resistencia a la difusión de fármacos o cualquier otra sustancia. Está formado por células aplanadas altamente queratinizadas, llamada corneocitos, unidos entre sí por una sustancia cementante de naturaleza lipídica y estratificada en múltiples capas (Elias, 1983). Estos lípidos intercelulares están compuestos por aproximadamente un 70% de lípidos neutros (esteroides libres, 14%; ácidos grasos libres, 19.3%; triglicéridos, 25.2%; ésteres de colesterol y esteroides grasos, 5.4%; escualeno, 4.8%; alcanos, 6.1%), en un 18% por esfingolípidos (ceramidas y glucosilceramidas), un 5% de lípidos polares (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, esfingomiélin y lisolecitina) (Lampe y cols. 1983). Esta composición lipídica junto con la constante descamación y renovación el estrato córneo (Tanner T, Marks, 2008) son los principales responsables de la función barrera del estrato córneo.

La dermis

Tiene un espesor mayor que la epidermis (1-3 mm de grosor). Ésta contiene colágeno, elastina, células inmunitarias, fibroblastos, vasos sanguíneos y linfáticos y nervios entre otros muchos componentes, lo que la hace un tejido altamente irrigado y la vía de entrada de fármacos a la circulación sistémica tras haber atravesado el estrato córneo. Posee una matriz amorfa rica en glucosaminoglucanos de alto poder humectante que

nutre e hidrata la epidermis. También tienen corpúsculos sensoriales del tacto, dolor y temperatura (Wilkes y cols.1973).

La hipodermis

El tejido subcutáneo o hipodermis está compuesto por tejido graso y fibras elásticas. Se encuentra altamente irrigado y vascularizado. Es el origen de las glándulas sebáceas y de los folículos pilosos. Estos apéndices cutáneos pueden ser importante en el paso de fármacos a circulación sistémica, ya que en estas zonas el grosor del estrato córneo disminuye, pudiendo llegar a desaparecer (Wilkes y cols.1973).

1.12 - Sistemas de administración transdérmica

Existe un gran número de formulaciones que clásicamente han sido utilizadas para la aplicación tópica (soluciones, emulsiones, ungüentos, lociones, pastas, polvos, etc.). En un primer momento se utilizó para obtener un efecto local en un área específica de la piel, pero en la actualidad la administración de estas formulaciones también persigue obtener un efecto sistémico.

Encontramos numerosos productos en el mercado con esta finalidad, parches para el tratamiento sustitutivo de la nicotina (Gore AV, Chien YW. 1998), anticonceptivos hormonales (Burkman, 2002), analgésicos opioide (Park y cols. 2008), psicoestimulantes como el metilfenidato para el tratamiento del síndrome de déficit de atención (Elia y cols. 2011), lidocaína (Galer y cols. 2004) y antieméticos (Nachum y cols. 2006), entre otros.

De forma general se acepta que la elevada organización cristalina de las lamelas lipídicas desempeña un papel esencial en las propiedades de barrera del estrato córneo. Como se mencionará más adelante, diversas técnicas se han dirigido a perturbar y debilitar la gran organización de los lípidos intercelulares en un intento por mejorar el transporte del fármaco a través de la piel intacta o bien para aumentar la fuerza impulsora para la penetración de fármacos. En este sentido uno de las estrategias más estudiadas en la actualidad es el uso de formulaciones nanovesiculares y/o nanoparticulares como sistemas de administración cutáneos.

La justificación del uso de estos sistemas en la administración dérmica y transdérmica de fármacos es múltiple. Por un lado tienen la ventaja de proteger a la sustancia que contienen, aumentando la vida útil del fármaco. Por otro, estos podrían ser potenciadores de la penetración así como depósitos para la liberación sostenida del activo constituyendo una limitación de la absorción sistémica de los fármacos.

Entre los más conocidos, se encuentran, los liposomas. Estos se definen como vesículas microscópicas constituidas por una o varias bicapas fosfolipídicas concéntricas alternando con compartimentos acuosos. Poseen una forma, estructura y tamaño diversos, aunque sus dimensiones suelen oscilar entre 10 nm y varias micras. Dada su constitución, tienen la capacidad de captar una gran variedad de sustancias activas hidrosolubles, liposolubles o anfifílicas. La versatilidad de los liposomas se refleja tanto en su arquitectura como en sus propiedades físicas como la carga superficial, el tamaño, la permeabilidad/rigidez de la pared o su capacidad de carga.

En los últimos años muchas investigaciones ha sido llevadas a cabo para la administración transdérmicas de antibióticos (Manosroi y cols. 2004), antivirales (Dubey y cols. 2010), anestésicos (Shim y cols. 2010) y antiinflamatorios (Clares y cols. 2009) en liposomas.

En un intento por mejorar las propiedades de los liposomas surgen niosomas, etosomas y transfersomas.

Los niosomas son vesículas compuestas de tensioactivos no iónicos. Si se comparan con liposomas convencionales ofertan una mayor estabilidad química y menores costos, Los niosomas de aplicación tópica pueden aumentar el tiempo de residencia de los fármacos en el estrato córneo y la epidermis, así como reducir la absorción sistémica del fármaco. Se cree que mejoran las propiedades de la capa córnea, tanto por la reducción de la pérdida de agua transepidérmica como por la reposición de lípidos perdidos de la piel. En los últimos años, la atención se ha centrado en el uso de

tensioactivos a base de azúcar por ser menos tóxicos y altamente biodegradable (Choi y Maibach, 2005).

En cuanto a los etosomas, son liposomas con un alto contenido en alcohol (hasta 45%), capaces de mejorar la penetración de activos en los tejidos profundos y circulación sistémica. Precisamente es el alcohol quien fluidifica los lípidos etosomales y lípidos del estrato córneo permitiendo así su penetración (Dubey y col 2010).

Mientras que los liposomas son incapaces de atravesar poros menores de 50 nm, transfersomas de hasta 500nm son capaces de penetrar la barrera del estrato córneo espontáneamente. En este caso se habla de vesículas lipídicas ultradeformables, compuestas de fosfolípidos como su principal ingrediente, 10-25% de tensioactivo y 3-10% de etanol (Dubey y col 2006).

Como alternativa a otros sistemas como las emulsiones, liposomas o nanopartículas poliméricas en 1990 se desarrollan las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN). Son dispersiones acuosas de matrices lipídicas sólidas estabilizadas por tensioactivos. (Müller y col 2007). Protegen las moléculas de fármacos susceptibles de degradarse bajo la influencia de agentes externos como la luz y el agua, presentan una mejor biodisponibilidad y podrían ser diseñadas para dar perfiles de liberación prolongada de sustancias activas poco solubles en agua, al incorporarlas en la matriz lipídica sólida. Entre sus desventajas estarían el posible crecimiento de las partículas durante su almacenamiento, la tendencia hacia una gelificación impredecible, la existencia de cambios inesperados en sus transiciones polimórficas y su inherente baja capacidad de incorporación de fármacos limitada por la estructura cristalina del lípido sólido.

Una nueva generación de nanopartículas lipídicas son los Transportadores Lipídicos Nanoestructurados (NLC). Estos sistemas tendrían las mismas ventajas que las SLN sin embargo minimizan o evitan algunos de los inconvenientes anteriormente mencionados, como la capacidad de carga, segregación durante el almacenamiento y alto contenido en agua de las dispersiones de SLN.

A pesar de las ventajas del uso de liposomas y nanopartículas lipídicas existen inconvenientes respecto a su puesta a punto y estabilidad, lo que obviamente dificulta la preparación y mantenimiento de estos vectores.

Frente a todos ellos, las nanoemulsiones empleadas para la vehiculización tópica o transdérmica de fármacos tienen excelentes características como, diámetro de gota pequeño y distribución homogénea, estructura estable.

1.13 - Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones han resultado ayudas farmacéuticas como vehículos de administración dérmica y transdérmica (Baboota S y col, 2007), (Araujo FA y cols, 2011). Así mismo, las nanoemulsiones proporcionan un efecto de depósito, poder humectante y excelente superficie de contacto entre el tejido biológico y el vehículo.

La nanoemulsiones son dispersiones coloidales translucidas de dos líquidos inmiscibles estabilizadas por un tensioactivo, con un tamaño de gota comprendido entre los 20 y los 200 nm (Figura 16).

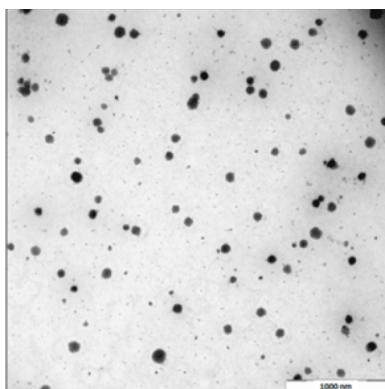


Figura 16-Nanoemulsión.
Microscopía de Transmisión
Electrónica (TEM)

Este pequeño tamaño de gota hace que la nanoemulsión posea una elevada estabilidad cinética, frente al cremado, sedimentación, floculación y coalescencia (Guglielmini, 2008). A pesar de su elevada estabilidad cinética, son termodinámicamente inestables, siendo necesaria la aportación de energía para su formación (Solans y cols.2005). En

función de la fuente utilizada para suministrar esta energía podemos distinguir dos métodos de preparación:

- Métodos de alta energía: utiliza homogenización de alta presión, ultrasonidos entre otros, que rompen las gotas de la emulsión. La adición de tensioactivo permite disminuir la energía necesaria para la formación de la nanoemulsión. No obstante, el tensioactivo también puede producir coalescencia de las gotas recién formadas debido a la colisión entre ellas (Guglielmini, 2008). El tamaño de partícula obtenido dependerá del instrumento empleado, así como del tiempo y temperatura utilizado durante la preparación y de los propios componentes de la fórmula (Rao y McClements, 2011). Este método de preparación permite tener un mayor control sobre el tamaño de gota y una mayor variedad de ingredientes disponibles (Ravi y Padma, 2011).
- Métodos de baja energía: también llamados métodos de condensación. Estos aprovechan la energía contenida en el sistema para formar gotas de pequeño tamaño (Solè y cols 2010). La emulsificación se lleva a cabo cambiando los parámetros que afectan al balance hidro-lipófilico del sistema, como la temperatura y composición, por este motivo la selección de los excipientes a utilizar es un paso crítico (Izquierdo y cols 2005). Así se pueden distinguir dos procedimientos: a temperatura constante (variando la composición) o bien a composición constante (variando la temperatura). Este último método también es conocido como método de la temperatura de inversión de fases, siendo el método de baja energía más utilizado (Solans y cols 2005).

Las nanoemulsión pueden clasificarse como de fase externa acuosa (O/W) o de fase externa oleosa (W/O), en función de cuál sea el componente mayoritario de la fase continua en la formulación, agua o aceite, respectivamente (Ravi y Padma, 2011).

Ventajas de las nanoemulsiones sobre otras formas de dosificación (Devarajan y Ravichandran, 2011):

- Aumento de la absorción y disminución de la variabilidad en el tracto gastrointestinal
- Solubilización fármacos tanto lipófilos e hidrófilos
- Aumento de la biodisponibilidad y mejora del perfil fármaco cinético
- Utilización en diversas rutas de administración
- Rápida y eficiente penetración del fármaco
- Enmascaramiento de sabores desagradables
- Protección frente hidrólisis y oxidación del fármaco
- Buena aceptación por parte del paciente
- Requieren comparativamente menos energía para su formación
- Elevada estabilidad cinética
- Se pueden esterilizar mediante filtración

Las nanoemulsiones han sido ampliamente utilizadas en el sector tecnológico, por ejemplo como punto de partida para la realización de nanopartículas, tanto poliméricas (Solans y cols. 2005), como lipídicas (González-Mira y cols 2011). También se han utilizado ampliamente en el sector cosmético (Guglielmini, 2008), tecnología de los alimentos (Acosta, 2009) y por supuesto como sistemas de liberación de fármacos, permitiendo vehiculizar fármacos hidrófilos y lipófilos (Zhou y cols 2009).

La mayor parte de las nanoemulsión han sido utilizadas para su aplicación tópica, ya sea con una finalidad local o sistémica, aunque también se han empleado para su administración intravenosa (Santos-Magalhães, y cols.2000), oral (Nícolaos y cols.2003), ocular (Tamilvanan y Benita, 2004), intranasal (Kumar y cols 2009), pulmonar (Bivas-Benita y cols 2004).

La vía oral sigue siendo la principal ruta de administración de los fármacos en el mercado. Sin embargo presenta importantes limitaciones tales como, el efecto de primer paso hepático o la degradación por las secreciones gastrointestinales, así como la incapacidad para deglutir que presentan la población pediátrica, geriátrica y pacientes no “cooperantes” (Pinto, 2010). La vía oral ha sido ampliamente utilizada para la

administración de nanoemulsiones, especialmente en fármacos con una baja solubilidad acuosa como por ejemplo el saquinavir (Vyas y cols.2008). La incorporación de este fármaco en una nanoemulsion consiguió aumentar la biodisponibilidad oral y su distribución hacia el cerebro. La incorporación de paclitaxel en una nanoemulsion O/W también consigue aumentar su biodisponibilidad comparada con la administración oral en solución (Tiwari y Amiji, 2006). Recientemente se ha desarrollado una modificación de nanoemulsiones denominado sistema de liberación de fármacos auto-nano-emulsionante (SNEDDS, Self Nano emulsifying Drug Delivery System), siendo estas, unas bases autoemulgentes, que en contacto con el agua del tracto gastrointestinal forma la nanoemulsión espontáneamente (Rao y cols. 2008). En este tipo de formulaciones han sido exitosamente vehiculizados el ramiprilo (Shafiq y cols. 2007), permitiendo aumentar su absorción y la ciclosporina (Neoral®) (Devarajan y Ravichandran, 2011) disminuyendo la gran variabilidad intra e inter-individual en la absorción que se observaba en Sandimmune®.

La vía parenteral es una ruta de administración común cuando se requiere un rápido inicio de la acción, cuando los fármacos presentan una muy baja biodisponibilidad (como las proteínas) o un margen terapéutico estrecho. La administración de nanoemulsiones por esta vía también ha supuesto una ventaja, debido también a que son capaces de solubilizar compuestos hidrófobos, debido a su pequeño tamaño, a su capacidad de protección del principio activo del medio y capacidad para el control de la liberación del principio activo (Ravi y Padma, 2011). Se ha administrado por vía parenteral nanoemulsión que contenían talidomida (Araujo y cols. 2011), diversos antitumorales (Ganta y cols. 2010), carbamazepina (Kelmann y cols. 2007), entre otros fármacos.

La administración en la mucosa intranasal, se ha realizado en numerosas ocasiones con el fin de liberar el fármaco directamente en el cerebro. Varios autores han realizado aproximaciones en este sentido con el fin de tratar el Alzheimer, migrañas, depresión, esquizofrenia, Parkinson y meningitis entre otras (Kumar y cols. 2008; Mistry y cols.2009). Otros autores en cambio han administrado antígenos en nanoemulsion a través de la mucosa nasal con el fin de vacunar frente a diversas enfermedades (Challacombe y cols.1997).

Por otro lado se ha visto que las nanoemulsiones también pueden presentar propiedades biocidas frente a bacterias, hongos y virus debido a su estructura (Ramalingam y cols. 2012; Myc y cols. 2002).

Selección de los componentes de la nanoemulsión

Los ingredientes utilizados para la preparación de las nanoemulsiones deben ser seguros, no tóxicos y no irritantes, según los que aparecen en la lista de componentes generalmente reconocidos como seguros (Generally Regarded As Safe, GRAS) (Wu y cols. 2001). En este sentido es de especial interés la elección del surfactante, ya que suelen ser los compuestos más irritantes, y se encuentran en una relativamente elevada concentración, necesaria para la estabilización del sistema coloidal.

Fase oleosa: En primer lugar se selecciona la fase oleosa. La fase oleosa es la responsable de la solubilización de fármacos hidrófobos. En este caso es conveniente seleccionar el aceite en el cual el fármaco presente una mayor solubilidad. Así pues para la selección de esta fase, se realiza un screening de aceites. Para evaluar la solubilidad en estos, se disuelve un exceso de fármaco en un volumen determinado, se agita o sonica y se deja en un agitador rotatorio durante 48-72 horas hasta alcanzar el equilibrio. Una vez transcurrido este tiempo las muestras se centrifugan y el sobrenadante es filtrado. Finalmente la concentración de fármaco solubilizado por el aceite es analizado mediante una técnica analítica apropiada (Shakeel y Ramadan 2010).

Tensioactivo: Tras la selección de la fase oleosa se ha de seleccionar el tensioactivo apropiado. Con el fin de racionalizar el comportamiento de los tensioactivos se determinó su balance hidro-lipofílico (HLB). Este tiene en cuenta la contribución relativa del fragmento hidrófilo e hidrófobo en la molécula del tensioactivo. Los tensioactivos con HLB altos (8-18) se consideran solubles en agua, y favorecen la formación de emulsión de fase externa acuosa. Los tensioactivos de bajo HLB (3-6) se consideran lipófilos y favorecen la formación de emulsiones de fase externa oleosa. Los co-tensioactivos, son tensioactivos generalmente alcoholes o ésteres alcohólico de cadena corta, que se añaden con el fin de reducir aún más la tensión interfacial, facilitando la emulsificación del sistema (Devarajan y Ravichandran, 2011). La adición de un co-

tensioactivo, generalmente aumenta la estabilidad del sistema y la solubilidad del compuesto en el mismo (Lu y Gao, 2010).

En general, se eligen tensioactivos no iónicos (ésteres de glicerol, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos), por su buena tolerabilidad biológica así como por su habilidad para formas nanoemulsiones independientemente del pH y a la concentración de electrolitos en la formula (Djordjevic y cols.2004). También se pueden encontrar tensioactivos aniónicos (ácidos carboxílicos, sulfonatos, etc.) y catiónicos (animas y sales de amonio cuaternario, etc.) (Devarajan y Ravichandran, 2011).

Normalmente las nanoemulsiones contienen grandes cantidades de tensioactivos. Esto hace que posean una muy baja tensión interfacial, facilitando la obtención de tamaños de gota nanométricos que asegura una excelente superficie de contacto entre la piel y el vehiculo (Kreilgaard, 2002).

Para seleccionar el tensioactivo específico se pueden seguir dos procedimientos:

- a. Se seleccionan los tensioactivos y co-tensioactivos en los cuales el fármaco sea más soluble (Zhu y cols.2008). Por tanto se procede de la misma forma que lo indicado en el apartado anterior.
- b. Selección del tensioactivo que mayor solubilidad tenga en la fase oleosa. La separación de fases es la forma más común de desestabilización de la emulsiones. Ya que son sistemas termodinámicamente inestables, la emulsión tiene a la separación de fases que es la forma menos energética. Los tensioactivos se utilizan con el fin de estabilizar el sistema. En este sentido el tensioactivo seleccionado tendrá una relación directa con la estabilidad del sistema. Para la selección de un tensioactivo específico se puede proceder de la siguiente forma. Se realiza una solución de varios tensioactivo al 15% en agua. Se va añadiendo la fase oleosa seleccionada poco a poco con el fin de poder titularla. Se agita con vortex. Se sigue añadiendo aceite hasta que la solución se vuelve turbia. Se selecciona el tensioactivo con mayor capacidad de solubilización de la fase oleosa (Shakeel y Ramadan, 2010). Otros autores realizan la selección utilizando métodos turbimétricos (Date y Nagarsenker,

2007). En este caso se realiza una mezcla 1:1 en peso del tensioactivo y el aceite previamente seleccionado. De esta mezcla se toma una parte en peso y se le adiciona la misma cantidad de agua. Las emulsiones se dejan reposar 2 horas y se determina la transmitancia (usando agua como blanco). Se selecciona el tensioactivo que mayor transmitancia posea, reflejando la capacidad emulsificante del tensioactivo. Este método también puede utilizarse para la selección del co-tensioactivo. En este caso se realiza una mezcla tensioactivo:co-tensioactivo:aceite (2:1:3). Una parte en peso de esta mezcla se diluye con la misma cantidad de agua. La emulsión se deja en reposo dos horas y se evalúa la transmitancia. Se selecciona el co-tensioactivo que mayor valor tenga, reflejando la mayor capacidad emulsificante del co-tensioactivo.

Diagramas de fases: Para determinar con exactitud la composición de la nanoemulsión se realizan diagramas de fases. Los diagramas pseudo-ternarios son mezclas de fase hidrófila, oleosa y mezcla de tensioactivo/co-tensioactivo a un ratio fijo y a una temperatura y presión atmosférica determinada. El ratio (Km) tensioactivo: co-tensioactivo puede ser muy variado. Hay autores que prueban Km desde 1:9 a 9:1, en cambio otros de manera práctica prueban tres, uno con una alta cantidad de tensioactivo (6:1, por ejemplo), otro con una alta carga de co-tensioactivo (1:6, por ejemplo) y uno de proporciones iguales (1:1).

Cada vértice del triángulo representa el 100% de uno de los compuestos, mientras que la arista opuesta representa el 0% del mismo (Figura 17).

Para determinar la región de formación de nanoemulsión en primer lugar se seleccionan las mezclas que hayan resultado ser monofásicas y transparentes. A estas se les determina el tamaño de gota y la polidispersión, se dibujan entonces en el triángulo aquella que hayan tenido un tamaño y polidispersión adecuada, generalmente ente 20 y 200 nm y menor a 0.2, respectivamente. Estos puntos se unen y esa área comprende la composición que delimita la región de formación de nanoemulsión. De todos los triángulos probados, se suele seleccionar aquel que tenga un área de nanoemulsión mayor.

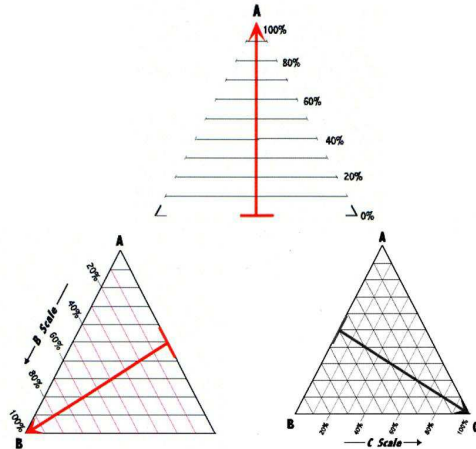


Figura 17- Lectura de un diagrama pseudo-ternario

Caracterización de la nanoemulsiones

Ya que el tamaño de gota de las nanoemulsiones está por debajo o muy cerca de la longitud de onda de la luz visible (150nm), la exanimación directa de la nanoemulsión no es posible. Por eso se han de emplear medida indirectas para la evaluación de la estructura de la nanoemulsión Las gotas de fase interna se mueven de forma aleatoria dentro de la fase externa según la ecuación 1 de Stoke-Einstein (Kreilgaard, 2002).

$$D = \frac{K \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad \text{Ecuación 1}$$

Siendo D , el coeficiente de difusión; K , la constante de Boltzman; T , la temperatura termodinámica; η , la viscosidad del medio y r , el radio molecular

Conductancia

La nanoemulsiones de fase externa acuosa (o/w) poseen altos valores de conductancia, en contraste con las nanoemulsiones de fase externa oleosa (w/o). Por lo tanto esta técnica es útil para la determinación del tipo de emulsión obtenido. La adición de un colorante a la nanoemulsión también es útil para determinar cuál es la fase externa de la misma. Los colorantes hidrófilos se solubilizaran en el agua de la fase externa acuosa pero no se observara en las gotas de la fase interna oleosa y viceversa (Devarajan V, Ravichandran, 2011).

Dynamic Light-scattering (DLS) o Espectroscopía de Correlación Fotónica (PCS)

Es la técnica más utilizada para medir el tamaño de gota de la nanoemulsión. DLS mide las fluctuaciones de la dispersión dinámica de la luz láser a un ángulo constante en función del tiempo. La intensidad de la luz dispersada depende del tamaño de la partícula, el ángulo de dispersión, el índice de refracción y el medio continuo (Haskell y cols.1998). Como resultado se obtiene el diámetro medio de gota (*Z-average*) y el índice de polidispersión. Un índice de polidispersión inferior a 0.2 indica que las gotas o partículas son monodispersas.

Microscopía de Transmisión Electrónica, Transmission electron Microscopy (TEM)

Esta técnica permite determinar el tamaño de las gotas de la nanoemulsión, así como su morfología. Para poder observar la muestra se ha de realizar un pretratamiento de la misma en función de la técnica específica a utilizar. Al utilizar TEM lo que se hace es una tinción negativa con un metal pesado como el acetato de uranilo. Las zonas donde este se deposita son opacas al haz de electrones por lo que se ven teñidas de oscuro en las imágenes de TEM. El crio-TEM con fractura por otro lado permite la observación directa del sistema. En este caso la muestra se congela rápidamente y se fractura. La superficie de interés se cubre con platino-carbono. La muestra original se elimina por inversión en agua y la réplica de metal se observa en el microscopio. A pesar de que el crio-TEM es una buena técnica para la observación de las nanoemulsión, el TEM con tinción negativa representa una buena alternativa a este ya que la morfología de la muestra está relativamente bien preservada, a pesar de que se puedan observar artefactos (Klang y cols. 2012).

1.14 - PENETRACION TRANSDERMICA Y TRANSMUCOSA

El efecto de los medicamentos aplicados tópicamente puede ser de dos tipos: *Tópico y/o Sistémico*. Así pues tras la administración de un activo sobre la piel o mucosa este puede ejercer su efecto solamente en los tejidos locales o capas más superficiales y/o en cualquiera de los tejidos del cuerpo como si su aplicación fuese por vía oral o parenteral. Por tanto, la administración transdérmica o transmucosa de fármacos representa una vía de administración alternativa más práctica, segura y menos invasiva que las vías convencionales de administración basadas en el uso de agujas o formas farmacéuticas sólidas orales.

A pesar de que la de administración transdérmica o transmucosa de principios activos no ha sido todavía explotada, sus ventajas potenciales respecto a otras vías de administración son innumerables, entre ellas:

- Evita el tracto gastrointestinal y la biotransformación del efecto de primer paso hepático
- Liberación en un lugar específico
- Control del porcentaje de absorción
- Puede formularse como un compuesto de liberación retardada
- Proporciona una dosis constante
- Reduce los efectos secundarios sistémicos
- Fácil aplicación. Mejora el cumplimiento por el paciente
- Permite que se hallen concentraciones sustanciales del fármaco en el interior de los tejidos blandos del lugar de aplicación
- Superficie fácilmente accesible (posibilidad de controlar y/o eliminar la forma farmacéutica).

Estas ventajas son especialmente útiles en el caso de fármacos susceptibles de degradarse en el tracto gastrointestinal, fármacos usados en tratamientos crónicos, o fármacos utilizados en terapias de reemplazo.

Además tanto la piel y la mucosa oral son vías de administración muy popular, debido a su buena accesibilidad y una elevada aceptación por parte del paciente (Hearnden y cols. 2012). Además están expuestas de forma rutinaria a diferentes compuestos y estrés mecánico, por lo que se presupone como robustas y menos sensibles a irritación por parte del fármaco, forma farmacéutica, uso de promotores de la absorción, etc, que otras vías.

No obstante, se deberá tener en cuenta que tanto en piel como en mucosa también existe metabolismo (Goebel y cols.2009), y aunque su carga metabólica es mucho menos que la hepática, puede ser un inconveniente para la administración de determinados fármacos por estas vías. Por otro lado, la gran variedad de microorganismos presentes en piel y en mucosas también pueden alterar algunos fármacos (Yamahara y Lee, 1993).

Como ventaja de la vía transmucosa oral frente a la transdérmica se puede decir que es más permeable, mas vascularizada, menos sensible a materiales alergénicos e irritantes y posee una mayor hidratación que permite la solubilización del fármaco. Estos factores hacen que la mucosa oral sea una vía de administración interesante para fármacos que requerían un rápido inicio de la acción a nivel sistémico (Sankar y cols.2011).

Una consideración a tener en cuenta, son las zonas límites entre piel y mucosa, como labios, piel peri-ocular, peri-anal y peri-genital. Estos poseen características intermedias a las anteriormente citadas. El estrato córneo en estas zonas es más delgado, por tanto más permeable.

Se considera que la mayoría de fármacos atraviesan la piel o mucosa por difusión pasiva, a pesar de que diversos autores observaron el transporte activo de algunos fármacos. Los procesos implicados en el paso del fármaco por vía transdérmica o transmucosa comprenden tres pasos (Figura 18). Primeramente la liberación del fármaco del vehiculo que lo contiene hasta la interfase piel/vehiculo. Una vez aquí el fármaco penetra por las capas más externas, hasta las internas, pudiendo llegar a la circulación sistémica (Lu y Gao, 2010).



Figura 18- Esquema de los procesos implicados en la penetración dérmica.

El paso del fármaco a través de la piel puede producirse por dos rutas principales:

(Ver Figura 19).

Ruta transepidérmica. Esta es la vía más importante en la penetración cutánea. Se produce por difusión intercelular o intracelular. La vía intercelular es de naturaleza fundamentalmente lipídica (Elias y cols. 1981), por lo que el fármaco pasa a través de la matriz lipídica entre los corneocitos del estrato córneo. Los fármacos lipófilos difunden a través de estos lípidos extracelulares y los más polares a través de la parte hidrófila de dichos lípidos. En la vía intracelular el fármaco pasa a través de los corneocitos, salvando repetidos repartos entre el principio activo y las regiones hidrófilas y lipófilas de las bicapas lipídicas. Esto hace que el paso del fármaco a través de esta vía sea menos importante. Los compuestos apolares penetran por difusión a través de los lípidos intracelulares, mientras que los polares lo hacen a través de la queratina hidratada presente en los queratinocitos.

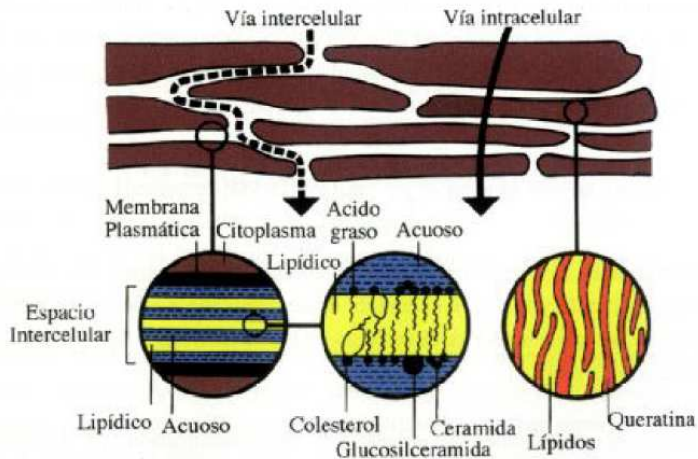


Figura 19 - Esquema de la rutas de paso del fármaco a través de la piel.

- Ruta apéndice, cuando el fármaco pasa a través de glándulas sudoríparas, sebáceas o a través de los folículos pilosos. Esta vía de entrada es más rápida que las anteriores aunque se considera una ruta minoritaria. Aproximadamente el 1% de la superficie corporal está cubierta por orificios porosos (Tanner y Marks, 2008).

La difusión del fármaco a través del epitelio bucal (Salamat-Miller y cols. 2005) se puede realizar de igual forma mediante tres mecanismos:

- Difusión pasiva transcelular o paracelular
- Transporte facilitado
- Endocitosis/exocitosis

1.15 - Factores que influyen en la absorción percutánea

1) Factores biológicos:

- a. Edad: Debido a la variabilidad interindividual en los parámetros de permeación, los resultados de los estudios son poco concluyentes. Únicamente se puede afirmar que la piel de niños y recién nacidos así como la de ancianos es más permeable que la del adulto (Bonina y cols.1993).

- b. Zona corporal. Existen grandes variaciones intraindividuales en función de la zona corporal (Wester y Maibach, 1999). El área menos permeable para el paso de sustancias es la planta del pie (grosor estrato corneo 600 μm), seguido de los tobillos y la palma de la mano (grosor estrato corneo 400 μm). El antebrazo y la espalda presentan una permeabilidad mayor, seguida de cuero cabelludo, axilas y frente. Las zonas más permeables resultaron ser el ángulo de la mandíbula y la piel del escroto (grosor estrato corneo 5 μm) (Scheuplein y Blank, 1971).

- c. Estado de la piel: Existen determinadas patologías que afectan al estado de la piel, pudiendo alterar su función barrera y de esta forma aumentar la permeabilidad de la misma a xenobiótico, fármacos, microorganismos. La permeabilidad aumenta en casos de descamación cutánea, agresión química o física, e inflamación.

- d. Grado de hidratación del estrato córneo: si aumenta el contenido de agua la permeabilidad de los fármacos aumenta (Idson, 1975), como se verá en el efecto oclusivo. Cuando el nivel de hidratación es menor al 10% se considera que la queratina esta deshidratada, se produce descamación del estrato córneo y se altera la absorción.

- e. Flujo sanguíneo: Al aumentar el flujo sanguíneo, el tiempo de residencia del fármaco en la dermis disminuye y aumenta por tanto el gradiente de concentración, favoreciendo el paso del fármaco de la superficie cutánea a la dermis. Si el flujo sanguíneo de la zona es bajo o disminuye, la sustancia no

puede difundir a medida que penetra, convirtiéndose en un factor limitante para la absorción del fármaco (Barry, 1983).

- f. Factores ambientales: Relacionado con el flujo sanguíneo, se podría citar el efecto vasoconstrictor que la disminución de la temperatura ambiental tiene sobre la superficie de la piel y la consecuente disminución de la permeabilidad. Como las forma tópicas se suelen aplicar bajo un ligero masaje, esto hace un aumento del flujo sanguíneo local y favorece la absorción del fármaco.

2) Factores físico-químicos:

a. Criterios relacionados con el fármaco:

- Coefficiente de reparto: el coeficiente de reparto octanol/agua ($\log P$) es uno de los factores más importantes para la penetración del fármaco a través del epitelio y puede ser utilizado para predecir el reparto en la piel. El $\log P$ y el reparto en la piel mantienen una relación parabólica (Kim y cols.2000). De tal forma que los compuestos con un bajo $\log P$ presentan una baja permeabilidad debido a su bajo reparto con los lípidos de la piel (tienden a quedarse en el vehículo), sin embargo los fármacos con un $\log P$ elevado (que facilita la salida del fármaco del vehículo hacia la piel) también poseen una baja permeabilidad por su incapacidad de reparto fuera del estrato córneo (que quedaría retenido en éste). Se acepta que la máxima permeación se consigue con un $\log P$ entre 1 y 3 (Thomas y Finnin, 2004), La ley de Fick establece una proporcionalidad entre el flujo del fármaco a través de la piel y el coeficiente de reparto entre el vehículo y la piel.

- Coefficiente de difusión. Expresa la velocidad de difusión de un compuesto en un determinado medio.

El coeficiente de difusión es inversamente proporcional al tamaño de la molécula. Por tanto los fármacos con un bajo peso molecular son más susceptibles de penetrar a través del epitelio. El grado de dispersión influye de forma considerable la penetración del fármacos poco solubles en los vehículos porque afecta al coeficiente de

difusión, por tanto al aumentar el grado de dispersión en el vehículo, aumenta el coeficiente de difusión y en consecuencia la penetración.

- Solubilidad del fármaco: La solubilidad del fármaco afectara a la liberación, ya que al aumentar la concentración de fármaco disuelto en el vehículo, el gradiente de concentración entre el fármaco y la superficie cutánea será mayor, lo que se traduce en una mayor cantidad de fármaco liberado. La actividad termodinámica depende de la concentración y solubilidad del fármaco, así como de interacciones fármaco-fármaco y fármaco -vehículo. La actividad termodinámica del fármaco en el vehículo será máxima cuando se utilicen soluciones saturadas. Este parámetro indica la tendencia del fármaco a escapar del vehículo (Carelli y cols.1992). Otros autores recomiendan utilizar soluciones supersaturadas (Valenta y cols.2000) o suspensiones (Lippold, 1992) con el fin de que no disminuya la concentración de fármaco disuelto durante el proceso de liberación del mismo. En este caso se tendrá que tener en cuenta la velocidad de disolución del fármaco. Por otro lado debe existir un equilibrio entre la afinidad del fármaco-vehículo y la afinidad fármaco-piel/mucosa, ya que una afinidad extrema hacia uno de ellos significará que el fármaco permanecerá mayoritariamente en el sitio más afín. Por tanto los fármacos lipófilos disueltos en medios acuosos se absorberán antes que si se encuentran en un solvente lipófilo a la misma concentración (Jacobi y cols.2006). La mayoría de fármacos son ácido o bases débiles por lo que a pH fisiológico se encuentran parcialmente ionizados, presentando una solubilidad pH dependiente. Los fármacos que se encuentran ionizados difunden con mayor dificultad que los que se encuentran en su forma molecular.

Teniendo en cuenta todos estos factores, se podría afirmar que las características ideales del fármaco que le permiten penetrar a través de la piel son una solubilidad acuosa de 1mg/mL, peso molecular menor a 500 Dalton, punto de fusión menor a 200°C. Como regla general se estima que el fármaco no tenga capacidad para forma más de dos puentes de hidrógeno y así poder considerarlo con buena difusión (du Plessis y cols. 2002).

b. Criterios relacionados con el vehículo

- Concentración de fármaco: Según la ley de Fick para la difusión, la velocidad de transferencia de una sustancia desde zonas de alta concentración a las de baja concentración es proporcional al gradiente de concentración. Además a mayor fármaco solubilizado en el vehículo sin poseer una actividad selectiva con este, presentará una mayor actividad termodinámica. Esta aumentará si se incrementa la concentración del fármaco en la fórmula o manipulando el vehículo para disminuir la solubilidad del fármaco en este (Thomas y Finnin, 2004).
- Oclusión. La oclusión (de sistemas transdérmicos, apósitos oclusivos y bases lipófilas) ha demostrado aumentar la permeabilidad de algunos fármacos (Feldmann y Maibach, 1965). Por tanto a medida que aumenta la fase acuosa en la formulación, el poder oclusivo de la misma disminuye. Los mecanismos implicados en este proceso se piensa que pueden ser debidos a la acumulación de agua dentro de la piel, hinchando los corneocitos y aumentando el agua de la matriz intercelular (Tsai y Maibach, 1999); por otro lado también aumenta la temperatura de la piel y disminuye la pérdida de co-solventes por evaporación (Taylor y cols.2002). No obstante, en algunos casos la oclusión puede provocar irritación y favorecer el crecimiento microbiano (Tanner y Marks, 2008).
- Viscosidad: Cuanto menor sea la viscosidad del vehículo mayor será la liberación del fármaco (Al-Khamis y cols.1986) ya que tendrá un mayor coeficiente de difusión. La elección de la formulación y su comportamiento reológico apropiado determinara el tiempo de residencia y la exposición local del fármaco en el sitio requerido.
- Dosis y frecuencia de aplicación (Lu y Gao, 2010): Con el fin de entender el efecto de los excipientes sobre la penetración transepidérmica, es recomendable la aplicación de dosis finitas en el compartimento donador (> 100 mg de formulación por cm^2). La aplicación de dosis infinitas da lugar a una relativamente constante fuerza de entrada del fármaco as través de la piel, permitiendo alcanzar estados estacionarios plasmáticos. Sin embargo en la

práctica diaria no se aplican dosis tan elevadas, sino aproximadamente 2-5 mg/cm², dando lugar a una fina capa de la formulación (10-30 μm), que es menos de lo necesario para que se sature de fármaco el estrato corneo. Obtenemos así un modelo de dosis finitas. Por otro lado los efectos que tienen los excipientes sobre la piel pueden afectar a la penetración transdérmica de forma diferente cuando se aplican en forma de dosis única o siguiendo un esquema de múltiples dosis. Para estudiar el efecto de la frecuencia de dosis, es más aconsejable realizar un estudio de múltiples dosis finitas.

- c. Promotores de la absorción: Los promotores de absorción son moléculas de diferente naturaleza química que actúan reversiblemente a nivel del estrato córneo, desestructurando y facilitando que el fármaco permee más rápidamente hacia los tejidos viables y pase a circulación sistémica. Existe una teoría general (Lipid-Protein-Partitioning) basada en las posibles alteraciones a nivel molecular que sufre el estrato corneo por acción de los promotores. Esta teoría postula (Barry, 1988; Barry, 1987; Potts y cols.1991) que la acción promotora sobre las diferentes estructuras histológicas epidérmicas se va a producir mediante una o más de las siguientes acciones:

- i. Interacción con las proteínas celulares, promoviendo la permeación a través de los corneocitos (vía intracelular).
- ii. Interacción con la estructura lipídica que rodea los corneocitos, incrementando la difusión intercelular (vía intercelular). Esta acción puede producirse por la interacción de los promotores con los grupos polares de los lípidos, por la inserción de estos entre las estructuras lipídicas o por cambios en la polaridad en determinadas zonas, variando el coeficiente de reparto del fármaco entre el vehículo y la piel.

Ácidos y alcoholes grasos: El efecto promotor de este grupo de sustancias depende en gran medida de sus estructuras. Parece ser que el efecto promotor de estos se debe a la fluidificación de los lípidos cutáneos y al incremento en el nivel de hidratación

superficial que estas sustancias pueden desarrollar (Ceve y cols.1996). Los ácidos grasos saturados generalmente aumentan el coeficiente de reparto del fármaco entre el vehículo y la piel. Su efectividad está relacionada con la longitud de la cadena hidrocarbonada. Las cadenas con 10 (Tanojo y cols.1997) o 12 (Kim y cols.1993) átomos de carbono son los que presentan una lipofilia óptima. Los ácidos grasos insaturados alteran la estructura de los lípidos extracelulares y disminuyen la resistencia a la difusión de los compuestos, aumentando su absorción. En general los ácidos grasos insaturados son más eficaces que sus análogos saturados, ya que debido a la flexión del doble enlace se produce un mayor desorden en la bicapas lipídicas (Aungst, 1995). Respecto al grado de insaturación óptimo los estudios no son concluyentes. Mientras que algunos autores señalan que el efecto promotor aumenta al aumentar el número de insaturaciones (Carelli y cols.1992), otros apuntan a que poseen efectos similares (Kandimalla y cols.1999) o incluso menores (Santoyo, 1996), equiparándolos a los saturados. Se ha sugerido que el ácido oleico se dispone de forma heterogénea en las bicapas lipídicas dando lugar a la formación de canales fluidos dentro del estrato córneo (Walker y Hadgraft, 1991). El ácido oleico actúa en la ruta no polar, incrementando tanto la difusión como el reparto del fármaco (Koyama y cols.1994; Yamashita y cols.1995), pero en la ruta polar aumenta sólo el reparto, lo que parece indicar que aumenta la hidratación del estrato córneo. Por otro lado cabe destacar que los ácidos grasos pueden formar pares iónicos con fármacos catiónicos aumentando así su coeficiente de reparto y por tanto su absorción (Aungst y cols.1990). También cabe destacar que el ácido oleico tiene que ser utilizado con cuidado debido a que su aplicación causa cambios morfológicos en las células de Langerhans de la epidermis. Estas células juegan un papel importante en la iniciación y coordinación de la respuesta inmune mediada por linfocitos T. Por tanto puede causar inmunosupresión en la piel a altas concentraciones (Kogan y Garti, 2006).

3) Criterios de la integridad para el estudio del material

Aunque siempre que sea posible, como es lógico, se pretende trabajar con tejidos biológicos (piel y mucosas) frescos, la disponibilidad de estos tejidos es limitada en el tiempo y siempre relativa a la obtención de las mismas en condiciones óptimas que nos aseguren su correcto estado.

Las membranas más adecuadas para la realización de estos estudios es la piel y mucosas humana, aunque en ausencia de estas se pueden utilizar piel y mucosas de cerdo, que presentan propiedades histológicas, bioquímicas y un perfil de permeabilidad similar a la humana (Sutariya,VB y cols 2005)

Se trabajó con mucosa bucal de cerdo por ser anatómicamente la más similar a la especie humana (Rough-Yee Hana y cols, 1999), (S. Senel y cols, 200), (Calpena y cols, 2011)

La disponibilidad de mucosas es puntual y está basada en la obtención de las mismas a partir de cerdos utilizados en procedimientos de docencia, principalmente en estudios de cirugía laparoscópica, donde en ningún momento la estructura de la mucosa puede ser dañada y alterada.

La obtención de estas mucosas orales conlleva muchas veces la congelación de las mismas para ser utilizadas cuando sea necesario y es vital el poder asegurar la fiabilidad e integridad de las mismas tras su congelación.

Dada la dificultad existente en tener acceso estable y frecuente a la congelación con Nitrogeno líquido (-196°C) se realizaron diversos estudios a diferentes temperaturas y utilizando diversos crioprotectores.

Existen descritos en la bibliografía muchos sistemas de crioprotección basados en la utilización de:

Agentes penetrantes: Crioprotectores con bajo peso molecular, permeables a través de la membrana. Desplazan el agua intracelular evitando la formación de cristales de hielo.

Se utilizan básicamente para congelaciones a velocidad lenta.

- DMSO
- Glicerol
- Etilenglicol

Agentes no penetrantes: Son crioprotectores con un alto peso molecular, y por lo tanto no permeables a través de la membrana. Promueven la rápida deshidratación celular. Se utilizan para las congelaciones a velocidades altas.

- Polivinilpirrolidona
- Lipoproteínas yema huevo

- Proteínas de elevado peso molecular
- Polietilenglicol

Básicamente lo que se intenta conseguir con la utilización de crioprotectores es la deshidratación de la célula. Hay que extraer el agua de la célula y sustituirla por crioprotectores o criopreservantes que mantengan el equilibrio osmótico.

Hay que evitar la formación de cristales intracelulares que son los que actúan a modo de cuchillas destruyendo la estructura celular.

Después de diferentes pruebas, búsquedas bibliográficas y consultas con bancos de tejidos se llegó a la conclusión de que utilizaríamos un “coctel de criopreservación” compuesto por:

- PBS (Phosphate buffered saline) adicionado con un 4% de Albumina Humana y un 10% de DMSO (Dimetil sulfóxido)

Dada la citotoxicidad del DMSO a temperatura ambiente, la mezcla se conservaba en nevera a 4-5°C antes de la introducción de las mucosas.

Una vez recién sacrificado el cerdo, se obtenían las mucosas sin manipular con instrumental que pudiese dañarlas y se introducían en el preparado criopreservante mantenido en refrigeración.

Después de un tiempo corto (5-10min.) para permitir la penetración en el tejido las mucosas se depositaban a -85°C.

La descongelación se realizaba por inmersión de las muestras congeladas en PBS mantenido a 38°C en un baño María.

Se iban realizando sucesivos lavados con PBS para eliminar los restos de DMSO que nos podían dañar las mucosas si se mantenían en contacto a T^a ambiente.

Una vez descongeladas se mantenían en solución balanceada de Hanks (Ver tabla 4) en nevera hasta su utilización en el laboratorio.

Tabla 4. Comp Sol.Hanks-Biological Industries (Israel)

<u>COMPONENTS</u>	<u>Mole.</u> <u>Weight</u>	<u>Conc.</u> <u>(gm/L)</u>	<u>Molarity</u> <u>(mM)</u>
INORGANIC SALTS:			
Calcium Chloride (CaCl ₂)	111	0.14	1.26
Potassium Chloride (KCl)	75	0.40	5.33
Potassium Phosphate Monobasic (KH ₂ PO ₄)	136	0.06	0.44
Magnesium Chloride (MgCl ₂ -6H ₂ O)	203	0.10	0.50
Magnesium Sulfate (MgSO ₄ -7H ₂ O)	246	0.10	0.41
Sodium Chloride (NaCl)	58	8.00	138.00
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	84	0.35	4.00
Sodium Phosphate Dibasic (Na ₂ HPO ₄)	142	0.048	0.30
Other Components:			
Glucose	180	1.00	5.60

El mantenimiento de la correcta estructura celular de las mucosas tras congelación, se comprobó tras la realización del estudio histológico.

Muestras de mucosa oral, correspondientes a mejillas de cerdos sometidas a diferentes tratamientos de preservación para la posterior realización de ensayos de permeabilidad.

Las muestras consistían en:

- 1 - Mucosas fijadas por inmersión en formol al 4% durante al menos 1 día. (Figura 20)
- 2 - Mucosas crioprotegidas con DMSO y guardadas a -80° durante 1 año. (Figura 21)
- 3 - Mucosas crioprotegidas con DMSO y guardadas a -80° durante 2 años. (Figura 22)

Se procedió a la inclusión de las muestras en parafina, a la obtención de cortes finos y posterior tinción con hematoxilina-eosina. Los cortes se observaron en un microscopio Nikon con luz transmitida.

A) En todas las muestras se observó la composición de la mucosa oral normal formada por (a partir de la superficie bucal):

- Epitelio plano estratificado sin queratinizar. Las diferentes capas de este epitelio están formadas por células muy juntas, sin espacios celulares aparentes entre ellas, mostrando un tejido compacto y en general muy bien estructurado. No se observaron variaciones remarcables de esta estructura entre las diferentes muestras.

- Tejido subepitelial compuesto por tejido conectivo denso irregular, rico en fibras de colágena con vasos sanguíneos, estructuras nerviosas y conductos de glándulas secretoras.

- Haces de musculatura esquelética en secciones transversales separados por tabiques de tejido conectivo y alternando con pequeñas masas de tejido adiposo. A la misma altura y más profundamente se localizan las partes secretoras de Glándulas salivares de tipo principalmente mucoso. Las partes secretoras están tabicadas por tejido conectivo, formando lóbulos secretores. En algunas zonas, estas porciones secretoras se ven envueltas de fibras musculares.

B) Variaciones entre las muestras:

Epitelio plano estratificado:

-Únicamente se observa, de forma variable, cambios en las capas más superficiales (capa superficial) del epitelio en que aparecen las células más laxas. Este efecto es variable, pudiéndose observar incluso en algunas áreas de epitelios de mucosas sin congelar aunque en menor grado. El resto del epitelio. Capas basales, parabasales e intermedias no muestran diferencias ni cambios estructurales aparentes en las diferentes condiciones, mostrando un tejido compacto sin solución de continuidad entre sus células.

Existen variaciones en el tejido subepitelial, muscular y glandular de tipo individual sin que se relacione al tratamiento utilizado para la criopreservación.

Posiblemente estos cambios individuales se deban a la manipulación que ha sufrido la muestra para la obtención de cortes histológicos y su posterior tinción y montaje.

Detalle de los cortes histológicos realizados:

1-Muestras sin congelar

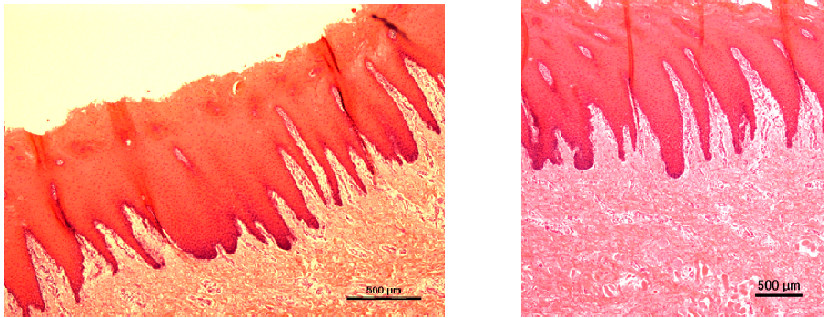


Figura-20

2-Muestras en congelador 1 año

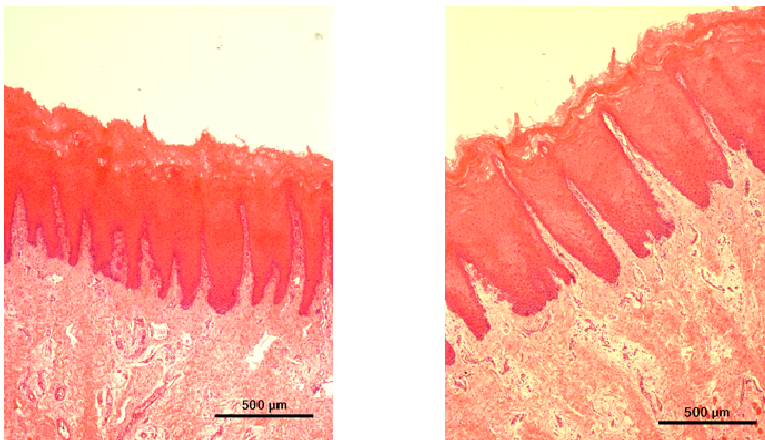


Figura- 21

3.Muestras en congelador 2 años

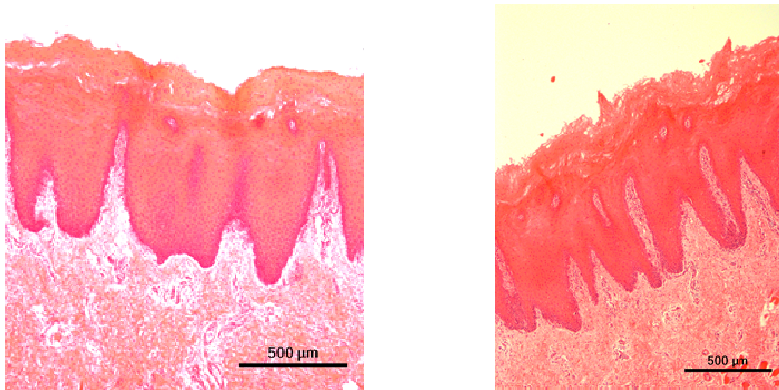


Figura - 22

No se observan diferencias laboratoriales en el comportamiento de las mucosas congeladas frente a las mucosas frescas.

Así mismo, se ratifica con el estudio histológico que la estructura anatómica permanece estable, después de incluso 2 años de congelación, protegida por los crioprotectores.

Por lo tanto podemos trabajar independientemente con mucosa fresca y congelada en función de disponibilidad de la misma sin esperar resultados dispares.

Las muestras de piel procedentes de cirugías plásticas abdominales se mantuvieron congeladas a -25°C hasta su utilización en el laboratorio.

Tanto la integridad de la piel como la de las mucosas se valoró además con el cálculo de un nuevo parámetro para medir la integridad de la mucosa fresca y congelada denominado Transmucosal Water Loss (TMWL) y la de la piel a través del Transepidermal wáter loss (TEWL)

Se aseguró la integridad de la mucosa bucal porcina, tanto en el animal anestesiado como en las mucosas obtenidas, con el **TMWL** (Transmucosal Water Loss) (Ver figura

23) => Medición de la cantidad de agua que pasa del interior del cuerpo a través de la capa epidérmica de la piel o la capa externa de la mucosa a la atmósfera por procesos de difusión y evaporación. Se expresa en $\text{g}/\text{m}^2/\text{hora}$ y el valor máximo obtenido en el animal anestesiado fue de $30\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ (elegido como punto de aceptación de viabilidad de uso para las mucosas).

El valor de corte para la piel fue de $10\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$.

Las mediciones se realizaron por triplicado durante 60 seg. utilizando el aparato DermaLab (Cortex Technology, Hadsund (Denmark)).

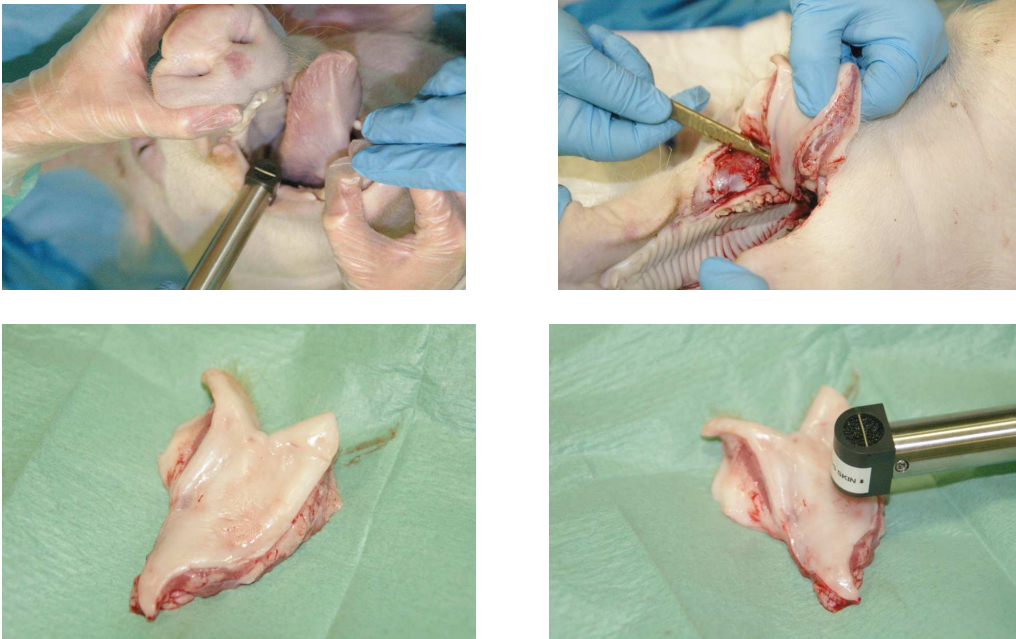


Figura 23- Procedimiento de medición del TMWL en animal in vivo y en mucosa ex vivo

Para la realización de los estudios de permeación, tanto la piel como las mucosas se cortaron usando el dermatomo Aesculap GA 630 (Aesculap,Tuttlingen,Germany).(Ver Figura 24)

La piel se cortó con un grosor de $400 \pm 50\mu\text{m}$ y las mucosas con $500 \pm 50\mu\text{m}$



Figura 24 – Corte de mucosa “ex vivo” con dermatomo

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

CAPITULO 2- OBJETIVOS DEL ESTUDIO Y PLAN DE TRABAJO

Este trabajo se basa en el estudio de permeación de doxepina a través de la mucosa bucal y de imipramina a través de la piel. La vía de administración a través de mucosa bucal ha sido escogida como alternativa a la vía oral debido a ventajas como: Fácil administración, escaso contenido en enzimas degradativas, elevada permeabilidad dada su gran vascularización y ausencia de efecto de primer paso. Para ello, la mucosa oral ofrece un amplio abanico de posibilidades para el diseño galénico de excipientes o sistemas que posibiliten una óptima permeabilización y absorción de principios activos. Para conseguir tal fin se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar dos formulaciones nanoestructuradas con doxepina e imipramina que posean actividad analgésica y anestésica.
- Caracterizar físico químicamente dichas formulaciones y evaluar su potencial capacidad de permear a través de la piel humana.
- Testar su actividad in vivo mediante el Plantar Test.
- De igual forma y con otro tejido biológico (mucosa) se pretende evaluar su posible aplicación clínica en mucositis de diferente etiología.
- Se buscará un parámetro predictivo de la integridad en dichos tejidos que sirva para evaluar la fiabilidad de los estudios.
- Se estudiará un método de criopreservación específico para mucosas con el fin de mantener la integridad anatómica tras su congelación y que nos permita su utilización con independencia temporal, evitando el uso innecesario de animales de experimentación.
- Se evaluará la permeación intrínseca de doxepina en mucosa congelada con el fin de valorar su potencial uso local o sistémico.
- Se determinará la integridad histológica de la mucosa tras la permeación de dicho fármaco corroborando la bondad en el método de criopreservación y la no perjudicial acción de dicho fármaco al ser usado en dicho tejido con indicación analgésica local.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1- Relación de trabajos científicos publicados

Gimeno Sandig A, Calpena Campmany AC, Fernández Campos F, Martín Villena MJ, Clares Naveros B. (2013).

Transdermal delivery of imipramine and doxepin from newly oil-in-water nanoemulsions for an analgesic and anti-allodynic activity: Development, characterization and in vivo evaluation.

Colloids and Surfaces B Biointerfaces, 103: 558-565.

FI 4.28. Q1: en BIOPHYSICS, CHEMISTRY, PHYSICAL, MATERIALS SCIENCE, BIOMATERIALS

Sonia Amores, José Domenech Helena Colom, Ana C. Calpena, Beatriz Clares, Álvaro Gimeno, Jacinto Lauroba.

An improved cryopreservation method for porcine buccal mucosa in ex vivo drug permeation studies using Franz diffusion cells.

European Journal of Pharmaceutical Sciences 60 (2014) 49–54

FI: 3.35. Q2 en PHARMACOLOGY & PHARMACY.

Alvaro Gimeno, Ana C. Calpena, Roser Sanz, Mireia Mallandrich, Concepción Peraire, Beatriz Clares

Transbuccal delivery of doxepin: Studies on permeation and histological investigation.

International Journal of Pharmaceutics .

FI: 3.65. Q1 en PHARMACOLOGY & PHARMACY

3.2- RESUMEN PRIMER ARTÍCULO

Los antidepresivos y más concretamente los antidepresivos tricíclicos por su mayor eficacia y actividad analgésica han sido objeto de numerosos estudios.

En este primer artículo, hemos estudiado la actividad analgésica y anestésica de dos antidepresivos tricíclicos (imipramina y doxepina).

Con el fin de investigar formulaciones analgésicas de aplicación cutánea, hemos desarrollado una nanoemulsión compuesta por propilenglicol, Transcutol® , agua, Labrasol®, Plurol Oleico®, isostearato de isoestearilo, ácido oleico y D-limoneno.

La concentración final de imipramina o doxepina en el sistema de la nanoemulsión fue del 3% (p/p)

En este trabajo, las nanoemulsiones han sido caracterizadas en función de su pH, viscosidad, tamaño de gota e índice de polidispersidad y además hemos efectuado un estudio morfológico y estructural mediante microscopía electrónica de transmisión.

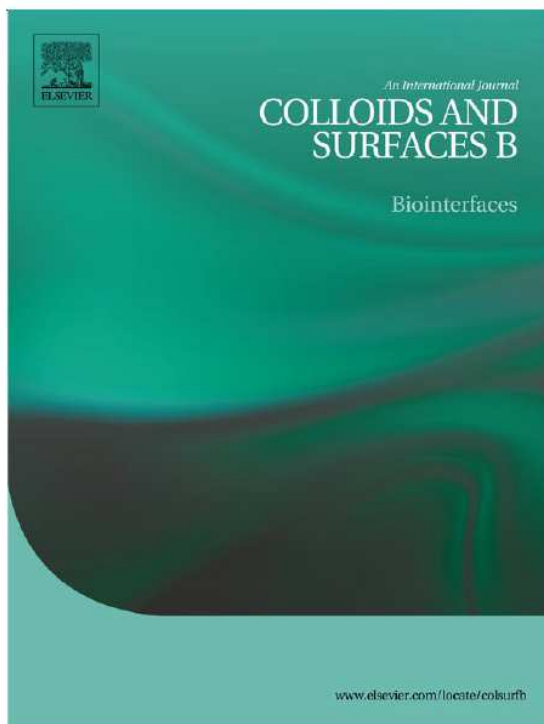
Además, este trabajo también detalla los estudios de estabilidad realizados en las formulaciones de la nanoemulsión para evaluar la integridad de la formulación, donde se manifiesta que las formulaciones permanecen estables durante un periodo de tres meses.

Mediante la utilización de las células de Franz hemos evaluado la permeación ex vivo a través de piel humana y predecido las concentraciones finales en plasma.

También se ha evaluado in vivo el efecto analgésico y anti-alodínico de las nanoemulsiones, después de su administración tópica en ratas, mediante la realización del Plantar Test, tras inoculación subplantar de carragenina.

Se ha visto que el mayor efecto se consigue con la nanoemulsión con doxepina, resultando esta formulación con doxepina una prometedora terapia analgésica alternativa con una potencial aplicación clínica sustitutiva de la inyección subcutánea y de fácil aplicación clínica en determinadas patologías y de cara a minimizar efectos indeseables en ciertas aplicaciones de quimioterapia y radioterapia.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Transdermal delivery of imipramine and doxepin from newly oil-in-water nanoemulsions for an analgesic and anti-allodynic activity: Development, characterization and *in vivo* evaluation

A. Gimeno Sandig^a, A.C. Calpena Campmany^b, F. Fernández Campos^b, M.J. Martín Villena^c,
B. Clares Naveros^{c,*}

^a Animal Facility, Bellvitge Health Sciences Campus, University of Barcelona, Spain

^b Biopharmaceutical and Pharmacokinetics Unit, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain

^c Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 July 2012

Received in revised form 18 October 2012

Accepted 19 October 2012

Available online xxx

Keywords:

Imipramine

Doxepin

Nanoemulsion

Transdermal delivery

Analgesic effect

Antiallodynia

ABSTRACT

Antidepressants have been considered by their analgesic activity in numerous studies, and specifically tricyclic antidepressants to possess the greatest efficacy. Imipramine and doxepin have been reported to exhibit local anaesthetic properties. In order to investigate their cutaneous analgesic effect after topical application a nanoemulsion vehicle was developed. This nanoemulsion is composed of propylenglicol, Transcutol[®], water, Labrasol[®], Plurol Oleique[®], isostearyl isostearate, oleic acid, and D-limonene. The final concentration of imipramine or doxepin in the nanoemulsion system was 3% (w/w). The nanoemulsions were characterized by pH, viscosity, droplet size, polydispersity index and finally, a morphological and structural examination was carried out by using transmission electron microscopy. Furthermore, the present work also reports stability studies on the nanoemulsion formulations to evaluate the integrity of the formulation; these indicate that formulations are stable for a period of three months. Moreover *ex vivo* studies were performed to evaluate permeation behaviour through human skin and predict plasma concentrations concluding that topically applied imipramine and doxepin loaded nanoemulsions were safe for a local effect. Similarly, the *in vivo* analgesic and anti-allodynic activity in rats was evaluated being stronger for the doxepin loaded nanoemulsion. This study demonstrated that nanoemulsion containing doxepin could be promising as an alternative analgesic therapy with a potential clinical application.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Many drugs are currently used to treat pain depending on the cause and type, modulating peripheral and central systems that are implicated in nociceptive processes. Among these, some drugs without being properly direct analgesics were observed to provide an effective analgesic activity in different painful situations [1]. The role of antidepressant in the management of different pain syndromes has elicited considerable interest. The analgesic mechanism of antidepressants has been considered by a number of studies reporting their efficacy, among these drug, tricyclic antidepressants (TCA) have shown the greatest effect [2] because they act on multiple nociceptive targets at central and peripheral levels [3] independent of their antidepressant effects [4]. The periphery

blocking adenosine uptake could be involved in peripheral analgesia of TAC [5]. So they have been useful in the treatment of many neuropathic pain conditions such as painful polyneuropathy, postherpetic neuralgia and peripheral nerve injury [6]. On the other hand, the clear expression of a local antinociceptive or analgesic action with TAC raises the possibility that this class of agents could be given topically and may be useful as peripherally acting analgesics in humans [7]. TAC as doxepin, imipramine, trimipramine, protriptyline, desipramine and nortriptyline were also found to have significant effects on sciatic nerve blockade as local anaesthetics [8]. Topical formulations with local anaesthetics as lidocaine or prilocaine have been utilized, but these transdermal formulations are limited by the short duration of their analgesic effects; a longer lasting cutaneous local anaesthetic would thus be valuable [9].

Transdermal drug delivery represents the successful and innovative area of research in drug delivery and known to enhance therapeutic efficacy with many advantages over the oral route of administration, it avoids hepatic metabolism, the administration is easier and more convenient for patients, and there is the possibility of immediate withdrawal of the treatment if necessary [10].

* Corresponding author at: Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, Granada University, Campus of Cartuja, 18071 Granada, Spain. Tel.: +34 958 243904; fax: +34 958 248958.

E-mail address: beatrizclares@ugr.es (B.C. Naveros).

However, only a few molecules can be administered transdermally because of strong barrier nature of stratum corneum [11]. In fact, it is well known that many promising new or existing drugs never make it to the market because of difficulties in delivery. Such drugs need to be formulated with smart drug delivery systems and/or delivery technology to make them acceptable for the treatment of patients.

There has been increased interest during recent years in the use of nanoemulsions for pharmaceutical and biomedical aids as vehicles that show great future of dermal and transdermal drug delivery and targeting. Nanoemulsions are thermodynamically stable transparent or translucent dispersions of oil and water stabilized by an interfacial film of surfactant usually in combination with cosurfactant having the droplet size less than 100 nm [12]. These have attractive characteristics such as: improved solubilization of drugs that have low solubility in water; stability against inherent creaming, flocculation coalescence, and sedimentation; ability not to damage healthy human and animal cells and easy to produce [13]. Equally they are able to increase the thermodynamic activity towards the skin. These also provide a reservoir effect of the internal phase, and finally, they possess wetting properties assuring an excellent surface contact between the membrane and the vehicle [14].

Some attempts have been made to evaluate topical analgesic activity of imipramine and doxepin however no nanoemulsions as transdermal drug delivery systems has been investigated to achieve this. Based on these considerations, the major aims of the present study were: (i) to develop a new nanoemulsion drug delivery system for the topical administration of imipramine and doxepin, (ii) to characterize the formulations in terms of droplet size, shape and stability, (iii) to evaluate *ex vivo* permeation across human skin, and (iv) to evaluate *in vivo* the analgesic and anti-allodynic effect after its topical administration in rats.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Imipramine hydrochloride; 3-(10,11-dihydro-5H-dibenz[b,f]azepin-5-yl)-N-dimethylpropylaminehydrochloride, doxepine hydrochloride; 3-(dibenz[b,e]oxepin-11(6-H)-ylidene)-N,N-dimethyl-1-propylanaminehydrochloride, oleic acid and D-limonene were procured from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain). Diethylene glycol monoethyl ether (Transcutol® P), caprylocaproyl macrogol-polyoxyl-8-glyceride (Labrasol®), polyglyceryl-6-dioleate (Plurol® oleique) and isostearyl isostearate were kind gifts from Gattefossé (Barcelona, Spain). Carrageenan was purchased from Sigma–Aldrich (Barcelona, Spain). Propylene glycol, HPLC-grade methanol and acetonitrile from Panreac Química (Barcelona, Spain), as well as all other chemicals and reagents used: disodium phosphate, monopotassium phosphate, ammonia, hexanosulfonic acid, ammonium acetate and glacial acetic acid (all of them of HPLC or analytical grade samples). Double-distilled water was used after filtration in a Milli-Q® Gradient A10 system apparatus (Millipore Iberica S.A.U.; Madrid, Spain).

2.2. Construction of phase diagram

The pseudo-ternary phase diagram was mapped by titration method of homogenous liquid mixtures of oils, surfactant, and co-surfactant with water at room temperature to obtain the components and their concentration ranges that could result in large existence area of nanoemulsion without drugs.

At mass ratio 9:1 mixtures of oil phase (C) (oleic acid:isostearyl isostearate:D-limonene), surfactant/co-surfactant blend

(B) (Labrasol®:Plurol® oleique) and aqueous phase (A) (water:propylene-glycol:Transcutol® P) were prepared. The ternary phase diagram was constructed by varying mass ratios of components (A, B, C) in the mixtures from 1:9 to 9:1 with constant mass ratio of the third. A total of thirty mixtures were prepared in order to reach the maximum coverage ratio for the study and delineate the boundaries of phases formed. After being equilibrated under magnetic stirring, the selection of the nanoemulsion region was made by visual observation of a transparent phase (appearance), droplet size and polydispersity index by photo correlation spectroscopy. Based on this diagram, appropriate concentration of materials were selected and used in the preparation of nanoemulsions containing imipramine and doxepin.

2.3. Preparation of nanoemulsions

Nanoemulsion formulations selected from the constructed phase diagram were prepared according to the composition presented in Table 1 by mixing the oily phase with the surfactant/co-surfactant mixture before adding the required amount of aqueous phase under magnetic stirring. After resulting system were equilibrated, imipramine and doxepin were dissolved into the pre-weighed vehicle at a concentration ratio of 3% (w/v), by sonication method of the components in an ultrasonic bath p-selecta 514 (Vidrafoc, Barcelona, Spain) for 3 min forming the nanoemulsions. No phase change was noted after addition of the drug or after equilibration. The physico-chemical characterization of nanoemulsions is followed reported.

2.4. Physicochemical characterization of nanoemulsions

2.4.1. pH and viscosity measures

The imipramine and doxepine loaded nanoemulsions were analyzed for various physicochemical attributes. The pH values of nanoemulsions were determined directly in the samples from a Crison 501 digital pH-metre (Barcelona, Spain) at room temperature.

The viscosities of both nanoemulsions (0.4 ml) were determined without dilution at 25 °C using a rotational rheometer (HAAKE Rheostress 1, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain) with cone and plate geometry (diameter 35 mm and 2° angle) with a separation of 0.105 mm.

2.4.2. Droplet size and morphological examination

The droplet size of nanoemulsions was determined at room temperature by dynamic light scattering (DLS), with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). DLS is a non-invasive, well established technique for measuring the size of molecules and particles typically in the submicron region, providing in parallel the width of the size distribution expressed as polydispersity index (PDI). Samples were directly placed into the module and the data were collected at room temperature.

Table 1
Percentage composition (w/v) of the imipramine loaded nanoemulsion and doxepin loaded nanoemulsion.

Microemulsions	Doxepin	Imipramine
Tricyclic-antidepressant	3%	3%
Propylenglicol	5%	5%
Transcutol® (diethylene glycol monoethyl ether)	20%	20%
Labrasol® (PEG-8 caprylic/capric glycerides)	19%	19%
Plurol oleique® (polyglyceryl-6 dioleate)	19%	19%
Isostearyl isostearate	5%	5%
Oleic acid	5%	5%
D-limonene	5%	5%
Water	19%	19%

Experiments were carried out in triplicate for each sample, and results were presented as average \pm SD.

Morphological and structural examination of nanoemulsions was carried out using transmission electron microscopy (TEM) with a Zeiss 902 CEM microscope (Zeiss, Barcelona, Spain). Briefly, one drop of sample was deposited on copper grids covered with a layer of Formvar[®] standing for 4 min. The grids were later stained with one drop of 2% uranyl acetate solution and allowed to dry for 5 min before examination under the electron microscope.

2.5. Stability of nanoemulsions

The centrifuge test was performed to assess the physical stability by centrifugation for 30 min at 12,000 rpm.

Nanoemulsions containing imipramine and doxepin were stored at ambient temperature for 3 months. Then organoleptic characteristics as clarity, phase separation, odour and colour were observed; equally, droplet size, pH and viscosity were tested.

In the chemical stability test, weighed amount of formulations were assayed to determine the imipramine and doxepin content. The weighed samples were dissolved in methanol and stirred by vortex mixer. Then solutions filtered using filter paper, were estimated by HPLC (subsequently described in Section 2.6.3) analysis at room temperature for up to 3 months.

2.6. Human skin penetration experiments

2.6.1. Skin

Human skin from abdominal plastic surgery was used as a permeation membrane. Skin was cleaned and stored at -25°C until further use. For the experiment skin was cut using an Aesculap GA 630 dermatome (Aesculap, Tuttlingen, Germany) into 400 μm thick pieces at room temperature [15]. The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Barcelona SCIAS Hospital (Spain), and written informed consent forms were provided by volunteers.

Each skin sample was measured in triplicate using a trans-epidermal water loss (TEWL) measurement DermaLab[®] module (Cortex Technology, Hadsund, Denmark) to check the skin integrity [16] by placing the metering device perpendicular to the surface of the skin and reaching a stable TEWL reading in 60 s approximately. Skin with TEWL value higher than 10 g/m²/h was ruled out from the experiment.

2.6.2. Permeation study

Permeation study was performed on vertical Franz diffusion cell (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NY, USA) with an effective diffusional area of 2.54 cm² and 13 ml of receptor chamber capacity. The skin was mounted between donor and receptor compartment of Franz diffusion cell, with stratum corneum side facing the donor compartment and the dermis facing the receptor medium receiver compartment, which was filled with phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4). This is a biocompatible medium that allows keeping sink conditions in all the experiment. Samples of 0.3 ml of each nanoemulsion ($n=6$, respectively) were applied to the donor compartment and sealed by Parafilm[®] immediately to prevent water evaporation. Temperature was kept at $32 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ to mimic *in vivo* conditions by a circulating-water jacket and stirred with a magnetic rotor at a speed of 700 rpm. Samples of 0.4 ml were withdrawn at regular time intervals, and replaced with the same volume of buffer solution. Three parallel determinations were performed. The samples were taken into 1.5 ml amber vials and kept at -20°C until analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC).

2.6.3. High performance liquid chromatography analysis

These samples were analyzed for the imipramine and doxepin drug content by HPLC methodology [17] validated according international guidelines in terms of linearity, accuracy and precision [18]. The blank vehicles without either imipramine or doxepin served as reference in the analytical measurements at room temperature. The HPLC system consisted of a Waters 515 pump (Waters, Milford, MA, USA) with UV-VIS 2487 detector (Waters, Milford, MA, USA) set at 254 nm (for imipramine) and 235 nm (for doxepin) at room temperature. For imipramine a reverse-phase C18 micro-Bondapak[®] column (7.8 mm \times 300 mm, 10 μm particle diameter) (Waters Associates, Milford, MA, USA) was used and the mobile phase consisting of organic phase [acetonitrile/methanol (75/25, v/v)]/aqueous phase [phosphate buffer pH 6.5] (60/40, v/v) pumped at a flux rate of 2 ml/min. The imipramine was detected with a retention time of 15 min. For doxepin with a reverse-phase C18 Sunfire[®] column (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm particle diameter) (Waters Associates, Milford, MA, USA) using as mobile phase organic phase (methanol)/aqueous [phase acetate buffer pH 6.0/water (36/64, v/v)] (72/28, v/v), pumped at 1 ml/min flux rate. Doxepin peaks were separated with a retention time of 4.6 min.

The calibration curves were prepared in phosphate buffer pH 6.5 with a concentration range of 12.5–0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 100–1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for imipramine and doxepin respectively, in order to measure the concentration of the samples and to validate the analytical technique (correlation coefficients ranging from 0.9994 to 0.9998). The latter, validated inter-day ($n=6$), was linear ($p>0.05$), according to the statistics applied, precise with a percentage variation coefficient (%CV) ranging from 0.03 to 1.29% for doxepin and from 0.11 to 3.90% for imipramine, accurate with a relative error (%E) between -3.30 and 9.10% for doxepin and between 0.02 and 3.10% for imipramine. The detection and quantification limits of the HPLC method for doxepin were 0.045 $\mu\text{g}/\text{ml} \pm 0.011$ and 0.135 $\mu\text{g}/\text{ml} \pm 0.033$, respectively, and for imipramine 0.130 $\mu\text{g}/\text{ml} \pm 0.170$ and 0.248 $\mu\text{g}/\text{ml} \pm 0.107$, respectively.

2.6.4. Calculation of permeation parameters

The cumulative amount of imipramine and doxepin permeated (Q_t) through excised human skin was plotted as function of time and determined based on the following equation:

$$Q_t = \frac{V_r \times C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_s \times C_i}{S} \quad (1)$$

where C_t is the drug concentration of the receiver solution at each sampling time, C_i the drug concentration of the i th sample, and V_r and V_s the volumes of the receiver solution and the sample, respectively, S represents the skin surface area (2.54 cm²).

The slope and intercept of the linear portion of the plot was derived by regression using the GraphPad Prism[®], v. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The steady-state fluxes (J_s , $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) of imipramine and doxepin were calculated from the slope of linear portion of the cumulative amounts permeated through the human skin per unit surface area versus time plot, and the extrapolation of this line will intercept with the X-axis at a time equal to lag time (T_l , h)

$$J_s = \frac{\Delta Q_t}{\Delta t \times S} \quad (2)$$

Apparent permeability coefficients (K_p , cm/h) were calculated according to the equation:

$$K_p = \frac{J_{ss}}{C_d} \quad (3)$$

where C_d is the drug concentration in the donor compartment, and it assumed that under sink conditions the drug concentration in the receiver compartment is negligible compared to that in the donor compartment.

Once parameters J_s , T_l and K_p are calculated, partition parameter P_1 and the diffusion parameter P_2 can be obtained from the following equations:

$$K_p = P_1 \times P_2 \quad (4)$$

$$T_l = \frac{1}{6 \times P_2} \quad (5)$$

The predictive steady-state plasma concentration of drug, that would penetrate human skin after topical application, was obtained using the following equation:

$$C_{ss} = \frac{J \times A}{Cl_p} \quad (6)$$

where C_{ss} is the plasma steady-state concentration, J the flux determined in this study, A the hypothetical area of application, and Cl_p the plasmatic clearance.

2.7. In vivo experiments

2.7.1. Animals

The studies were conducted under a protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona, Spain. The animals were treated in accordance with the Ethical Guidelines for Investigation of Experimental Pain in Conscious Animals as issued by the International Association for the Study of Pain [19].

Adult male Sprague–Dawley rats (330–350 g) were purchased from Harlan Interfauna Iberica (St. Feliu de Codines, Barcelona, Spain) and were subjected to a quarantine period of 7 days on arrival. The animals were housed in plastic cages with soft bedding with access to controlled diet and tap water *ad libitum*. Artificial lighting was used to provide 12 h light and 12 h dark every 24 h.

Experiments were conducted on animals that had been handled daily and that had been familiarized with the experimenter, the experimental environment, and the testing equipment for 3 days (30 min of handling per day).

Animals were randomly allocated into five groups of four animals:

- Group of rats treated with 200 μ l of 3% (w/v) imipramine nanoemulsion (sole and palm surfaces of the left hind paw) equivalent to a dose of 17.6 mg/kg imipramine.
- Group of rats treated with 100 μ l 0.150% (w/v) imipramine in saline subcutaneous infiltration in the plantar surface of the left hind paw, equivalent to a dose of 0.44 mg/kg imipramine.
- Group of rats treated with 200 μ l of 3% (w/v) doxepin nanoemulsion (sole and palm surfaces of the left hind paw) equivalent to a dose of 17.6 mg/kg doxepin.
- Group of rats treated with 100 μ l 0.150% (w/v) doxepin in saline subcutaneous infiltration in the plantar surface of the left hind paw, equivalent to a dose of 0.44 mg/kg doxepin.
- Control group of rats treated with 200 μ l of nanoemulsion vehicle without imipramine or doxepin (sole and palm surfaces of the left hind paw).

In pilot studies, imipramine doses smaller than 17.6 mg/kg (loaded nanoemulsion) demonstrated no reliable complete analgesic activity. Similar results were exhibited at concentrations smaller than 0.44 mg/kg in saline subcutaneous infiltration. Thus these doses were selected for imipramine and consequently

doxepin, in order to compare the behavioural responses at selected times 0, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 min after application.

2.7.2. Analgesic activity

Analgesic effect in front of nociceptive pain to thermal stimulation was determined using a Plantar Test (Ugo Basile, Comerio, Italy) based on that described by Hargreaves et al. [20]. Rats were placed individually in plexiglas cubicles over a glass surface and maintained at a room temperature of 25 °C. Radiant heat, emitted from a focused projection bulb, was applied to the mid-plantar surface of each hind paw. The current stimulus was maintained at 4.5 A and the maximum time of exposure was set to 20 s to limit possible tissue damage. At selected times after administration; the elapsed time to the brisk withdrawal in both hind paws from the thermal stimulus was recorded automatically in seconds using photodiode motor sensors (paw withdrawal latency or paw withdrawal threshold-PWT). Two determinations were performed at each time point (with a period of 30 s between measures).

As we had variables that rose to a peak and then returned to a baseline, results were analyzed according to the method described by Matthews et al. [21]. The PWT of each rat with or without treatment was measured as the area under the curve of response (time of paw withdrawal versus time from 0 to 70 min) (AUC_{0-70}). The maximum effect (E_{max}) and the time needed to reach the maximum effect (T_{max}) were also determined. AUC_{0-70} , E_{max} and T_{max} were calculated using the GraphPad Prism®, v. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

2.7.3. Antiallodynic effect

In inflamed paws, non-painful stimuli, such as light touch, become painful (allodynia). Antiallodynic activity of the formulations was tested in carrageenan-inflamed rats. Carrageenan was injected into the palm of the left hind paw via a 27-gauge needle coupled to a 50 μ l Hamilton syringe. Control rats received 50 μ l of saline into the left hind paw. Three hours after carrageenan injection, the rats were tested for the presence of allodynia.

Threshold for tactile sensitivity was measured in both hind paws, using an automated apparatus for applying reproducible light touch (Dynamic Plantar Aesthesiometer 37400, Ugo Basile, Comerio, Italy). Animals were placed in their compartments on the metal mesh surface. After a short period, in which they explored surroundings, they remained still in a resting position. With the help of an adjustable angled mirror, the tactile stimulator unit was placed beneath the selected hind paw to position the filament below the plantar surface of the animal. When the unit was started, the electrodynamic actuator lifted the stainless steel filament, which touched the plantar surface and began to exert an upward force below the threshold of feeling. The force was increased until the animal moved its paw or until a maximum of 50 g was applied for 20 s.

Equally, results were analyzed according to the method described by Matthews et al. [21] as in the previous section, but allodynia degree was defined as the difference in grams of force required to elicit PWT at selected times after treatment, and the PWT before treatment (basal). Two determinations were performed at each time point.

2.8. Statistical analysis

The mean values of the ratio between chromatographic areas and their expected concentration (AUC/C) were compared by ANOVA to test the linearity of the analytical method ($p > 0.05$).

The permeation parameters were statistically compared through the Student's *t*-test ($p < 0.05$) by using the GraphPad Prism®, v. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA,

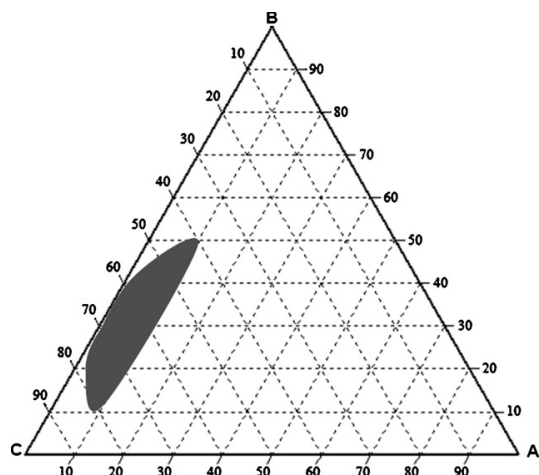


Fig. 1. Pseudo-ternary phase diagram of formulations, mixtures of oil phase (C) (oleic acid:isostearyl isostearate:D-limonene), surfactant/co-surfactant blend (B) (Labrasol®:Plurol® oleique) and aqueous phase (A) (water:propylene-glycol:Transcutol® P) dispersed in water at room temperature. The shadow area represents o/w nanoemulsion region.

USA) differences where $p < 0.05$ were considered statistically significant.

In analgesia experiments, the AUC values were calculated from the curve between the PWT versus the different time points of measurement, while in the anti-allodynia experiments, the AUC values were calculated from the curve between the differences in the PWT versus the different time points of measurement. The trapezoidal rule was applied in all cases by means of GraphPad Prism®, v. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Comparison between groups was performed by an ANOVA, differences where $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results and discussions

3.1. Formulation preparation and characterization

3.1.1. Pseudo-ternary phase diagram

Pseudo-ternary phase diagram of the investigated quaternary system is presented in Fig. 1. Formation of nanoemulsion systems (the shaded area) was observed at room temperature. The obtained results show the best values of appearance (isotropic transparent phase), droplet size ranging from 6.1 ± 0.21 nm to 27.02 ± 0.8 nm, and PDI between 0.1 ± 0.01 and 0.88 ± 0.07 for mass ratios (A:B:C) from 1:8:1 to 5:4:1 (C mass ratio was constant), then from the best area of emulsion, the formulation expressed in Table 1 was selected. Most of the components of the nanoemulsion had already been evaluated in other studies [22]. As oil phase oleic acid was chosen because is a powerful enhancer for dermal delivery since it could increase fluidity of lipid portion of the stratum corneum which resulted in a permeation enhancing effect [23,24], high content of oleic acid could cause serious skin irritation, 5% was chosen for this formulation. Terpenes such as limonene have been incorporated in the oil phase to exploit their penetration enhancement abilities [25,26]. Similarly, isostearyl isostearate was selected as a skin penetration enhancer for this vehicle because it has been reported to improve the stratum corneum water permeability barrier function [27].

The frequently combination Labrasol® and Plurol Oleique® was used as surfactant and cosurfactant respectively because of the

known skin compatibility [28]. At low oil concentration (15%) a maximum of 40% aqueous phase was solubilized by the surfactant/cosurfactant blend. The simultaneous attraction of the surfactant mixture for the oil and aqueous phases is usually described by HLB value. Labrasol®, according to the manufacturers, has HLB 14. For polyglyceryl-6 esters optimal HLB value for the production of balanced nanoemulsions with as little surfactant as possible is around 12 [22]. The cosurfactant Plurol Oleique® has HLB 10, in this way; the mass ratio in the formulation is 2:2, resulting oil in water emulsion (O/W). Similar results was obtained by Djekic and Primorac [22] with a tendency of Labrasol® to solubilize water and oil phases favoured by polyglyceryl-6 esters reaching a maximum at mass ratio 5:5.

3.1.2. Characterization of nanoemulsions

The nanoemulsions composed of 45% aqueous phase, 40% mixed surfactants and 15% oil phase, were isotropic, transparent, and slightly viscous.

Nanoemulsions have been characterized in wide varieties of techniques. Table 2 shows the results of the physicochemical characterization of unloaded and drug-loaded nanoemulsions. There were not statistical differences ($p > 0.05$) between drug-free and drug-loaded nanoemulsions for all the physicochemical parameters analyzed.

The pH values of nanoemulsion vehicle was 6.77 ± 0.001 , at 24 h after preparation, the incorporated drugs did not affect significantly the pH values of the vehicles.

Viscosity values of nanoemulsions were similar between both, for imipramine nanoemulsion a value of 75.4 ± 0.002 mPa s was observed, and for doxepin 76.3 ± 0.001 mPa s.

The average droplet size of imipramine loaded nanoemulsion was 17.773 ± 0.1389 nm, and for doxepine loaded nanoemulsion 19.904 ± 0.057 nm. The droplet size of the unloaded nanoemulsion vehicle was 19.025 ± 0.1452 nm. The mean droplet size was slightly but not significantly decreased after loading the drug imipramine. It has been hypothesized that apart from the nanoemulsion structure and composition, the incorporated drug molecules participate in the microstructure of the system and may influence it due to molecular interactions, especially if the drug possesses amphiphilic and/or mesogenic properties. This reduction in droplet size has been similarly reported in others studies [29].

The polydispersity index describes the homogeneity of the droplet size. Polydispersity values resulted in 0.216 ± 0.029 for imipramine nanoemulsion and 0.133 ± 0.017 for doxepine nanoemulsion. Therefore, these results indicate that the droplet size had high homogeneity.

As demonstrated in Fig. 2, a clear image of the undiluted nanoemulsion was obtained. TEM images allowed confirm the efficiency of the nanoemulsion preparation method used. The diffusion of the colouring used (uranyl acetate at 2%) reveals the existence of a transparent area on electron bombardment (areas which the colouring has not been able to reach) and electrodense areas which denote the presence of heavy metal. For this reason, the aqueous phase of the nanoemulsions behaves as though electrodense, which appear dark to us, whilst the apolar droplets, inside to the previous one, correspond to the transparent areas. The increased contrast observed at the interface of the oil droplets could be due to the affinity of the staining agent to interfacial components. All confirmed that an O/W nanoemulsion was obtained. Equally it could be seen that nanoemulsions droplets were spherical, with sizes ranging between 20 and 35 nm (Fig. 2A and B). These results were according to DLS measurements. The average droplet size observed is in accordance to the results obtained by other authors for those systems.

Table 2

Characterization parameters. pH, viscosity, mean droplet size and polydispersity index values of the unloaded nanoemulsion vehicle and the loaded nanoemulsions with imipramine and doxepin (3%, w/v). Each value is the average of three different measures \pm SD.

Parameter	Unloaded nanoemulsion	Imipramine nanoemulsion	Doxepin nanoemulsion
pH	6.77 \pm 0.001	6.64 \pm 0.020	6.39 \pm 0.025
Viscosity (mPa s)	75.1 \pm 0.002	75.4 \pm 0.002	76.3 \pm 0.001
Droplet size (nm)	19.025 \pm 0.1452	17.773 \pm 0.1389	19.904 \pm 0.057
Polydispersity index	0.138 \pm 0.025	0.216 \pm 0.029	0.133 \pm 0.017

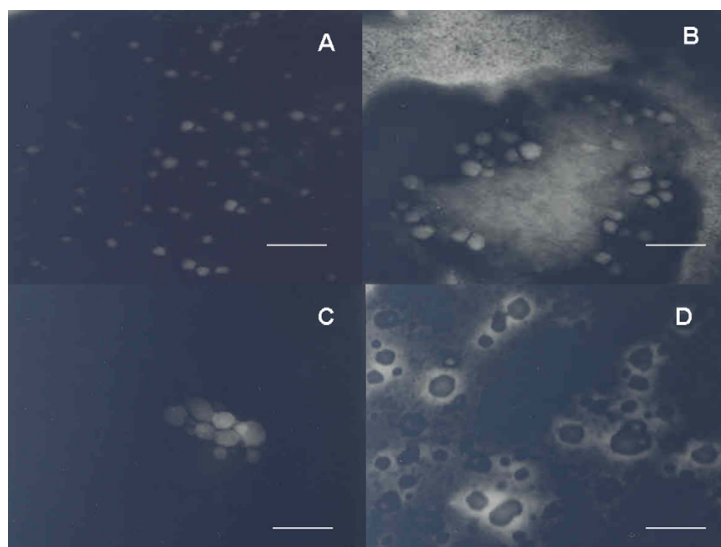


Fig. 2. Transmission electronic photomicrographs of loaded nanoemulsion formulations (50,000 \times magnification); (A) imipramine loaded nanoemulsion after 24 h; (B) doxepin loaded nanoemulsion after 24 h; (C) imipramine loaded nanoemulsion after 3 months; (D) doxepin loaded nanoemulsion after 3 months. Bar length 100 nm.

3.1.3. Stability of nanoemulsions

Centrifugation test showed that both nanoemulsions had good physical stability because no phase separation, creaming, cracking or precipitation signs were observed upon centrifugation.

The samples had been kept at room temperature protected from light during three month and nanoemulsion formulations were stable at ambient temperature in the presence or absence of imipramine and doxepine since there was no obvious change in visual appearance (phase separation or colour).

Parameters such as pH, viscosity, mean droplet size and polydispersity index were determined with the aim of checking the effect of passing time on the stability of nanoemulsions and no significant changes were observed.

TEM images obtained after 3 months storage did not reveal evident changes and the vesicles appeared as perfect round shape. Furthermore, no signs of drug precipitation were observed inferring the stability of nanoemulsions (Fig. 2C and D). Finally the drug contents in the loaded nanoemulsions were determined after storage period and these ranged between 85.7% and 97.34%.

3.2. Human skin penetration experiments

The transdermal permeation profiles of imipramine and doxepin through human skin from nanoemulsion were typical steady state profiles (Fig. 3). After a lag time of 1.52 h for imipramine nanoemulsion and 1.16 h for doxepine nanoemulsion a nearly linear relationship between cumulative amounts of drugs permeated versus time could be observed, indicating that the skin integrity was maintained throughout the experiment and the permeation rates were constants. As can be seen in Fig. 3, the mean profile of doxepine

nanoemulsion permeated versus time is greater than imipramine nanoemulsion. The calculated permeation parameters are presented in Table 3. The permeability coefficient (K_p) of doxepine was slightly higher than that for imipramine, but no statistical differences were exhibited ($p > 0.05$) between both values. Transdermal penetration is a multi factorial multi step process, in our study all factors are equals except physicochemical properties of the active substances. In this way, it has been widely reported the influence on skin permeability the partition coefficient ($\log P$) and molecular weight. There is a small difference in molecular weight between both molecules, and then partition coefficient (4.16 for imipramine

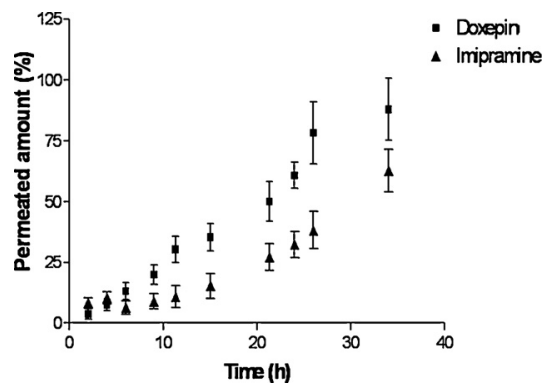


Fig. 3. Permeation profiles of imipramine loaded nanoemulsion and doxepin loaded nanoemulsion across human skin under ex vivo conditions (mean \pm SD, $n = 3$).

Table 3
Permeation parameters. Flux (J_s), permeation coefficient (K_p), lag time (T_l), partition parameter (P_1) and the diffusion parameter (P_2). Each value is the average of six different experiments \pm SD.

Nanoemulsion	J_s ($\mu\text{g}/\text{h cm}^2$)	K_p (cm/h)	T_l (h)	P_1 (cm)	P_2 (h^{-1})
Imipramine	1.61 \pm 0.20	$0.702 \times 10^{-4} \pm 0.32$	1.52 \pm 2.17	$0.49 \times 10^{-3} \pm 0.25$	0.143 \pm 0.57
Doxepin	2.74 \pm 0.14	$1.19 \times 10^{-4} \pm 0.22$	1.16 \pm 2.32	$1.08 \times 10^{-3} \pm 0.02$	0.112 \pm 0.10

and 3.86 for doxepin) could be a factor which influences the different value of K_p . Also these differences in topical permeation could be explained by the higher value of the P_1 parameter directly related to the membrane/donor phase partition coefficient. On the basis that both doxepin and imipramine may be accumulated in the droplets' aqueous phase due to the high water content of the vehicle, doxepin particularly because of its higher water solubility would be further solubilized than imipramine, then better J_s , K_p and P_1 parameters are expected. Once those drugs would cross the lipid structure of the stratum corneum would reach the viable epidermis, situated below the stratum corneum, which is much more aqueous in nature and contributes to a better permeation for doxepin. Then lag time (T_l) which is a permeation parameter depending mainly on the diffusivity of the drug through the skin with the lag time being reduced with increasing diffusivity, was shorter for doxepin, in this sense P_2 should be higher, but results showed a value of 0.112 h^{-1} versus 0.143 h^{-1} for imipramine. This event is not incoherent; often it is difficult to explain some differences as very little is known about the underlying principles of membrane flux variability [30].

Predicted plasma concentrations were obtained from Eq. (6). Taking into account a plasmatic clearance (Cl_p) of 1000 ml/min for imipramine and doxepin [31] moreover assuming a maximum area of a hypothetical area application of 16 cm^2 and using the J previously calculated (Table 3), the plasmatic concentration under steady-state conditions were calculated. After imipramine nanoemulsion topical application a median plasma level of 0.148 ng/ml was predicted to be reached. For doxepin nanoemulsion predicted plasmatic levels of a median value of 0.289 ng/ml. Small amounts of the topical dose applied are absorbed and serum concentrations are significantly below the therapeutic range for the treatment of depression (150–250 ng/ml) [31]. It seems that topically applied imipramine and doxepin is safe for a local effect, since the aim of the nanoemulsion vehicle is to increase the penetration through the stratum corneum into deeper layers of skin while avoiding systemic absorption. On the other hand, it must be taken into consideration the absence of dermal microcirculation in the *ex vivo* experiment studies, because might have hampered greater diffusion of imipramine and doxepin through lower layers into the receptor chamber.

3.3. Analgesic activity

The administration of imipramine and doxepin loaded nanoemulsions did not produce any systemic analgesia, since no differences with respect to the control group could be observed in the not administered paw (contralateral) of the animals. The

nanoemulsion applied to the ipsilateral paw increased significantly the PWT ($p < 0.005$). As shown in Table 4 the mean $\text{AUC}_{0-70} \pm \text{SD}$ values of paw withdrawal time versus time and the E_{max} represent a significant increase of 13.3% and 13.8% respectively when comparing imipramine loaded nanoemulsion versus control group, and a significant increase of 28.7% and 30.5% respectively when comparing doxepin loaded nanoemulsion versus control group. The greater analgesic activity was obtained after administration of subcutaneous doxepin with an increase in AUC_{0-70} and E_{max} of 98.7% and 85.1%, respectively. The current results suggest a higher analgesic effect of doxepin loaded nanoemulsion than imipramine loaded nanoemulsion after topical administration. That finding is in accordance with previous test whit the same drugs, where doxepin elicited longer duration of motor, proprioceptive and nociceptive blockade of sciatic nerve than imipramine after injection in rats [8]. Equally, other investigations stated that doxepin administered topically in rats caused dose-dependent analgesia [32].

Our results showed that the anaesthetic effect (as AUC) obtained after 0.150 mg/rat subcutaneous imipramine was greater than after 6 mg/rat of topical imipramine. In the same way the anaesthetic effect obtained after 0.150 mg/rat subcutaneous doxepin was greater than after 6 mg/rat of topical doxepin. Thus the bioavailability of topical imipramine and doxepin from nanoemulsions is much below of that obtained after subcutaneous administration as expected. But T_{max} is not significantly different after nanoemulsion application and subcutaneously applied imipramine. It is likely that after applying the nanoemulsion to a large skin surface (sole and palm of paw) the drug, when released, rapidly reaches the free nerve endings of pain localized just beneath the epidermis. This permeation was also favoured by small particle size in the disperse phase, since vehicle passed through the narrow ($\leq 30 \text{ nm}$) intercellular passages (virtual pores) in the outer skin layers [33]. Thus, both the drug released from the nanoemulsion and that administered directly to the hypodermis can reach mechanoreceptors at an equal rate.

In the case of doxepin the T_{max} is significantly less for drug administered directly by injection. During the experiment performance, when doxepin solution was administrated by injection, the maximum effect was quickly observed and maintained during all the experiment. It may be hypothesized that this T_{max} difference between drug solution injection and drug loaded nanoemulsion could be due to a strong analgesic effect of doxepin, because taking into account the permeation studies results; doxepin loaded nanoemulsion should reach its maximum effect at least at the same time that imipramine loaded nanoemulsion, as it is reflected in Table 4 showing accordance between permeation studies and

Table 4
Analgesic effect. Results are mean \pm SD of 4 rats. AUC_{0-70} : area under curve of paw withdrawal time (s) vs. time (1–70 min); E_{max} : maximum analgesic effect; and T_{max} : the time of maximum effect (min) after application.

	Imipramine			Doxepin		
	AUC_{0-70} , min/s	E_{max} , s	T_{max} , min	AUC_{0-70}	E_{max} , s	T_{max} , min
Control group	629.9 \pm 13.7	10.8 \pm 2.3	–	629.9 \pm 13.6	10.8 \pm 2.3	–
Drug solution 0.150%	1044 \pm 12.1 ^a	19.2 \pm 2.9 ^a	17.4 \pm 2.3	1251.7 \pm 40.5 ^a	19.8 \pm 0.2 ^a	3.0 \pm 0
Nanoemulsion	713.7 \pm 23.5 ^{ab}	12.3 \pm 2.7 ^{ab}	20.3 \pm 4.2	810.9 \pm 50.1 ^{ab}	14.1 \pm 3.9 ^{ab}	20.1 \pm 2.5 ^b

^a $p < 0.05$ compared with saline (control).

^b $p < 0.05$ compared with solution drug injection.

Table 5

Anti-allodynic effect. Results are mean \pm SD of 4 rats. AUC_{0-70} : area under curve of the difference in grams of force required to elicit paw withdrawal time after treatment and the paw withdrawal time before treatment vs. time (1–70 min); E_{max} : maximum anti-allodynic effect; and T_{max} : the time of maximum effect (min) after application.

	Imipramine			Doxepin		
	AUC_{0-70} , min/g	E_{max} , g	T_{max} , min	AUC_{0-70}	E_{max} , g	T_{max} , min
Control group	11.3 \pm 2.8	0.3 \pm 0.4	–	11.3 \pm 2.8	0.3 \pm 0.4	–
Drug solution 0.150%	697.1 \pm 46.2 ^a	14.2 \pm 0.9 ^a	12.5 \pm 1.5	1437.5 \pm 92.7 ^a	28.6 \pm 2.3 ^a	10.0 \pm 2.5
Nanoemulsion	116.6 \pm 32.6 ^{a,b}	3.6 \pm 1.6 ^{a,b}	22.3 \pm 12.5 ^b	388.8 \pm 34.3 ^{a,b}	9.6 \pm 0.6 ^{a,b}	20.5 \pm 12.5 ^b

^a $p < 0.05$ compared with saline (control).

^b $p < 0.05$ compared with solution drug injection.

in vivo studies, but imipramine has not a powerful effect as doxepin, so imipramine T_{max} is equal between its both formulations and T_{max} is different between both doxepin formulations.

3.4. Anti-allodynic effect

Tactile allodynia was clearly developed in carrageenan oedema-tous paws. The mean reaction time was 5.56 \pm 0.5 s and 24.17 \pm 0.7 s for ipsilateral inflamed and contralateral healthy paws, respectively. No systemic absorption was observed, particularly after subcutaneous imipramine or doxepin administration because there were no increases in pain thresholds to touch in the contralateral paw. The observed anti-allodynic activity of imipramine loaded nanoemulsion was very low (Table 5), almost inexistent, with a maximum anti-allodynic effect (in terms of grams of force) of 3.6 g. These values represent a significant decrease 190% when comparing with doxepin in the nanoemulsion vehicle. These results are in accordance with the observed activity of subcutaneous solutions of the actives, subcutaneous doxepin showed an increase of anti-allodynic activity versus imipramine of 106.2% in terms of AUC.

Doxepin loaded nanoemulsion neither reached a strong activity, when comparing with that obtained with the hypodermic administered solution only a 33.5% is achieved in terms of E_{max} . These results, compared with those of the antinociceptive experiments are less promising, because in the last mentioned, nanoemulsions exhibited analgesic effects closer to those obtained for drug solution injection, which led us to think that the two kinds of pain tested in this study do not appear to share a common pattern. Noxious thermal stimuli are thought to be mediated through high-threshold, thin myelinated primary afferent C-fibres, whereas non-noxious tactile stimulation is believed to be mediated through large diameter, low-threshold A beta afferent fibres, and processed at supraspinal sites receiving input through the dorsal column [34].

Taking into account all previous results, it could be hypothesized that doxepin loaded nanoemulsion could be indicated as a promising analgesic agent in experimental preclinical and clinical studies with some ant-allodynic activity.

4. Conclusions

The discomfort resulting from local infiltration and short duration of analgesic effects of local anaesthetic agents has stimulated research into developing dermatological formulations for skin application. Recently, many studies have focused on using nanoemulsions for various therapeutic delivery applications. In this study new oil in water nanoemulsion for the transdermal delivery of imipramine and doxepin have been developed and characterized. The best formulation consisted of 45% aqueous phase, 40% mixed surfactants and 15% oil phase.

Equally *in vitro* studies were performed to evaluate permeation behaviour and predict plasma concentrations concluding that topically applied imipramine and doxepin loaded nanoemulsion

were safe for a local effect. Similarly, the *in vivo* analgesic and anti-allodynic activity was evaluated being stronger for doxepin. This study demonstrated that nanoemulsion formulation containing doxepin could be promising as an alternative analgesic therapy.

Acknowledgements

The authors would like to thank to Gattefossé for kindly supplying the samples of surfactants used in this study, and Hospital Barcelona-SCIAS (Barcelona, Spain) for providing skin samples.

References

- [1] J.A. Mico, D. Ardid, E. Berrocoso, A. Eschalier, Trends Pharmacol. Sci. 27 (2006) 348–354.
- [2] S.B. McMahon, M. Koltzenburg, Wall and Melzack's Textbook of Pain, Elsevier, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2006.
- [3] J. Sawynok, Pharm. Res. 55 (2003) 1–20.
- [4] M.B. Max, M. Culnane, S.C. Schafer, R.H. Gracely, D.J. Walther, B. Smoller, R. Dubner, Neurology 37 (1987) 589–596.
- [5] M.J. Esser, J. Sawynok, Eur. J. Pharmacol. 399 (2000) 131–139.
- [6] S.H. Sindrup, T.S. Jensen, Pain 83 (1999) 389–400.
- [7] J. Sawynok, M.J. Esser, A.R. Reid, J. Psychiatry Neurosci. 26 (2001) 21–29.
- [8] Y. Sudoh, E.E. Cahoon, P. Gerner, G.K. Wang, Anesthesiology 103 (2003) 49–55.
- [9] A. Haderer, P. Gerner, G. Kao, V. Srinivasa, G.K. Wang, Anesth. Analg. 96 (2003) 1707–1710.
- [10] M.B. Brown, G.P. Martin, S.A. Jones, F.K. Akomeah, Drug Deliv. 13 (2006) 175–187.
- [11] H.A.E. Benson, Curr. Drug Deliv. 2 (2005) 23–33.
- [12] F. Shakeel, W. Ramadan, Colloid Surf. B: Biointerfaces 75 (2010) 356–362.
- [13] A. Divsalar, A.A. Saboury, M. Nabiuni, Z. Zare, M.E. Kefayati, A. Seyedarabi, Colloid Surf. B: Biointerfaces 98 (2012) 80–84.
- [14] R.R. Gupta, S.K. Jain, M. Varshney, Colloid Surf. B: Biointerfaces 41 (2005) 25–32.
- [15] Council Regulation (EC) No 440/2008, Test Guideline for Skin Absorption: in vitro Method (B.45), J. Eur. Union (2008) 438–443.
- [16] F. Netzlauff, K.H. Kostka, C.M. Lehr, U.F. Schaefer, Eur. J. Pharm. Biopharm. 63 (2006) 44–50.
- [17] W.R. Malfara, C. Bertucci, M.E. Costa, S.A. Dreossi, M.L. Pires, E.J. Cesarino, J.A. Crippa, R.H. Costa, J. Pharm. Biomed. Anal. 44 (2007) 955–962.
- [18] European Medicine Agency (EMA), Guideline on Validation of Bioanalytical Methods, Document Reference EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, EMA, London, 2011.
- [19] M. Zimmermann, Pain 16 (1983) 109–110.
- [20] K. Hargreaves, R. Dubner, B. Brown, C. Flores, J. Joris, Pain 32 (1988) 77–88.
- [21] J.N.S. Matthews, D.G. Altman, M.J. Campbell, P. Royston, Br. Med. J. 300 (1990) 230–235.
- [22] L. Djekic, M. Primorac, Int. J. Pharm. 352 (2008) 231–239.
- [23] X. Zhao, J.P. Liu, X. Zhang, Y. Li, Int. J. Pharm. 327 (2006) 58–64.
- [24] A. Kogan, N. Garti, Adv. Colloid Interface Sci. 123–126 (2006) 369–385.
- [25] E. Escribano, A.C. Calpena, J. Queralt, R. Obach, J. Domenech, Eur. J. Pharm. Sci. 19 (2003) 203–210.
- [26] S.K. Rastogi, J. Singh, J. Pharm. Dev. Technol. 10 (2005) 97–104.
- [27] G. Pennick, S. Harrison, D. Jones, A.V. Rawlings, Int. J. Cosmet. Sci. 32 (2010) 304–312.
- [28] M.B. Delgado-Charro, G. Iglesias-Vilas, J. Blanco-Mendez, M.A. Lopez-Quintela, J.P. Marty, R.H. Guy, Eur. J. Pharm. Biopharm. 43 (1997) 37–42.
- [29] Okur, S. Apaydin, N.U.K. Yavasoglu, A. Yavasoglu, H.Y. Karasulu, Int. J. Pharm. 416 (2011) 136–144.
- [30] E. Limpert, W.A. Stahel, M. Abbt, Bioscience 51 (2001) 341–352.
- [31] L. Ereshesky, T. Tran-Johnson, C.M. Davis, A. LeRoy, Clin. Chem. 34 (1988) 863–880.
- [32] P. Gerner, V. Srinivasa, A.M. Zizza, Z.Y. Zhuang, S.H. Luo, D. Zurakowski, S. Eappen, G.K. Wang, Anesth. Analg. 102 (2006) 283–287.
- [33] G. Cevc, Adv. Drug Deliv. Rev. 56 (2004) 675–711.
- [34] J. Tian, Y. Gu, D. Su, Y. Wu, X. Wang, Eur. J. Pain 13 (2009) 130–137.

3.4- RESUMEN SEGUNDO ARTÍCULO

Para evaluar la absorción percutánea de moléculas y evitar el sacrificio innecesario de animales, se ha propuesto la utilización de la mucosa bucal porcina para la realización de estudios ex vivo de permeabilidad.

Dada la dificultad de obtener mucosa bucal fresca cuando se necesita, se procede a su congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C), no siendo siempre factible este procedimiento.

Una alternativa más barata y más simple consiste en congelar la mucosa bucal de cerdos recién sacrificados en un congelador mecánico, utilizando DMSO y albúmina como agentes crioprotectores. Este estudio comparó los parámetros ex vivo de permeabilidad de clorhidrato de propranolol a través de la mucosa bucal porcina, tanto fresca como congelada, utilizando el sistema de células de difusión de Franz y HPLC como método de detección. Se realizaron estudios histológicos y se evaluaron los efectos de la congelación sobre los parámetros de la permeabilidad del fármaco.

Además, se utilizó como un indicador de la integridad de la mucosa bucal, el parámetro de la pérdida de agua transmucosa (TMWL) tal como se evalúa del mismo modo la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) parámetro utilizado para medir la integridad de la piel.

Los resultados no mostraron diferencias entre la mucosa fresca y congelada en el flujo, en el coeficiente de permeabilidad y en el tiempo de latencia.

Sin embargo, se observó una diferencia estadísticamente significativa en la medición del TMWL entre mucosa fresca y congelada.



An improved cryopreservation method for porcine buccal mucosa in *ex vivo* drug permeation studies using Franz diffusion cells



Sonia Amores^a, José Domenech^a, Helena Colom^a, Ana C. Calpena^a, Beatriz Clares^{b,*}, Álvaro Gimeno^c, Jacinto Lauroba^a

^a Department of Biopharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

^c Animal Facility, Bellvitge Health Sciences Campus, University of Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 December 2013

Received in revised form 21 April 2014

Accepted 26 April 2014

Available online 9 May 2014

Keywords:

Buccal drug delivery

In vitro models

Cryopreservation

Permeability

Diffusion

Transmucosal water loss

ABSTRACT

The use of isolated animal models to assess percutaneous absorption of molecules is frequently reported. The porcine buccal mucosa has been proposed as a substitute for the buccal mucosa barrier on *ex vivo* permeability studies avoiding unnecessary sacrifice of animals. But it is not always easy to obtain fresh buccal mucosa. Consequently, human and porcine buccal mucosa is sometimes frozen and stored in liquid nitrogen, but this procedure is not always feasible. One cheaper and simpler alternative is to freeze the buccal mucosa of freshly slaughtered pigs in a mechanical freezer, using DMSO and albumin as cryoprotective agents. This study compared the *ex vivo* permeability parameters of propranolol hydrochloride through porcine buccal mucosa using a Franz diffusion cell system and HPLC as detection method. The freezing effects on drug permeability parameters were evaluated. Equally histological studies were performed. Furthermore, the use of the parameter transmucosal water loss (TMWL) as an indicator of the buccal mucosa integrity was evaluated just as transepidermal water loss (TEWL) is utilized for skin integrity. The results showed no difference between fresh and frozen mucosal flux, permeability coefficient or lag time of propranolol. However, statistical significant difference in TMWL between fresh and frozen mucosa was observed.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, most biopharmaceutical and pharmacokinetic research has focused either on the use of new routes for drug administration or on new drug delivery systems, with the aim of obtaining improved therapeutic activity, fewer adverse effects or better patient compliance (Holm et al., 2013).

Owing to the ease of the administration, the oral cavity is an attractive site for the delivery of drugs. Through this route it is possible to realize mucosal (local effect) and transmucosal (systemic effect) drug administration (Schwarz et al., 2013). The buccal mucosa appears to be better in terms of permeability, surface area, compliance, etc., when compared to the other mucosal and transdermal routes of delivery (Kulkarni et al., 2010).

Drug delivery in the oral cavity is a logical alternative delivery route for drugs which undergo extensive degradation in the stom-

ach and the liver. Three types of oral mucosa can be found in the oral cavity. The lining mucosa (60%), the masticatory mucosa (25%) and the specialized mucosa (15%), all these represent an available surface of 170 cm² for drug absorption, of which ~50 cm² represents non-keratinized tissues (Patel et al., 2011). The permeability of buccal mucosa is between 4 and 4000 times greater than that of skin. As a result, faster onset of action for several drugs has been observed (Galey et al., 1976).

Permeation experiments are a valuable adjunct to *in vivo* percutaneous absorption studies, and provide a convenient means for evaluating the permeation characteristics of drugs (Bronaugh and Maibach, 1991). A variety of passive diffusion systems for *in vitro* permeation experiments have been developed for use with different kinds of membranes. For *in vitro* transdermal studies, Franz diffusion cells are perhaps the most commonly used setups. Human buccal mucosa is scarcely available, thus most research efforts relied on the use of isolated animal buccal tissue. *In vitro* and *ex vivo* methods have been helpful for preclinical drug screening as well as elucidating mechanisms of transport across the buccal mucosa, or even evaluation of potential chemical penetration enhancers (Nicolazzo and Finnin, 2008).

* Corresponding author. Address: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de la Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain. Tel.: +34 958 243904; fax: +34 958 248958.

E-mail address: beatrizclares@ugr.es (B. Clares).

When compared to the other animal models, porcine buccal mucosa has been considered the most representative model for human tissue due to its close resemblance to human buccal mucosa in ultra-structure (non-keratinised) and enzyme activity (Diaz-del Consuelo et al., 2005; Fernández-Campos et al., 2012).

Since it is not always practical to perform permeability experiments within hours of receiving tissue, once obtained the porcine buccal mucosa, conditions of storage play an important role, it is necessary to be able to bank buccal mucosa. The most significant question concerning the use of animal tissue in such a manner is the viability and integrity of the dissected tissue (Patel et al., 2011).

One method for achieving this has been to collect human and porcine buccal mucosa in liquid nitrogen and to store it for later use (Veuillez et al., 2002; Van Eyk and Van der Bijl, 2006). However, the liquid nitrogen procedure is not always feasible. Other storage conditions such as phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 (4 °C), dry wrapped in aluminium (–20 °C) or cryoprotected in 20% glycerol solution (–20 °C) for either 6, 24 or 48 h resulted in loss of epithelial integrity (Patel et al., 2011).

An alternative method consisting of PBS mixture containing 4% albumin and 10% DMSO, which has been used to date for freezing of living cells (Galmes et al., 2007; Rowley et al., 1994) was evaluated in the current study. Porcine buccal mucosa was placed in containers with cryoprotective agents, and frozen in the same mechanical freezer. This procedure is both cheaper and simpler, and it avoids the possible contamination associated with the use of nitrogen tanks (Tedder et al., 1995).

Fluorescein isothiocyanate has been established as an integrity marker for porcine buccal mucosa, whilst transepidermal water loss (TEWL) has been used to monitor skin integrity (Netzlaff et al., 2006; Sierra et al., 2013). TEWL has also been used to measure water loss in human nasal mucosa (Miwa et al., 2006). The possibility of using transmucosal water loss (TMWL) to monitor porcine buccal mucosa integrity was investigated. Propranolol (PP) was used as a drug model for buccal delivery because (i) is a potent drug, (ii) medium apparent aqueous solubility (Yang and Fassihi, 1997), (iii) first past metabolism after oral administration (Lalka et al., 1993) and (iv) suitable for pH-dependent absorption studies as PP is a secondary amine, with a pK_a value around 9.53 (Wishart et al., 2008).

The aim of the current research was to study PP permeability and porcine buccal mucosa integrity by comparing the following biopharmaceutical parameters: flux, permeability coefficient, lag time and TMWL using fresh or frozen porcine buccal mucosa from the same subject.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Propranolol hydrochloride was obtained from Acofarma (Terrassa, Spain). Hank's balanced salt solution (HBSS) (Composition in g/L: $CaCl_2 = 0.14$; $KCl = 0.14$; $KH_2PO_4 = 0.06$; $MgSO_4 = 0.1$; $MgCl_2 = 0.1$; $NaCl = 8.0$; $NaHCO_3 = 0.35$; $Na_2HPO_4 = 0.09$; Glucose = 1) was obtained from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). PBS was obtained from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain). Albumin solution 4% was obtained from Laboratorios Grifols (Barcelona, Spain). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was supplied by Merck Lab. (Madrid, Spain). Acetonitrile, acetic acid, sodium phosphate and potassium phosphate were purchased from Panreac Química (Barcelona, Spain). All chemicals were analytical grade and were used without further purification.

2.2. Preparation of the porcine buccal mucosa

The studies were conducted under a protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of

Barcelona (Spain) and the Committee of Animal Experimentation of the regional autonomous government of Catalonia (Spain). 3–4-month-old female pigs were used ($n = 15$). The porcine buccal mucosa was obtained immediately after the pigs had been slaughtered in the Animal Facility at Bellvitge Campus (University of Barcelona, Spain). The animals were slaughtered using an overdose of sodium thiopental anaesthesia. For these studies, both fresh and frozen porcine buccal mucosa utilized came from the same subject, to minimize variability. In this study, 27 replications for the fresh and 22 replications for the frozen buccal mucosa of 15 pigs were carried out.

The fresh buccal tissues were transferred from the hospital to the laboratory in containers filled with Hank's liquid. The other buccal tissues were frozen at the Animal Facility by placing them in containers with a PBS mixture containing 4% albumin and 10% DMSO (as cryoprotective agents) and stored (for a maximum of 1 month) at –80 °C in a mechanical freezer. These buccal specimens were subsequently placed in containers with Hank's liquid and transferred from the Animal Facility to the laboratory. DMSO produces adverse effects at room temperature; therefore, the addition of DMSO prior to freezing was performed at 4 °C, whilst thawing involved immersion in a water bath filled with PBS at 37 ± 1 °C and gentle shaking for 30 min, until total elimination of DMSO was achieved (Rowley et al., 1994).

2.3. TMWL measurement

Prior to placing the solution in question in the Franz cell donor compartment, TMWL (expressed in grams per square meter and hour) was measured *in vitro* to confirm the physical integrity of the buccal mucosa. Before collecting the porcine buccal mucosa, TMWL was measured *in vivo* in recently anesthetized pigs (to avoid salivation loss), obtaining a maximum value of 30 g/h m². This value was chosen as cut-off point. Each measure was performed in triplicate using a DermaLab® module (Cortex Technology, Hadsund, Denmark) by placing the metering device perpendicular to the surface of the tissue and reaching a stable TMWL reading in 60 s approximately. TMWL is defined as the measurement of the quantity of water that passes from inside the body through the epidermal layer of the skin or the outer layer of the mucosa to the surrounding atmosphere via diffusion and evaporation processes (Netzlaff et al., 2006).

2.4. Franz diffusion cell experiments

Different areas of porcine buccal mucosa have different pattern of permeability, there is significantly higher permeability in the region behind the lips in comparison to cheek region, because in porcine buccal mucosa, the epithelium acts as a permeability barrier, and the thickness of the cheek epithelium is greater than that of the region behind the lips (Harris and Robinson, 1992). For the permeation studies, the fresh or frozen porcine buccal mucosa from the same area was cut to 500 ± 50 μ m thick sheets, which contributes to the diffusional barrier (Sudhakar et al., 2006), were obtained using an electric dermatome (model GA 630, Aesculap, Tuttlingen, Germany) and trimmed with surgical scissors in adequate pieces. All devices utilized were previously sterilized. The majority of the underlying connective tissue was removed with a scalpel. The tissue handling was done by following basic safety standards for protection against possible exposure to pathogens.

Then membranes were then mounted in specially designed membrane holders with a permeation orifice diameter of 9 mm (diffusion area 0.63 cm²). Using the membrane holder, each porcine buccal membrane was mounted between the donor (1.5 mL) and the receptor (6 mL) compartments with the epithelium faced the donor chamber and the connective tissue region facing the

receiver of static Franz-type diffusion cells (Vidra Foc, Barcelona, Spain) avoiding bubbles formation.

Experiments were performed using PP, which has lipophilic characteristics ($\log P = 1.16$; *n*-octanol/PBS, pH 7.4), ionisable ($pK_a = 9.50$) and a MW = 259.3 g/mol, as a model drug (Modamio et al., 2000).

Infinite dose conditions were ensured by applying 300 μL as a donor solution of a saturated solution of PP ($C_0 = 588005 \pm 5852 \mu\text{g/mL}$ at $37 \pm 1^\circ\text{C}$, $n = 6$), in PBS (pH 7.4) into the receptor chamber and sealed by Parafilm® immediately to prevent water evaporation.

Prior to conducting the experiments, the diffusion cells were incubated for 1 h in a water bath to equalize the temperature in all cells ($37 \pm 1^\circ\text{C}$). Each cell contained a small Teflon coated magnetic stir bar which was used to ensure that the fluid in the receptor compartment remained homogenous during the experiments. Sink conditions were ensured in all experiments after initial testing of PP saturation concentration in the receptor medium.

Samples (300 μL) were drawn via syringe from the centre of the receptor compartment at the following time intervals: 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h. The removed sample volume was immediately replaced with the same volume of fresh receptor medium (PBS; pH 7.4) with great care to avoid trapping air beneath the dermis. Cumulative amounts of the drug (μg) penetrating the unit surface area of the mucosa membrane (cm^2) were corrected for sample removal and plotted versus time (h). The diffusion experiments were carried out 27 times for the fresh and 22 times for the frozen buccal mucosa.

2.5. Data analysis

2.5.1. Determination of flux and lag times

The steady state flux ($\mu\text{g/h/cm}^2$) of PP through buccal mucosa (fresh or frozen) was calculated from the linear portion slope of the cumulative amount permeated versus time plots. Lag time (T_L) was estimated from the intersection of the line from the estimated flux with the time axis. The permeability coefficient (K_p) can be calculated as:

$$J = C_0 \times K_p \quad (1)$$

where J is the flux in steady state and C_0 is the initial concentration of the drug in the donor compartment. Twenty-seven replications with fresh and 22 replications with frozen mucosa from 15 pigs were carried out.

When examining the fundamental permeation behaviour of a material, steady state flux data are usually obtained by application of an infinite dose to the tissue surface (Boix et al., 2005). In general terms, when an infinite dose is applied to the tissue it is inherently assumed that there is no change in drug concentration (or more accurately in its thermodynamic activity) during the experiment. Therefore, a saturated solution of PP was used to obtain maximal thermodynamic activity of the drug. The permeant concentration in the donor phase does not fall by more than 10% from saturation during the experimental period (Williams, 2003).

2.5.2. Theoretical systemic concentration of drug

The potential systemic capacity after buccal mucosa administration can be predicted by the theoretical human plasmatic steady-state concentration (C_{ss}), using the following equation (Guy and Hargraft, 1987):

$$C_{ss} = S \times J / Cl_p \quad (2)$$

where J is the flux determined in this study, S is the assumed surface area of application in the buccal mucosa *in vivo* and Cl_p is the human plasmatic clearance.

2.6. Histological studies

Histomorphological analyses were performed to evaluate the potential changes occurring in the tissue morphology of fresh (used as control) and frozen porcine buccal mucosa stored in PBS mixture containing 4% albumin and 10% DMSO for 1 month at -80°C in a mechanical freezer. For analysis the epithelial tissues were fixed in 10% neutral-buffered formalin for 2 h, washed in water for 1 h, dehydrated in graded ethanol (60%, 80%, 90%, 95%, and 100%) and, after permeation in xylene, embedded in paraffin using the standard procedures. Formalin-fixed, paraffin-embedded samples were cut in 4- μm -thick sections on a microtome with a disposable blade and conventionally stained with hematoxylin-eosin. Samples were then examined by light microscope Olympus BX40 camera Olympus SC35 (Tokyo, Japan) under 40 \times magnification.

2.7. Analytical method

All samples were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) system consisting of a Waters 515 pump (Waters, Milford, MA, USA) with UV-VIS 2487 detector (Waters, Milford, MA, USA) set at 280 nm (λ_{max}). An Atlantis 5 μm reversed phase C18 column (4.6 \times 150 mm) was used to analyze PP with a mobile phase of an ammonium acetate buffer (pH 6.5) and acetonitrile (75:25) at a flow rate of 1 mL/min. Retention time was 5.0 min. The concentration range was between 0.37 and 30 $\mu\text{g/mL}$. The coefficient of variation ranged between 3.64% and 7.28% and accuracy ranged between 0.012 and 1.81. Analytical sensitivity was 0.20 $\mu\text{g/mL}$. A representative PP chromatogram is shown in Fig. 1.

2.8. Statistical analysis

In studies of this kind, it is advisable to perform statistical studies via nonparametric methods (Williams et al., 1992). However, since the present study considered two variables (fresh and frozen mucosa) when the same number of replications were not available for each type of mucosa (due to a failure in mucosa integrity), a two-way ANOVA was performed, where the rank-transformed parameter values were taken as dependent variables, mucosa status (fresh or frozen) as a fixed factor and the animal as a random factor. The parameter values estimated for both fresh and frozen mucosa were statistically compared by means of a nonparametric test (Mann Whitney test). Statistical analysis was performed using the SPSS statistical software package v12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A significance level of $p < 0.05$ was adopted in all cases.

3. Results and discussion

3.1. Porcine buccal mucosa stored in cryoprotective agents

The most widely used cryoprotectant for living cells is DMSO, which is a hygroscopic polar compound originally developed as a solvent for chemicals. Its properties were first described in 1959 (Lovell and Bishop, 1959). However, we were unable to find a paper reporting storage of porcine buccal tissue using DMSO as an intracellular cryoprotectant. Therefore, porcine buccal mucosa was placed in containers filled with a PBS mixture containing 10% DMSO and 4% albumin (extracellular cryoprotectant) and frozen at -80°C in a mechanical freezer (for a maximum of 1 month), which is a cheap and simple method to avoid the possible contamination associated with the use of nitrogen tanks (Tedder et al., 1995). DMSO acts by penetrating the cell and binding water molecules. In so doing, it blocks the efflux of water and prevents cellular dehydration, maintaining stable pH and intracellular salt concentration, and preventing formation of the ice crystals (Schaefer and Dicke, 1973).

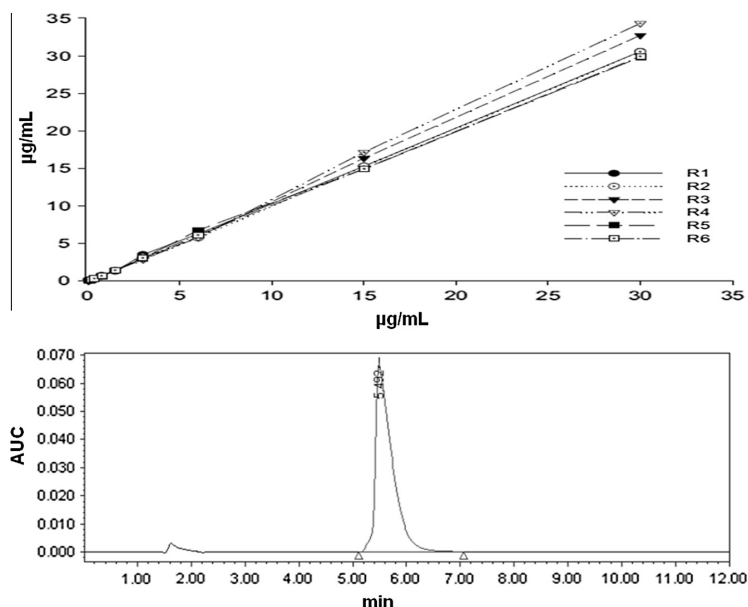


Fig. 1. Propranolol chromatogram (15 µg/mL) and calibration curves of propranolol stock solutions in the experimental range.

When the tissue undergoes freezing process in an uncontrolled manner, ice crystals are formed within the tissue, which could damage the intracellular matrix and cell membrane, altering the barrier properties of these tissues (Hadzija et al., 1992). It has been reported that a superficial desquamation was observed in the frozen tissues (Caon and Simões, 2011).

3.2. TMWL measurement

An established method employed to assess the intactness of the skin barrier function is the assessment of TEWL. Similarly it can be also used to confirm an intact mucosal barrier function and to monitor the defrosting process. The results obtained in this study show significant differences ($p > 0.05$) between TMWL values for fresh and frozen mucosa (Table 1). However, results obtained for fresh and frozen mucosa show relative uniformity. The values obtained from TMWL measurements of frozen buccal mucosa are higher than those obtained for fresh buccal mucosa but both have values below 30 g/h m² being considered acceptable for the integrity of the buccal mucosa (individual measurements are provided as Supplementary data). Differences in TMWL between frozen and fresh tissue may not necessarily be correlated with the permeation data *ex vivo* as observed in this study.

3.3. Evaluation of the *ex vivo* mucosa diffusion experiments

The solubility of PP in the buffer pH 7.4 remained constant throughout all experiments. These results indicate, firstly, that

Table 2

Values of cumulative amounts (µg) of propranolol permeated over time obtained through fresh mucosa ($n = 27$) and frozen mucosa ($n = 22$). Values are presented as median, minimum and maximum, and dispersion factor (DF50).

Time (h)	Median	Minimum	Maximum	DF50
<i>Fresh mucosa</i>				
0.25	10.0	0.01	113.0	27.3
0.5	28.1	0.8	697.1	48.4
1	125.0	17.7	916.2	175.9
2	461.3	60.2	2236.0	571.9
3	993.7	119.0	3538.1	991.6
4	1616.5	196.8	5277.2	1216.1
5	2224.1	280.8	6376.4	1351.3
6	2623.7	377.9	7586.6	1630.2
<i>Frozen mucosa</i>				
0.25	13.7	4.6	678.5	13.9
0.5	40.9	9.0	704.4	65.4
1	158.3	19.2	634.1	202.8
2	466.8	17.2	1370.2	532.9
3	937.4	74.0	2517.5	674.1
4	1398.1	250.5	3280.9	691.7
5	1989.5	840.8	4195.0	879.8
6	2455.3	982.5	4585.2	1093.2

the ionized and non-ionized fractions remain fairly constant and, secondly, that the value of the initial drug concentration (C_0) remains constant.

Individual values of the cumulative amounts of PP permeated versus time obtained across fresh or frozen porcine buccal mucosa

Table 1
Summary of permeation parameter values of propranolol. Flux (J), permeability coefficient (K_p), lag time (T_L) and transmucosal water loss (TMWL) values obtained through fresh and frozen buccal mucosa. Values are presented as median and minimum and maximum values in parenthesis.

	Parameters			
	J (µg/h cm ²)	$K_p \times 10^2$ (cm/h)	T_L (h)	TMWL* (g/h m ²)
Fresh mucosa	571.3 (72.47–1249)	0.828 (0.109–1.683)	0.904 (0.095–1.805)	10.10 (2.50–25.50)
Frozen mucosa	434.9 (171.4–933.6)	0.735 (0.423–1.739)	0.823 (0.021–2.689)	21.80 (11.70–28.30)

* Statistically significant differences ($p < 0.05$) between fresh and frozen mucosa.

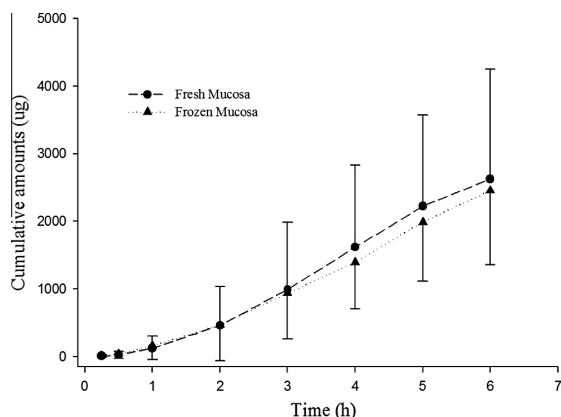


Fig. 2. Values of cumulative amounts of propranolol permeated over time through fresh ($n = 27$) and frozen ($n = 22$) porcine buccal mucosa. Values are presented as median and DF50.

are given in [Supplementary information](#). Values presented as median, maximum, minimum and dispersion factor (DF50) for fresh and frozen mucosa are shown in [Table 2](#). In this study, 27 replications for the fresh and 22 replications for the frozen buccal mucosa of 15 pigs were carried out. Graphic representations of the individual cumulative amounts of PP permeated versus time obtained from fresh and frozen porcine buccal mucosa are provided in [Supplementary information](#). Values of cumulative amounts of PP permeated over time through buccal mucosa presented as median and DF50 are shown in [Fig. 2](#).

The difference between the curves for different diffusion cells increases over time. To a certain extent, this is due to natural variations in barrier permeability between mucosa specimens, leading to slight differences in the slopes of the experimental curves ([Kulkarni et al., 2010](#)). Hence, median data points at the end of the experiments have a higher DF50 than data points at earlier times (until 3 h).

3.4. Parameters obtained from fresh or frozen mucosa

To determine K_p and T_L , a linear fit of the single curves was performed. For all linear analyses, the regression coefficients (r), were invariably high, and usually exceeded 0.89 (data not shown). The median values of K_p were 0.828×10^2 cm/h for fresh mucosa and 0.735×10^2 cm/h for frozen mucosa. The median values of T_L to reach steady state were different, 0.904 h (54 min) for fresh mucosa and 0.823 h (49 min) for frozen mucosa ([Table 1](#)). The T_L is relatively short, indicating that the rate of PP permeation through fresh or frozen buccal mucosa is adequate.

The median J of PP was found to be between 571.3 and 434.9 $\mu\text{g}/\text{h cm}^2$ respectively, for fresh and frozen mucosa from the same subject. From these results it was possible to obtain reliable flux values of PP and a good representation of the permeation process.

No statistically significant differences ($p < 0.05$) among K_p , T_L or J values of PP permeation through fresh and frozen porcine buccal mucosa were found ([Table 1](#)).

The results indicate that this method does not influence biopharmaceutical parameters of permeability across frozen porcine buccal mucosa from the same subject.

Valuation about theoretical C_{ss} was performed assuming an mucosa surface application area of 9 cm^2 and Cl_p of 60 L/h for PP ([Riddell et al., 1987](#)). Using the median J obtained of 517.3 $\mu\text{g}/\text{h cm}^2$ (fresh mucosa) or 434.9 $\mu\text{g}/\text{h cm}^2$ (frozen mucosa) ([Table 1](#)), PP C_{ss} values of 0.077 (fresh mucosa) and 0.065 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (frozen mucosa) were obtained.

3.5. Histological studies

Structural similarities between fresh and frozen buccal mucosa tissues were shown ([Fig. 3](#)) with a stratified squamous epithelium supported by a fibrous connective tissue (lamina propria and submucosa). A superficial desquamation was also observed in the frozen tissues ([Fig. 3B](#)), but no severe cytopathic effects were found in frozen sample (alterations in cell morphology or epithelium structure).

The collected data suggested that frozen buccal mucosa stored in PBS mixture containing 10% DMSO and 4% albumin did not affect

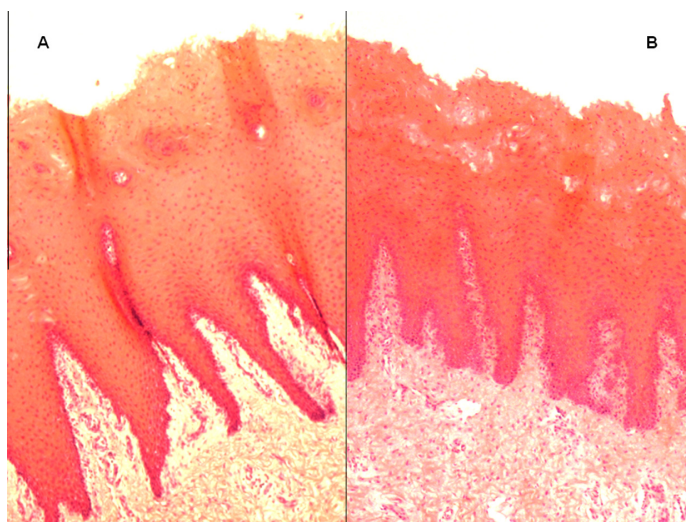


Fig. 3. Microphotographs of formalin-fixed paraffin embedded cross-sections of porcine buccal mucosae. Fresh (A) and after freezing process (B). Magnification 40 \times .

the barrier permeability properties corroborating the *ex vivo* permeation results.

4. Conclusion

A study was conducted of freezing porcine buccal mucosa, using DMSO and albumin as cryoprotective agents, with a mechanical freezer. This procedure is cheaper and simpler than methods using liquid nitrogen. Furthermore, more investigation about measurement of TMWL as a non-invasive method for assessing porcine buccal mucosa integrity, in the same way as TEWL will need to be performed. Furthermore, the results of this study support the hypothesis that when drugs such as PP are administered via buccal mucosa with no influence of excipients in the release profile, theoretical human plasma concentrations at steady state may be predicted. Therefore, fresh porcine mucosa could be substituted by frozen mucosa in *ex vivo* permeability studies. This method may represent a cheaper and simpler approach to studying other routes for drug administration or new drug delivery systems, obviating the need to use fresh porcine buccal mucosa for drugs such as PP.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2014.04.017>.

References

- Boix, A., Peraire, C., Obach, R., Domenech, J., 2005. Estimation of transdermal permeation parameters in non-stationary diffusion experiments. Application to pre-treatment studies with terpenes. *Pharm. Res.* 22, 94–102.
- Bronaugh, R.L., Maibach, H.I., 1991. *In Vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals, and Applications*. CRC Press, Florida.
- Diaz-del Consuelo, I., Jacques, Y., Pizzolato, G.P., Guy, R.H., Falson, F., 2005. Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. *Arch. Oral Biol.* 50, 981–987.
- Caon, T., Simões, C.M., 2011. Effect of freezing and type of mucosa on *ex vivo* drug permeability parameters. *AAPS PharmSciTech* 12, 587–592.
- Fernández-Campos, F., Calpena-Campmany, A.C., Rodríguez-Delgado, G., López-Serrano, O., Clares-Naveros, B., 2012. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies. *J. Pharm. Sci.* 101, 3739–3752.
- Galey, W.R., Lonsdale, H.K., Nacht, S., 1976. The *in vitro* permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water. *J. Invest. Dermatol.* 67, 713–717.
- Galmes, A., Gutiérrez, A., Sampol, A., Canaro, M., Morey, M., Iglesias, J., Matamoros, N., Duran, M.A., Novo, A., Bea, M.D., Galán, P., Balansat, J., Martínez, J., Bargay, J., Besalduch, J., 2007. Long-term hematologic reconstitution and clinical evaluation of autologous peripheral blood stem cell transplantation after cryopreservation of cells with 5% and 10% dimethylsulfoxide at -80°C in a mechanical freezer. *Haematologica* 92, 986–989.
- Guy, R.H., Hargraft, J., 1987. Transdermal drug delivery: a perspective. *J. Control. Release* 4, 237–251.
- Hadzija, B.W., Ruddy, S.B., Ballenger, E.S., 1992. Effect of freezing on iontophoretic transport through hairless rat skin. *J. Pharm. Pharmacol.* 44, 387–390.
- Harris, D., Robinson, J.R., 1992. Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity. *J. Pharm. Sci.* 81, 1–10.
- Holm, R., Meng-Lund, E., Andersen, M.B., Jespersen, M.L., Karlsson, J.J., Garmer, M., Jørgensen, E.B., Jacobsen, J., 2013. *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* examination of buccal absorption of metoprolol with varying pH in TR146 cell culture, porcine buccal mucosa and Göttingen minipigs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49, 117–124.
- Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, S.I., Li, X., Jasti, B., 2010. Porcine buccal mucosa as an *in vitro* model: effect of biological and experimental variables. *J. Pharm. Sci.* 99, 1265–1277.
- Lalka, D., Griffith, R.K., Cronenberg, C.L., 1993. The hepatic first-pass metabolism of problematic drugs. *J. Clin. Pharmacol.* 33, 657–659.
- Lovelock, J.E., Bishop, M.W.H., 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183, 1394–1395.
- Miwa, M., Nakajima, N., Matsunaga, M., Watanabe, K., 2006. Measurement of water loss in human nasal mucosa. *Am. J. Rhinol.* 20, 453–455.
- Modamio, P., Lastra, C.F., Marino, E.L., 2000. A comparative *in vitro* study of percutaneous penetration of beta blocker in human skin. *Int. J. Pharm.* 194, 249–259.
- Netzlaff, F., Kostka, K.H., Lehr, C.M., Schaefer, U.F., 2006. TEWL measurements as a routine method for evaluating the integrity of epidermis sheets in static Franz type diffusion cells *in vitro*. Limitations shown by transport data testing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63, 44–50.
- Nicolazzo, J.A., Finnin, B.C., 2008. *In vivo* and *in vitro* models for assessing drug absorption across the buccal mucosa. In: Ehrhardt, C., Kim, K.J. (Eds.), *Drug Absorption Studies – In Situ, In Vitro, and In Silico Models*. Springer, New York, pp. 89–111.
- Patel, V.F., Liu, F., Brown, M.B., 2011. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J. Control. Release* 153, 106–116.
- Riddell, J.G., Harron, D.W.G., Shanks, R.G., 1987. Clinical pharmacokinetics of β -adrenoreceptor antagonists. *Clin. Pharmacokinet.* 12, 305–320.
- Rowley, S.D., Bensing, W.L., Goolley, T.A., Buckner, C.D., 1994. The effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood* 83, 2731–2736.
- Schaefer, V.W., Dicke, K.A., 1973. Preservation of hemopoietic stem cells. Transplantation potential and CFU-C activity of frozen marrow tested in mice, monkeys and man. In: Weiner, R. (Ed.), *Cryopreservation of Normal and Neoplastic Cells*. INSERM, Paris, p. 63.
- Schwarz, J.C., Pagitsch, E., Valenta, C., 2013. Comparison of ATR-FTIR spectra of porcine vaginal and buccal mucosa with ear skin and penetration analysis of drug and vehicle components into pig ear. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50, 595–600.
- Sierra, A.F., Ramírez, M.L., Campmany, A.C., Martínez, A.R., Naveros, B.C., 2013. *In vivo* and *in vitro* evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. *J. Dermatol. Sci.* 69, 202–214.
- Sudhakar, K., Kuotsu, K., Bandyopadhyay, K., 2006. Buccal bioadhesive drug delivery—promising option for orally less efficient drugs. *J. Control. Release* 114, 15–40.
- Tedder, R.S., Zuckerman, M.A., Brink, N.S., Goldstone, A.H., Fielding, A., Blair, S., Patterson, K.G., Hawkins, A.E., Gormon, A.M., Heptonstall, J., Irwin, D., 1995. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 346, 137–140.
- Van Eyk, A.D., Van der Bijl, P., 2006. Comparative permeability of fresh and frozen/thawed porcine buccal mucosa towards various chemical markers. *SADJ* 61, 200–203.
- Veuillez, F., Falson Rieg, F., Guy, R.H., Deshusses, J., Buri, P., 2002. Permeation of a myristoylated dipeptide across the buccal mucosa: topological distribution and evaluation of tissue integrity. *Int. J. Pharm.* 231, 1–9.
- Williams, A.C., 2003. *Transdermal and Topical Drug Delivery*, first ed. Pharmaceutical Press, London.
- Williams, A.C., Cornwell, P.A., Barry, B.W., 1992. On the non-Gaussian distribution of human skin permeabilities. *Int. J. Pharm.* 86, 69–77.
- Wishart, D.S., Knox, C., Guo, A.C., Cheng, D., Shrivastava, S., Tzur, D., Gautam, B., Hassanali, M., 2008. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res.* 36 (Database issue), D901–D906.
- Yang, L., Fasshi, R., 1997. Examination of drug solubility, polymer types, hydrodynamics and loading dose on drug release behavior from a triple-layer asymmetric configuration delivery system. *Int. J. Pharm.* 155, 219–229.

3.6- RESUMEN TERCER ARTÍCULO

En anteriores estudios se valoró la acción anestésica y analgésica de la administración tópica oral de doxepina. Este estudio evalúa un modelo de permeación bucal para determinar el alcance del paso de doxepina en mucosa oral porcina después de la aplicación tópica de una solución acuosa saturada de doxepina.

Los estudios de permeación a través de la mucosa bucal se realizaron usando las células de difusión de Franz.

La cantidad permeada acumulada de doxepina se representó gráficamente como una función del tiempo. Así mismo se calcularon los parámetros cinéticos de permeación tales como el flujo (J_s), tiempo de latencia (T_1) y el coeficiente de permeabilidad (K_p).

De cara a evaluar el posible potencial efecto terapéutico en el hombre a nivel central o periférico, se procedió a determinar la concentración plasmática teórica en estado de equilibrio estacionario de doxepina y la cantidad de fármaco retenido en la mucosa.

También se procedió a estudiar histológicamente la mucosa bucal de cara a evaluar los posibles daños potenciales en su estructura, motivados por el fenómeno de la permeación, no observándose ningún tipo de daño estructural.

Los resultados obtenidos muestran una pobre permeación de la solución acuosa de doxepina a través de la mucosa bucal

La concentración predictiva de doxepina alcanzaría un valor de 46 ng/ml lejos de la necesaria para tener un efecto sobre el SNC como antidepresivo tricíclico.

Sin embargo, la mediana de la cantidad de doxepina remanente en la membrana mucosa fue de $0,24\mu\text{g}/\text{cm}^2/\mu\text{g}$ de tejido que evidencia una función de reservorio de la mucosa bucal.

Este estudio sienta las bases para profundizar en la investigación en esta área con el fin de adoptar potenciales estrategias alternativas para mejorar la absorción bucal de doxepina en la práctica clínica.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Transbuccal delivery of doxepin: Studies on permeation and histological investigation



Alvaro Gimeno^a, Ana C. Calpena^b, Roser Sanz^b, Mireia Mallandrich^b,
Concepción Peraire^b, Beatriz Clares^{c,*}

^a Animal Facility, Bellvitge Health Sciences Campus, University of Barcelona, Spain

^b Biopharmaceutical and Pharmacokinetics Unit, School of Pharmacy, University of Barcelona, Spain

^c Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, School of Pharmacy, University of Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2014

Received in revised form 21 October 2014

Accepted 28 October 2014

Available online 1 November 2014

PubChem classification:

PubChem CID 6419921

Keywords:

Doxepin

Buccal delivery

Pain

Porcine buccal mucosa

Ex vivo drug permeation

ABSTRACT

According to previous studies reporting the anesthetic/analgesic action of oral topical doxepin administration, this study evaluated a model of buccal permeation to determine the depth of delivery of doxepin into excised porcine buccal mucosa following topical application of a saturated aqueous doxepin solution. Buccal mucosa permeation studies were performed using Franz diffusion cells. Cumulative amounts of doxepin permeated were plotted as a function of time. Kinetic permeation parameters as flux (J_s), lag time (T_l) and permeability coefficient (K_p) were calculated. Theoretical human plasmatic steady-state doxepin concentration and drug retained in the tissue were also determined in order to evaluate its potential therapeutic use, central or peripheral. Finally, a histological evaluation of the buccal mucosa was performed to test potential damage due to the permeation phenomenon. Obtained results showed a poor aqueous doxepin permeation through buccal mucosa membrane (median parameters $J_s = 34.79 \mu\text{g/h}$, $K_p = 0.49 \times 10^{-3} \text{ cm/h}$ and $T_l = 2.8 \text{ h}$). Predicted doxepin plasma concentrations would reach 46 ng/mL , far from the required to have central nervous system activity as tricyclic agent. However, median doxepin amount remaining in the mucosa membrane was $0.24 \mu\text{g/cm}^2/\mu\text{g tissue}$, which evidenced a reservoir function of the buccal mucosa. Histologically, no structural damage was observed in the tissues. This study lays the foundation for further research within this area with a view to potentially adopting alternative strategies for enhanced buccal absorption of doxepin in clinical practice.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The buccal cavity provides a potential site for oral administration of drugs owing to the low cost, ease administration and high level of patient compliance for both, mucosal and transmucosal actions (Patel et al., 2011). In the first case, the aim is to achieve a site-specific release of the drug, whereas the second case involves drug absorption to reach the systemic circulation, since oral mucosa is highly vascularized. Any drug diffusing across oral mucosa membranes has direct access to the systemic circulation via capillaries and venous drainage and will bypass hepatic metabolism (Rossi et al., 2005). A key issue for buccal absorption is the permeability of the drugs through the buccal mucosa (Holm et al., 2013). The buccal mucosa appears to be better in terms of

permeability, surface area, compliance, etc., when compared to the other mucosal and transdermal routes of delivery (Kulkarni et al., 2009). Continuous research for the improvement of the oral cavity drug delivery has resulted in the development of several dosage forms which can be broadly classified into liquid, semi-solid, solid or spray formulations (Sudhakar et al., 2006). Furthermore, several drugs highly administered by other routes have been assayed through buccal mucosa (Birudaraj et al., 2005; Mashru et al., 2005; Giannola et al., 2007). Within this context, buccal administration could be an alternative, non-invasive delivery route also for doxepin hydrochloride.

Some drugs without being properly direct analgesics were observed to provide an effective analgesic activity in different painful situations (Mico et al., 2006). The role of antidepressant in the management of different pain syndromes has elicited considerable interest (Sandig et al., 2013). Among them, doxepin belongs to the tricyclic antidepressant family. This therapeutic group is also known for its analgesic effect (Sudoh et al., 2003). Clinical trials have proved the anesthetic and analgesic effect of a

* Corresponding author at: Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Campus de la Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain. Tel.: +34 958 243904; fax: +34 958 248958.

E-mail address: beatrizclares@ugr.es (B. Clares).

topical doxepin suspension (0.5%) when administered as a mouth wash (Epstein et al., 2003, 2006; Epstein, 2008). In the Biopharmaceutics Classification System, doxepin HCl, is designated as a class one compound, with high solubility and high permeability (Wu and Benet, 2005).

Porcine buccal mucosa has been suggested as a suitable model membrane because its morphology and permeability properties are similar to that of human buccal mucosa in ultra-structure (non-keratinised) and enzyme activity (Diaz Del Consuelo et al., 2005a). Percutaneous studies can be used as a quality control procedure to characterize the dosage form; to study the *ex vivo* release and permeation rate characteristics of drug products during development phase; to establish the drug delivery characteristics of topical formulations as one means of assuring lot to lot bioavailability equivalence; and to enable minor reformulations of topical products on which the bioavailability/bioequivalence has already been defined (Skelly et al., 1987). It is essential to identify the contribution of different variables in the *ex vivo* permeability conditions in order to obtain reliable and consistent permeability values. *Ex vivo* studies allow the control of experimental conditions such as temperature, pH, and osmolality, which can be used to identify or isolate a single factor that is responsible for variation, as well as, the variability associated with the use of different mucosal regions, tissue storage conditions and tissue processing methods (Kulkarni et al., 2009).

Based on these considerations, the major aim of the present study was the study of the permeation of doxepin through buccal mucosa, and for this purpose porcine buccal mucosa was employed as an *ex vivo* model.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Doxepin hydrochloride; 3-(dibenz[b,e]oxepin-11(6-H)-ylidene)-*N,N*-dimethyl-1-propylaminehydrochloride and phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.4), were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Albumin solution 4% was obtained from Laboratorios Grifols (Barcelona, Spain). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was supplied by Merck Lab. (Madrid, Spain). All other chemicals and reagents used were of analytical grade. Double-distilled water was obtained from a Milli-Q[®] Gradinet A10 system apparatus (Millipore Iberica S.A.U.; Madrid, Spain).

2.2. Tissue samples

The studies were conducted under a protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Barcelona (Spain) and the Committee of Animal Experimentation of the regional autonomous government of Catalonia (Spain). 3–4-month-old female pigs were used. The porcine buccal mucosa from the cheek region was obtained immediately after the pigs had been sacrificed in the animal facility at Bellvitge Campus (University of Barcelona, Spain) using an overdose of sodium thiopental anesthesia. The fresh buccal tissues were transferred from the hospital to the laboratory in containers filled with Hank's liquid. The remaining specimens were stored at -80°C in containers with a PBS mixture containing 4% albumin and 10% DMSO as cryoprotective agents (Amores et al., 2014).

2.3. *Ex vivo* permeation of doxepin throughout porcine buccal mucosa

For the permeation studies, the porcine buccal mucosa was cut to $500 \pm 50 \mu\text{m}$ thick sheets, which contributes to the diffusional barrier (Sudhakar et al., 2006), using an electric dermatome (GA 630, Aesculap, Tuttlingen, Germany) and trimmed with surgical

scissors in adequate pieces. The majority of the underlying connective tissue was removed with a scalpel.

Membranes were then mounted in specially designed membrane holders with a permeation orifice diameter of 9 mm (diffusion area 0.636 cm^2). Using the membrane holder, each porcine buccal membrane was mounted between the donor (1.5 mL) and the receptor (6 mL) compartments with the epithelium side facing the donor chamber and the connective tissue region facing the receiver of static Franz-type diffusion cells (Vidra Foc Barcelona, Spain) avoiding bubbles formation.

Infinite dose conditions were ensured by applying $100 \mu\text{L}$ as donor solution of a saturated doxepin solution into the receptor chamber and sealed by Parafilm[®] immediately to prevent water evaporation. Prior to conducting the experiments, the diffusion cells were incubated for 1 h in a water bath to equalize the temperature in all cells ($37 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Each cell contained a small Teflon[®] coated magnetic stir bar which was used to ensure that the fluid in the receptor compartment remained homogenous during the experiments.

Sink conditions were ensured in all experiments by initial testing of doxepin saturation concentration in the receptor medium. Samples ($300 \mu\text{L}$) were drawn via syringe from the center of the receptor compartment at pre-selected time intervals (0.1, 0.2, 0.3, 0.7, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h) for 6 h. The removed sample volume was immediately replaced with the same volume of fresh receptor medium (PBS; pH 7.4) with great care to avoid trapping air beneath the membrane.

2.4. Drug assay

The cumulative doxepin amount through the mucosa membrane from the acceptor compartment was monitored by a validated HPLC methodology. Results are reported as means \pm SD and median (min–max) of six different experiments. The system consisted of a Waters 515 pump (Waters, Milford, MA, USA) with UV–vis 2487 detector (Waters, Milford, MA, USA) set at 235 nm. Doxepin was detected with a retention time of 4.6 min with a reverse-phase C18 Sunfire[®] column ($4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$, Waters Associates, Milford, MA, USA) using as mobile phase methanol/ (acetate buffer pH 6.0/water (36/64, v/v)) (72/28, v/v), pumped at 1 mL/min flux rate (Sandig et al., 2013).

2.5. Data analysis

The cumulative amount of doxepin permeated (Q_t) through porcine buccal mucosa was calculated, at each time point, from the concentration of doxepin in the receiving medium and plotted as function of time. Doxepin flux (J_s , $\mu\text{g/h}$) across the buccal mucosa was calculated at the steady state by linear regression analysis (GraphPad Prism[®], v. 3.00 software; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) of permeation data.

Apparent permeability coefficient (K_p) was calculated by dividing the J_s by the initial drug concentration (C_0) in the donor phase:

$$K_p = \frac{J_s}{C_0} \quad (1)$$

It is assumed that under sink conditions the drug concentration in the receiver compartment is negligible compared to that in the donor compartment.

2.5.1. Theoretical systemic concentration of drug

The potential systemic capacity after buccal mucosa administration can be predicted by the theoretical human plasmatic steady-state concentration (C_{ss}), using the following equation:

$$C_{ss} = \frac{S \times J_s}{Cl_p} \quad (2)$$

where J_s is the flux determined in this study, S is the assumed surface area of application in the buccal mucosa and Cl_p is plasma clearance in humans.

2.5.2. Drug remaining in the tissue

Immediately after the *ex vivo* permeation experiment, the biological membranes were dismantled from the Franz cells, cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of sodium dodecyl sulphate and washed in distilled water. Doxepin retained in the buccal mucosa was extracted with ethanol–water (70:30) medium during 20 min under sonication in an ultrasound bath; the resulting samples were measured by HPLC.

2.6. Histological analysis

Histomorphological analyses were performed on porcine buccal tissues to evaluate the pathological changes occurring in tissue organization after permeation experiments.

The tissues samples were fixed in 10% neutral-buffered formalin for 2 h, washed in water for 1 h, dehydrated in graded ethanol (60%, 80%, 90%, 95%, and 100%) and, after permeation in xylene, embedded in paraffin using the standard procedures. Formalin-fixed, paraffin embedded samples were cut into 4– μm -thick sections on a microtome with a disposable blade and conventionally stained with hematoxylin–eosin. Two different types of negative controls were included in the histomorphological analysis: blank controls and permeation controls. Blank permeation controls were those samples subjected to the experimental phase in the absence of drug. Slides were evaluated by optical microscopy by two of the authors in a blind and independent fashion. Samples were then examined by light microscope Olympus BX40 camera Olympus SC35 (Tokyo, Japan) under 40 \times magnification.

3. Results and discussion

The most important limitation in the development of a buccal drug delivery system might be the low drug passage through the buccal mucosa. Given that porcine buccal mucosa is one of the most useful models to simulate human buccal epithelium (van Eyk and van der Bijl, 2004), we measured drug flux and permeability coefficient throughout pig mucosa 500 \pm 50 μm thick. After literature research no permeation studies of doxepin through buccal mucosa were found.

Modelling and simulation methods that predict the *in vivo* performance of drug products can greatly improve formulation strategy by aiding scientists in designing a rational approach to formulation development (Jiang et al., 2011).

Permeation profile of doxepin through porcine buccal mucosa was obtained by plotting the cumulative amount permeated versus time (Fig. 1A). To study the intrinsic capacity of doxepin to pass through the buccal mucosa, a filtered saturated solution ($C_0 = 110392 \mu\text{g/mL}$) was performed to obtain maximal thermodynamic activity, according to the assumption that a solute at saturation in a solution has thermodynamic activity similar to that of its pure state. As shown in Fig. 1A, doxepin poorly permeated through buccal mucosa after 6 h ($Q_6 = 5.25\% \pm \text{SD}$). Fig. 1B shows the permeation median values in μg . Permeation profile indicated that the mucosa integrity was maintained throughout the study and exhibited a linear trend 3 h after the beginning of the experiment. This finding may give the idea that the reported fatigue, due to a central action of doxepin, exhibited by a group of patients to whom a doxepin oral rinse was administered to treat mucositis pain could be due to sublingual drug permeation, rather than cheek region permeation (Epstein, 2008). There is significantly higher permeability in the region behind the lips in comparison to cheek region, because in porcine buccal mucosa, the epithelium acts as a permeability barrier, and the thickness of the cheek epithelium is greater than that of the region behind the lips (Harris and Robinson, 1992). In this way, if a systemic effect needs to be achieved, the use of penetration enhancers is necessary for buccal penetration enhancement. However, the analgesic/anesthetic effect on buccal cavity of doxepin is due to a local effect. The duration of effect of doxepin rinse has been related to a short period of anesthesia, followed by an extended period of analgesia (Epstein et al., 2003). Thus in order to extend its duration, residence time in the buccal cavity should be enhanced by inclusion in a dosage form different from buccal rinse.

The calculated permeation kinetic parameters of doxepin are presented in Table 1. Flux was obtained at the steady state from the slope of the linear portion of the plot. Flux as a function of the mucosa surface area (0.636 cm^2) was also calculated. The time elapsed before achieving the steady state was designed as the lag time (T_l , h) calculated as the intercept with the time axis of the extrapolated linear portion of the permeated doxepin/time plot. The permeability coefficient was processed by dividing the flux value by the drug concentration in the donor compartment. Low median J_s value of 34.79 $\mu\text{g/h}$ was observed with 2.8 h T_l , and permeability coefficient of $0.49 \times 10^{-3} \text{ cm/h}$.

Table 1
Permeation parameters for doxepin saturated solution.

Permeation parameters	Median	Minimum	Maximum
Flux ($\mu\text{g/h}$)	34.79	10.16	426.54
Flux/sup ($\mu\text{g}/(\text{cm}^2\text{h})$)	54.7	15.98	670.66
T_l (h)	2.8	1.47	3.36
C_0 ($\mu\text{g/mL}$)	110392	110392	110392
K_p ($\times 10^{-3}$) (cm/h)	0.49	0.14	6.08

T_l : lag time; C_0 : initial concentration; K_p : permeability coefficient.

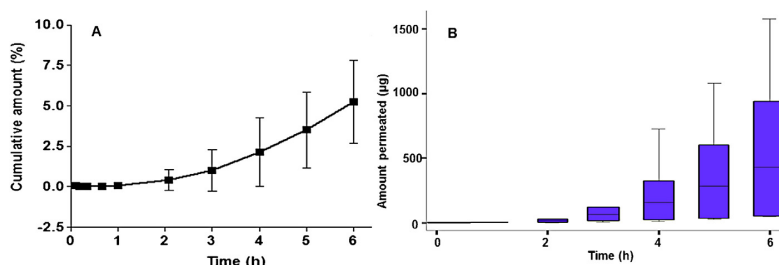


Fig. 1. Doxepin permeation profile across porcine buccal mucosa. Data expressed as mean percentage ($\% \pm \text{SD}$) ($n = 6$) (A). Box and whisker plot showing median, maximum and minimum in μg of doxepin (B).

In buccal drug delivery, the barrier properties of the mucosa are dependent on the structural and physicochemical properties of both the oral tissue and the actives. The main resistance to permeation of non-keratinized oral mucosa resides in the outer of the epithelium, in particular the intercellular lipids secreted by membrane coating granules. These, are spherical or oval organelles which are 100–300 nm in diameter (Hayward, 1979). The arrangement of these lipids is quite amorphous, with only a minor component organized into lamellae, and it appears to be related to the permeability barrier (Diaz Del Consuelo et al., 2005b).

Predicted plasma concentrations were obtained from Eq. (2). Taking into account a doxepin plasmatic clearance (Cl_p) of 1000 mL/min (Sandig et al., 2013), and using the J_s previously calculated (Table 1), the median plasma concentration under steady-state conditions was calculated to be 46 ng/mL. According to these theoretical data, small amounts of the topical dose applied would be absorbed, and serum concentrations would be significantly below the therapeutic range for a potential central nervous system activity as tricyclic agent (150–250 ng/mL) (Drake et al., 1999; Demling, 2001). However, it must be taken into consideration the absence of mucosal microcirculation in the *ex vivo* experiment studies. This might have hampered greater diffusion of doxepin through lower layers into the receptor chamber.

This suggestion was confirmed by the results obtained from the extraction and quantification of the drug entrapped into the membrane at the end of the experiment. The median doxepin amount retained in the mucosa membrane was $0.24 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\mu\text{g}$ (0.06–0.75). The buccal mucosa is considerably less permeable than the sublingual area, and it is generally not able to provide the rapid absorption and good bioavailabilities seen with sublingual administration. In fact, the term 'buccal', even if sometimes wrongly is used to indicate the mucosa of the total oral cavity, refers to the lining of the cheek and the upper and lower lips, which represent one-third of the total oral mucosa surface (Rossi et al., 2005). In this way, studies have also demonstrated a reservoir function of the buccal mucosa with drug retention, and a slow transfer into the systemic circulation providing optimal conditions for the local action of doxepin that otherwise could lead to undesirable central effects (Fernández Campos et al., 2012; Martín et al., 2015).

The samples submitted to doxepin diffusion (Fig. 2) did not show significant alterations in cell morphology or epithelium structure. No sign of flogosis was found in any of mucosal specimens treated.

Cells bound together on the different layers of the non-keratinized stratified squamous epithelium with no obvious intercellular spaces. The subepithelial tissue appears as dense irregular tissue rich in collagen fibres with blood vessels, nervous structures and secretory gland vessels. Bundles of skeletal muscle in transversal sections separated by connective tissue septa and some adipose tissue can be observed. Secretory units of the salivary glands, mostly of mucous type are made of connective tissue forming secretory lobules. In some places, these secretory units are surrounded by muscular fibres. Only changes on the most superficial layers were seen as superficial desquamation. There were differences on the subepithelial, muscular and glandular tissue due to individual variability not related to the permeation action of doxepin. Those individual changes are probably linked to the sample manipulation for microscope observation.

4. Conclusions

The *ex vivo* buccal permeation studies performed on doxepin demonstrated that this drug possesses low intrinsic buccal permeation capacity. The optimal retention into the buccal tissue

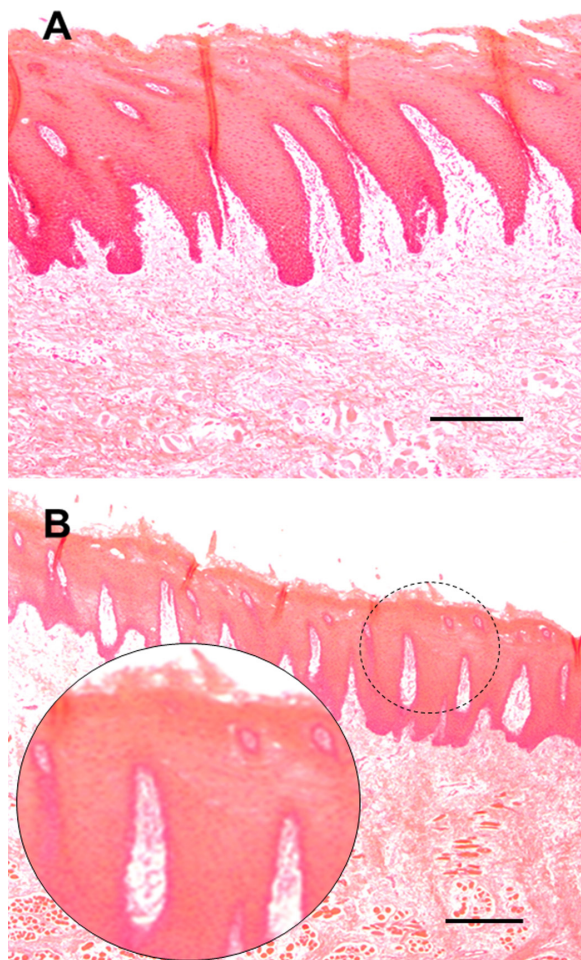


Fig. 2. Microphotographs of formalin-fixed, paraffin embedded cross-sections of porcine buccal mucosa. Control untreated (A). Sample subjected to permeation of doxepin (B). Bars length 500 μm .

would guarantee the potential anesthetic/analgesic effect avoiding central effects due to systemic absorption. The peripheral analgesic effect of tricyclic antidepressants has been attributed to the decrease of cyclic AMP by the activation of adenosine A1 receptors and the inhibition of the voltage-gated sodium channels. However, if those central effects of doxepin are intended, proper formulation and dosage form design should be performed. Penetration enhancers could be also required when this type of drug has to reach the systemic circulation to exert its action. Nevertheless, *ex vivo* studies should be addressed to assess the potential mucosa damage of these enhancers (chemical or physical). This study lays the foundation for further research within this area with a view to potentially adopting alternative strategies for enhanced buccal absorption of doxepin in clinical practice.

References

- Amores, S., Domenech, J., Colom, H., Calpena, A.C., Clares, B., Gimeno, A., Lauroba, J., 2014. An improved cryopreservation method for porcine buccal mucosa in *ex vivo* drug permeation studies using Franz diffusion cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 60, 49–54.
- Birudharaj, R., Berner, B., Shen, S., Li, X., 2005. Buccal permeation of buspirone: mechanistic studies on transport pathways. *J. Pharm. Sci.* 94, 70–78.

- Demling, R.H., 2001. Topical doxepin cream is effective in relieving severe pruritus caused by burn injury: a preliminary study. *Wounds* 13, 210–215.
- Diaz Del Consuelo, I., Jacques, Y., Pizzolato, G.P., Guy, R.H., Falson, F., 2005a. Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. *Arch. Oral Biol.* 50, 981–987.
- Diaz Del Consuelo, I., Pizzolato, G., Falson, F., Guy, R.H., Jacques, Y., 2005b. Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. *J. Pharm. Sci.* 94, 2777–2788.
- Drake, L.A., Cohen, L., Gillies, R., Flood, J.G., Riordan, A.T., Phillips, S.B., Stiller, M.J., 1999. Pharmacokinetics of doxepin in subjects with pruritic atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 41, 209–214.
- Epstein, J.B., 2008. Doxepin rinse for management of mucositis pain in patients with cancer: one week follow-up of topical therapy. *Spec. Care Dent.* 28, 73–77.
- Epstein, J.B., Truelove, E.L., Oien, H., Le, N.D., Epstein, M.S., 2003. Oral topical doxepin rinse: anesthetic effect in normal subjects. *Pain Res. Manag.* 8, 195–197.
- Epstein, J.B., Epstein, J.D., Epstein, M.S., Oien, H., Truelove, E.L., 2006. Oral doxepin rinse: the analgesic effect and duration on patients with oral mucositis due to cancer therapy. *Anesth. Analg.* 103, 465–470.
- Fernández Campos, F., Calpena Campmany, A.C., Rodríguez Delgado, G., López Serrano, O., Clares Naveros, B., 2012. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies. *J. Pharm. Sci.* 101, 3739–3752.
- Giannola, L.I., De Caro, V., Giandalia, G., Siragusa, M.G., Tripodo, C., Florena, A.M., Campisi, G., 2007. Release of naltrexone on buccal mucosa: permeation studies, histological aspects and matrix system design. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 425–433.
- Harris, D., Robinson, J.R., 1992. Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity. *J. Pharm. Sci.* 81, 1–10.
- Hayward, A.F., 1979. Membrane-coating granules. *Int. Rev. Cytol.* 59, 97–127.
- Holm, R., Meng-Lund, E., Andersen, M.B., Jespersen, M.L., Karlsson, J.J., Garmer, M., Jørgensen, E.B., Jacobsen, J., 2013. In vitro, ex vivo and in vivo examination of buccal absorption of metoprolol with varying pH in TR146 cell culture, porcine buccal mucosa and Göttingen minipigs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49, 117–124.
- Jiang, W., Kim, S., Zhang, X., Lionberger, R.A., Davit, B.M., Conner, D.P., Yu, L.X., 2011. The role of predictive biopharmaceutical modeling and simulation in drug development and regulatory evaluation. *Int. J. Pharm.* 418, 151–160.
- Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, S.I., Li, X., Jasti, B., 2009. Porcine buccal mucosa as an in vitro model: relative contribution of epithelium and connective tissue as permeability barriers. *J. Pharm. Sci.* 98, 471–483.
- Martin, M.J., Calpena, A.C., Fernández, F., Mallandrich, M., Gálvez, P., Clares, B., 2015. Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. *Carbohydr. Polym.* 117, 140–149.
- Mashru, R.C., Sutariya, V.B., Sankalia, M.G., Sankalia, J.M., 2005. Effect of pH on in vitro permeation of ondansetron hydrochloride across porcine buccal mucosa. *Pharm. Dev. Technol.* 10, 241–247.
- Mico, J.A., Ardid, D., Berrocoso, E., Eschalier, A., 2006. Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 348–354.
- Patel, V.F., Liu, F., Brown, M.B., 2011. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J. Control. Release* 153, 106–116.
- Rossi, S., Sandri, G., Carla, M., Caramella, C.M., 2005. Buccal drug delivery: a challenge already won? *Drug Dis. Today Technol.* 2, 59–65.
- Sandig, A.G., Campmany, A.C., Campos, F.F., Villena, M.J., Naveros, B.C., 2013. Transdermal delivery of imipramine and doxepin from newly oil-in-water nanoemulsions for an analgesic and anti-allodynic activity: Development, characterization and in vivo evaluation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 103, 558–565.
- Skelly, J.P., Shah, V.P., Maibach, H.I., Guy, R.H., Wester, R.C., Flynn, G., Yacobi, A., 1987. FDA and AAPS report of the workshop on principles and practices of in vitro percutaneous penetration studies: relevance to bioavailability and bioequivalence. *Pharm. Res.* 4, 265–267.
- Sudhakar, Y., Kuotsu, K., Bandyopadhyay, A.K., 2006. Buccal bioadhesive drug delivery—a promising option for orally less efficient drugs. *J. Control. Release* 114, 15–40.
- Sudoh, Y., Cahoon, E.E., Gerner, P., Wang, G.K., 2003. Tricyclic antidepressants as long-acting local anesthetics. *PAIN* 103, 49–55.
- van Eyk, A.D., van der Bijl, P., 2004. Comparative permeability of various chemical markers through human vaginal and buccal mucosa as well as porcine buccal and mouth floor mucosa. *Arch. Oral Biol.* 49, 387–392.
- Wu, C.Y., Benet, L.Z., 2005. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm. Res.* 22, 11–23.

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

4.1- DISCUSIÓN

La composición de la nanoemulsión se decidió a partir del diagrama pseudo-ternario del sistema cuaternario a temperatura ambiente.

El área sombreada representa la formación a temperatura ambiente de la nanoemulsión. Para la fase oleosa se eligió el ácido oleico porque es un buen promotor para la liberación dérmica pues puede incrementar la fluidez de la porción lipídica del estrato córneo con un efecto potenciador de la permeación.

Hay que tener en cuenta que un alto contenido de ácido oleico puede provocar una irritación dérmica, en este caso se eligió un 5%.

Para mejorar la penetración, se incorporaron en la fase oleosa los terpenos, en concreto el limoneno. Simultáneamente se seleccionó el isostearato de isostearilo como potenciador de la penetración en la piel del limoneno ya que mejora la función de barrera de permeabilidad al agua del estrato córneo.

Utilizamos la combinación de Labrasol y Plurol Oleico como tensioactivo y cotensioactivo respectivamente debido a la conocida compatibilidad con la piel.

Se caracterizó la nanoemulsión compuesta por un 45% de fase acuosa, un 40% de mezcla de tensioactivos y un 15% de fase oleosa, resultando ser isotrópico, transparente y ligeramente viscoso. El valor del pH del vehículo de la nanoemulsión fue de 6,7 a las 24h después de su preparación, no siendo este valor modificado por la adición de los fármacos.

Los valores de viscosidad, tanto de imipramina ($75,400 \pm 0,002 \text{ mPas}$) como de doxepina ($76,300 \pm 0,001 \text{ mPas}$) fueron muy similares.

El tamaño medio de la gota de la solución de imipramina fue de $17,7 \pm 0,1 \text{ nm}$ y para la nanoemulsión de doxepina fue de $19,9 \pm 0,1 \text{ nm}$. La nanoemulsión sin fármaco tuvo un tamaño medio de gota de $19,0 \pm 0,1 \text{ nm}$, no disminuyendo significativamente al añadir la imipramina.

Se ha planteado la hipótesis, de que aparte de la estructura y la composición de la nanoemulsión, las moléculas de fármaco incorporado participan en la microestructura del sistema y puede influir en él debido a interacciones moleculares, especialmente si el fármaco posee propiedades anfífilas y mesogénicas.

El índice de polidispersidad nos describe la homogeneidad del tamaño de la gota. Los valores de polidispersidad resultaron muy parecidos con lo que nos indica que el tamaño de la gotita tenía alta homogeneidad. Se realizaron imágenes de microscopía de transmisión de electrones (TEM) que nos confirmaron la eficiencia del método de preparación de la nanoemulsión. Se pudo observar que las gotas de las nanoemulsiones eran esféricas, con tamaños que oscilaban entre los 20 -35 nm, siendo estos valores acordes a las mediciones DLS y a los valores obtenidos por otros autores para estos sistemas.

En cuanto a la estabilidad de las nanoemulsiones la prueba de la centrifugación nos demostró que ambas nanoemulsiones tenían buena estabilidad física ya que no hubo ninguna separación de fases, agrietamiento ni signos de precipitación tras la centrifugación.

Las muestras estuvieron a temperatura ambiente protegidas de la luz durante 3 meses y se mantuvieron estables con o sin la presencia de imipramina y doxepina y no hubo ningún cambio en la apariencia visual (separación de fases o color).

Con el fin de estudiar el efecto del paso del tiempo, se midieron los parámetros de pH, viscosidad, tamaño gota y el índice de polidispersidad, no observándose cambios en la estabilidad de las nanoemulsiones.

Incluso las imágenes TEM tomadas a los 3 meses, mostraron las vesículas perfectamente redondas sin signos de precipitación de los fármacos afectando a la estabilidad de las nanoemulsiones.

Finalmente se evaluó el contenido de los fármacos en la nanoemulsiones guardadas durante este tiempo, detectándose un rango entre el 85,7% y el 97,3%.

En los experimentos de penetración en la piel humana los perfiles de permeación transdérmica de la imipramina y doxepina a través de la piel humana se calcularon en estado de equilibrio estacionario.

Después de un intervalo de tiempo de 1,5h para la nanoemulsión de imipramina y de 1,1h para la de doxepina, se observó una relación casi lineal entre la cantidad de fármaco permeado frente al tiempo, indicando que la integridad de la piel se mantenía constante durante todo el estudio y que los ratios de permeación fueron constantes.

La media del perfil de permeación de la nanoemulsión de doxepina en función del tiempo es mayor que la nanoemulsión de imipramina.

El coeficiente de permeación (K_p) de doxepina fue un poco más elevado que el de la imipramina, no siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

La penetración transdérmica es un proceso multi factorial, en nuestro estudio todos los factores son iguales, excepto las propiedades físico-químicas de las sustancias activas.

Se ha reportado la influencia del coeficiente de partición ($\log P$) y el peso molecular en la permeabilidad de la piel. Existe una pequeña diferencia en el peso molecular entre ambas moléculas y en el coeficiente de partición, siendo de 4,16 para la imipramina y de 3,86 para la doxepina. Esta diferencia puede ser un factor que influya en el diferente valor de K_p .

Así, estas diferencias en la permeación tópica se pueden explicar por el valor más elevado del parámetro P_1 directamente relacionado con el coeficiente de partición de la piel frente a la nanoemulsión.

Sobre la base de que tanto doxepina como imipramina se acumulan en las gotas de la fase acuosa dado el alto contenido en agua del vehículo, particularmente la doxepina se solubilizará antes, debido a su mayor solubilidad en agua siendo los parámetros J_s , K_p y P_1 mejores.

Una vez estos fármacos atraviesan la estructura lipídica del estrato córneo, alcanzan la epidermis viable, situada debajo del estrato córneo, que tiene una naturaleza más acuosa y contribuye a incrementar la permeación de la doxepina.

Una vez ambos fármacos atraviesan la estructura lipídica del estrato córneo, alcanzan la epidermis viable situada debajo del estrato córneo, que es mucho más acuoso y contribuiría a una mejor permeación de la doxepina.

El intervalo de tiempo (T_i) es un parámetro de permeación que depende principalmente de la difusión del fármaco a través de la piel, reduciéndose a medida que se incrementa la difusión.

El T_i fue menor para la doxepina, en este sentido P_2 debería ser más alto, pero el resultado fue de $0,112h^{-1}$ y de $0,143h^{-1}$ para la imipramina. Este resultado no es incoherente, con frecuencia es difícil explicar algunas diferencias, dado lo poco que se conoce de los subyacentes principios de la variabilidad de los flujos de membrana.

Las concentraciones predictivas en plasma se calcularon a partir de un aclaramiento plasmático (Cl_p) de 1000ml/min para la imipramina y la doxepina y además asumiendo un área máxima de una hipotética aplicación de $16cm^2$ y usando una J previamente calculada bajo condiciones de equilibrio estacionario.

Después de la aplicación tópica de la nanoemulsión de imipramina, predijimos alcanzar una mediana de niveles plasmáticos de 0,148 ng/ml y de 0,289 ng/ml para la nanoemulsión de doxepina. Solo pequeñas cantidades se absorben tras aplicación tópica y las concentraciones en suero son significativamente más pequeñas que los rangos terapéuticos para el tratamiento de la depresión (150-250 ng/ml). Así pues, se observa que la aplicación tópica de imipramina y doxepina es segura para efectos locales, desde el objetivo que el vehículo de la nanoemulsión incremente la penetración a través del estrato córneo a capas más profundas de la piel mientras evitamos la absorción sistémica.

Hay que tener en cuenta la falta de microcirculación en los estudios ex vivo, ya que puede haber dificultado una mayor difusión de imipramina y doxepina a través de capas más profundas en la cámara receptora.

Referente a la actividad analgésica la administración de nanoemulsiones cargadas con imipramina y doxepina no produce analgesia sistémica, no encontrándose diferencias con respecto al grupo control en la pata contralateral de los animales sin administración. La aplicación de la nanoemulsión en la pata ipsilateral incrementa significativamente el tiempo de latencia de retirada de la pata ($p < 0,005$).

La media de los valores $AUC_{0-70} \pm SD$ del tiempo de retirada de la pata frente al tiempo y el efecto máximo (E_{max}) representa un incremento significativo del 13,3% y 13,8% respectivamente cuando comparamos la nanoemulsión de imipramina frente al grupo control y un incremento significativo del 28,7 % y 30,5 % cuando comparamos la nanoemulsión de doxepina frente al grupo control. La mayor actividad analgésica se obtuvo después de la administración subcutánea de doxepina con un incremento en AUC_{0-70} y E_{max} del 98,7% y 85,1% respectivamente. Los actuales resultados sugieren un mayor efecto analgésico de la nanoemulsión de doxepina frente a la de imipramina tras su administración tópica.

Estos resultados están en concordancia con test previos con los mismos fármacos donde la doxepina mostró mayor duración del bloqueo motor, propioceptivo y nociceptivo del nervio ciático que la imipramina, después de su inyección en ratas (Sudoh y cols, 2003). Del mismo modo, otras investigaciones demostraron que la administración tópica de doxepina en ratas causa una analgesia dosis dependiente (Gerner y cols, 2006).

Nuestros estudios pusieron de manifiesto que el efecto anestésico (como AUC) obtenido tras inyección subcutánea de 0,150mg/rata, de imipramina, fue superior al mostrado tras

la aplicación tópica de 6 mg/rata, de imipramina. Los mismos resultados se obtuvieron con la doxepina y las mismas dosis aplicadas.

La biodisponibilidad de la imipramina y doxepina tópica en nanoemulsiones es mucho menor que la obtenida tras su administración subcutánea. Pero la T_{max} no es significativamente diferente después de la aplicación de la nanoemulsión de imipramina y la inyección subcutánea. Es probable que tras la aplicación de la nanoemulsión en una superficie importante de la piel (planta o palma de la pata) el fármaco cuando se libera, alcanza rápidamente las terminaciones nerviosas localizadas justo debajo de la epidermis.

La permeación fue favorecida por el pequeño tamaño de las partículas en la fase dispersa, desde que el vehículo pasó a través del estrecho paso intercelular (≤ 30 nm) (poros virtuales) en las capas más profundas de la piel.

Ambos, tanto el fármaco liberado de la nanoemulsión y la administración directa en la hipodermis puede alcanzar los mecanorreceptores con igual velocidad.

En el caso de la doxepina, la T_{max} es significativamente menor para la administración por inyección. Durante nuestros estudios, mientras administrábamos la solución de doxepina por inyección, vimos que el máximo efecto se producía rápidamente y se mantenía durante todo el experimento. Podemos llegar a hipotetizar que esta diferencia en la T_{max} entre la solución inyectada y la doxepina liberada de la nanoemulsión puede ser debida a su fuerte efecto analgésico, porque teniendo en cuenta los resultados de los estudios de permeación, vimos que la nanoemulsión cargada con doxepina debería alcanzar su máximo efecto, como poco, en el mismo tiempo que la nanoemulsión cargada con imipramina, en concordancia entre los estudios de permeación y los estudios in vivo, pero la imipramina no tiene los potentes efectos como la doxepina, así la T_{max} de la imipramina es igual para las dos formulaciones, siendo diferente para las dos formulaciones de doxepina.

Efecto antialodinia: La alodinia táctil se desarrolló claramente en las extremidades edematosas con carraginata. La media del tiempo de reacción fue de $5,6 \pm 0,5$ s y de $24,2 \pm 0,7$ s para la pata inflamada ipsilateral y contralateral sana respectivamente.

No se observó absorción sistémica, particularmente después de la administración subcutánea de imipramina y doxepina ya que no hubo incremento en el umbral al dolor por tacto en la pata contralateral. La actividad anti-alodínica observada para la

nanoemulsión con imipramina fue muy baja prácticamente inexistente, con un máximo de efecto antialodínico (en términos de gramos de fuerza) de 3,6g.

Si lo comparamos con la nanoemulsión de doxepina, estos valores suponen una importante disminución del 190%. Estos resultados están en concordancia con la actividad mostrada por las soluciones subcutáneas de los activos. La doxepina subcutánea manifestó un incremento en la actividad antialodínica frente a la imipramina de un 106,2 % en términos de AUC.

La nanoemulsión cargada con doxepina tampoco alcanzó una fuerte actividad comparándola con la administración hipodérmica, solo alcanzó un 33,5% en términos de T_{max} .

Estos resultados, comparados con los experimentos antinociceptivos son menos prometedores ya que los efectos analgésicos exhibidos por las nanoemulsiones están más cerca de aquellos obtenidos por la inyección del fármaco, lo que nos hace pensar que los dos tipos de dolor testados en este estudio no parecen compartir un patrón común.

Se creó que los estímulos térmicos nocivos están mediados a través de finas fibras C no mielinizadas primarias de un alto umbral, mientras que se creó que la estimulación táctil no nociva está mediada por fibras aferentes A beta de diámetro grueso de bajo umbral (Tian y cols 2009).

Teniendo en cuenta todos los resultados anteriores, se puede sugerir que la nanoemulsión de doxepina puede ser un prometedor agente analgésico en estudios preclínicos y clínicos con una cierta actividad anti-alodínica.

En nuestro interés en cumplir con el concepto de las 3R (Reducción, Refinamiento y Reemplazo), estudiamos la mejor manera de conservar nuestras muestras biológicas obtenidas, para lo cual vimos que el crioprotector más utilizado para células vivas es el DMSO (Dimetilsulfóxido), que es un compuesto polar higroscópico originalmente desarrollado como un disolvente para productos químicos. Sus propiedades fueron descritas por primera vez en 1959 (Lovelock and Bishop, 1959). Sin embargo, en nuestra búsqueda bibliográfica no hemos encontrado ningún artículo donde se utilizase DMSO como crioprotector intracelular para conservar la mucosa bucal porcina.

Por lo tanto, la mucosa bucal porcina se conservó a -80°C en contenedores con PBS conteniendo un 10% DMSO y un 4% de albúmina (crioprotector extracelular) en ultracongeladores de laboratorio por un máximo de un mes, siendo este método más

barato y simple para evitar posibles contaminaciones asociadas al uso de tanques de nitrógeno (Tedder y cols,1995).

El DMSO actúa penetrando en la célula y uniéndose a moléculas de agua bloqueando el flujo de salida de agua, evitando así la deshidratación celular y manteniendo un pH estable y una concentración de sales intracelulares.

Se previene la formación de cristales de hielo (Schaefer y Dicke, 1973).

Cuando los tejidos se someten a una congelación incontrolada, se forman cristales de hielo dentro del tejido pudiendo dañar la matriz intracelular y la membrana celular, alterándose de esta manera las propiedades de barrera de estos tejidos (Hadzija y cols. 1992) También se ha reportado una descamación superficial en tejidos congelados (Caon and Simoes, 2011).

Un método ya establecido para medir la integridad de la piel como barrera es la evaluación del TMWL. Este método puede utilizarse también para la medición de la integridad como barrera de las mucosas y para supervisar el proceso de descongelación. Los resultados obtenidos en este estudio muestran diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores de TMWL para mucosa fresca y congelada.

Sin embargo, los resultados obtenidos para mucosa fresca y congelada muestran una uniformidad relativa.

Los valores de TMWL encontrados para las mucosas congeladas son más altos que los de las mucosas frescas, pero ambos tienen valores por debajo de 30g/h/m^2 (valor promedio probado in vivo en mucosa de cerdo) y por lo tanto se consideran aceptables para el cálculo de la integridad de la mucosa.

Las diferencias en TMWL entre congeladas y frescas no se correlacionan necesariamente con los datos de permeación ex vivo, tal como se observa en este estudio, por todo ello se desprecia la diferencia hallada del TMWL ya que no implica repercusión biofarmacéutica en la permeación.

En la evaluación ex vivo de difusión con mucosa se ha probado que la solubilidad del propanolol en el tampón pH= 7,4 se mantuvo constante a lo largo de todos los experimentos. Estos resultados indican, en primer lugar, que las fracciones ionizadas y no ionizadas se mantienen bastante constantes y en segundo lugar, que el valor de la concentración inicial del fármaco (C_0) permanece constante.

Los valores individuales de la cantidad permeada acumulada de propanolol en función del tiempo a través de la mucosa bucal porcina fresca o congelada se presentan con la mediana y con el factor de dispersión estadístico (DF50).

La representación gráfica de los valores individuales acumulados de propranolol permeados en función del tiempo obtenidos de mucosa bucal porcina fresca y congelada se indican en la siguiente figura:

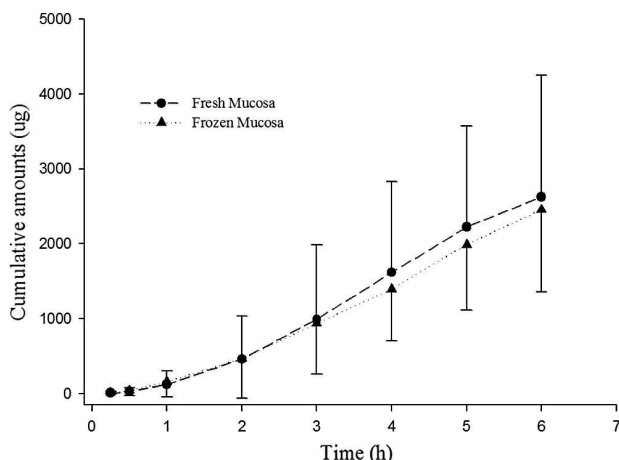


Fig. 25 -. Values of cumulative amounts of propranolol permeated over time through fresh (n = 27) and frozen (n = 22) porcine buccal mucosa. Values are presented as median and DF50.

La diferencia entre las curvas de las diferentes células de difusión aumenta con el tiempo. Hasta cierto punto, esto es debido a las variaciones naturales en permeabilidad de la barrera entre las diferentes mucosas, lo que lleva a las ligeras diferencias en las pendientes de las curvas experimentales (Kulkarni et al, 2010).

Por consiguiente, la mediana de los valores en el final de los experimentos tiene un DF50 superior que los valores en los primeros tiempos (hasta 3 horas).

Para determinar la constante de permeabilidad (K_p) de la mucosa fresca o congelada y el periodo de latencia (T_l) se realizó un ajuste lineal de las curvas individuales.

Para todos los análisis lineales, los coeficientes de regresión (r) eran invariablemente altos y normalmente excedían de 0,89 (datos no mostrados).

Los valores de la mediana de K_p fueron $0,828 \times 10^{-2}$ cm/h para mucosa fresca y $0,735 \times 10^{-2}$ cm/h para mucosa congelada. Las medianas del periodo de latencia al alcanzar un estado de equilibrio estacionario eran diferentes: 0,904h (54min.) para mucosa fresca y 0,823h (49min.) para mucosa congelada.

El periodo de latencia es relativamente corto, indicando que el ratio de permeación del propranolol a través de la mucosa fresca o congelada es adecuado.

La mediana del flujo del propranolol encontrada fue entre 571,3 y 439,9 $\mu\text{g}/\text{hcm}^2$ respectivamente para mucosa fresca y congelada del mismo sujeto.

De estos resultados fue posible obtener valores de flujo fiables de propranolol y una buena representación del proceso de permeación.

No hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la constante de permeabilidad (K_p), el periodo de latencia (T_l) ó el flujo (J) entre los valores de permeación del propranolol de mucosa bucal porcina fresca y congelada.

Los resultados indican que este método no influye en los parámetros biofarmacèuticos de permeabilidad entre mucosa bucal porcina del mismo sujeto.

También se realizó una valoración sobre las concentraciones terapéuticas predichas en equilibrio (C_{ss}) asumiendo un área de aplicación de la mucosa de 9 cm^2 y un aclaramiento plasmático (Cl_p) de 60 l/h para el propranolol (Riddell et al, 1987). Usando la mediana J se obtiene $517,3 \mu\text{g}/\text{hcm}^2$ (mucosa fresca) o $434,9 \mu\text{g}/\text{hcm}^2$ (mucosa congelada). Se obtuvieron valores de las concentraciones terapéuticas predichas en equilibrio (C_{ss}) del propranolol de $0,077 \mu\text{g}/\text{ml}$ (m. fresca) y $0,065 \mu\text{g}/\text{ml}$ (m. congelada)

Los estudios histológicos mostraron similitudes estructurales entre mucosa bucal fresca y congelada con un epitelio estratificado escamoso soportado por un tejido conectivo fibroso (lamina propia y submucosa). Se observó una descamación superficial en los tejidos congelados (Fig. 3B) pero sin alteraciones en la morfología celular y estructura del epitelio.

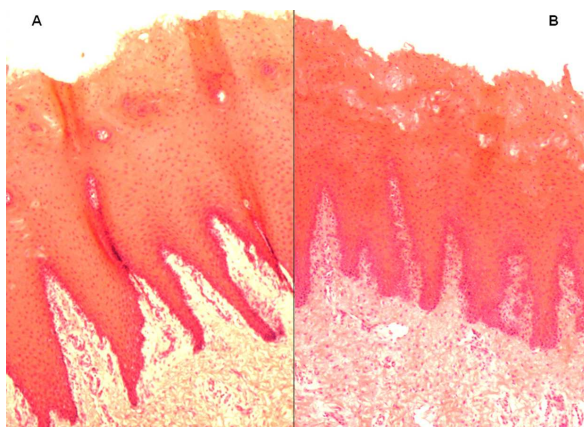


Figura 26.- Microphotographs of formalin-fixed paraffin embedded cross-sections of porcine buccal mucosae. Fresh (A) and after freezing process (B). Magnification 40

Los datos recogidos sugieren que la mucosa bucal congelada en una mezcla de PBS conteniendo un 10% de DMSO y un 4% de albumina, no sufre alteraciones en sus propiedades de barrera permeable corroborando los resultados de permeación ex vivo.

Continuando con nuestra línea de trabajo, vimos que la mayor limitación en el desarrollo de un sistema de administración de fármacos por vía bucal podría ser el bajo paso de fármacos a través de la mucosa bucal.

No se encuentra en la búsqueda bibliográfica ningún estudio de permeación de doxepina a través de mucosa bucal.

Dado que la mucosa bucal porcina es uno de los modelos normalmente más utilizados para simular el epitelio bucal humano (van Eyk and van der Bijl, 2004), nosotros medimos el flujo de la doxepina y el coeficiente de permeabilidad a través de la mucosa del cerdo cortada a $500 \pm 50 \mu\text{m}$.

Los métodos de modelización y simulación para predecir el comportamiento in vivo de los fármacos pueden mejorar en gran medida las estrategias de formulación, ayudando a los científicos en un enfoque racional para el desarrollo de formulaciones (Jiang et al, 2011). El perfil de permeación de la doxepina a través de la mucosa bucal porcina se obtuvo por la representación de la cantidad acumulada permeada frente al tiempo.

Para estudiar la capacidad intrínseca de la doxepina para pasar a través de la mucosa bucal, se utilizó una solución saturada filtrada ($C_0 = 110,3\text{mg/ml}$) para obtener la máxima actividad termodinámica de acuerdo con la suposición de que un soluto en una solución a saturación tiene una actividad termodinámica similar a la de su estado puro.

La doxepina permeó pobremente a través de la mucosa bucal, después de 6h

($Q_6 = 5,25\% \pm 2,5$) El perfil de permeación indicó que se mantuvo la integridad de la mucosa durante todo el estudio y exhibió una tendencia lineal 3h después del inicio del estudio. Este hallazgo nos puede dar idea de que la fatiga reportada debida a la acción central de la doxepina exhibida por un grupo de pacientes a los que se les administró un enjuague oral de doxepina para tratar el dolor de la mucositis podría ser debido a la permeación sublingual del fármaco en vez de permeación por la zona de las mejillas (Epstein, 2008). La permeabilidad en la región detrás de los labios es significativamente mayor en comparación con la de la región de las mejillas, porque en la mucosa bucal porcina, el epitelio actúa como una barrera de permeabilidad y el grosor del epitelio de la mejilla es mayor que el de la región detrás de los labios (Harris and Robinson, 1992)

De esta manera, si queremos lograr un efecto sistémico es necesario el uso de potenciadores de la penetración para conseguir una mejora de la penetración bucal.

Sin embargo, el efecto analgésico/anestésico en la cavidad oral esta motivado por su efecto local. La duración del efecto anestésico del enjuague con doxepina es corto, seguido de un periodo de analgesia más prolongado (Epstein y cols.2003).

Por lo tanto, a fin de prolongar esta duración, el tiempo de permanencia en la boca debe ser incrementado por la aplicación de una forma de dosificación diferente al enjuague bucal.

Los parámetros cinéticos de permeación de la doxepina se presentan en la tabla 5.

El flujo se obtuvo en el estado estacionario a partir de la pendiente del tramo lineal del gráfico de doxepina permeada frente al tiempo.

También se calculó el flujo en función del área de la superficie de la mucosa utilizada (0,636 cm²). El tiempo transcurrido antes de alcanzar el estado de equilibrio se le designó como tiempo de latencia T₁(h) .

El coeficiente de permeabilidad fue obtenido dividiendo el valor del flujo entre la concentración del fármaco en el compartimento donador. El valor de la mediana del flujo observado fue de 34.79 mg/h y el periodo de latencia de 2,8 horas con un coeficiente de permeabilidad de 0.49 – 10,3 (cm/h).

Tabla 5 - Parámetros de permeación para solución saturada de doxepina

Parámetros permeación	Mediana	Mínimo	Máximo
Flujo (µg/h)	34,79	10,16	426,54
Flux/sup (µg/cm ² h)	54,7	15,98	670,66
T ₁ (h)	2,8	1,47	3,36
Co (µg/ml)	110392	110392	110392
K _p ·10 ⁻³ (cm/h)	0,49	0,14	6,08

T₁: tiempo de latencia ; Co: concentración inicial; K_p: Constante de permeabilidad

En la administración de fármacos por vía bucal, las propiedades de barrera de la mucosa son dependientes de las propiedades estructurales y fisicoquímicas, tanto del tejido oral como de los principios activos.

La mayor resistencia a la permeación de la mucosa oral no queratinizada reside en el epitelio externo, en particular en los lípidos intracelulares segregados por los gránulos de recubrimiento de membrana. Estos son orgánulos esféricos o ovoides de 100-300nm de diámetro (Hayward, 1979).

La disposición de estos lípidos es bastante irregular, con solo un componente menor organizado en laminillas que parece ser relacionado con la barrera de permeabilidad (Diaz Del Consuelo y cols. 2005b).

Teniendo en cuenta un aclaramiento plasmático de la doxepina (Clp) de 1000ml/min (Sandig y col, 2013) y usando la J_s previamente calculada (tabla 5), la mediana de la concentración de plasma bajo condiciones de estado estacionario fue de 46ng/ml.

Conforme a estos datos, pequeñas cantidades de doxepina aplicada vía tópica serían absorbidas, siendo las concentraciones en suero significativamente por debajo del rango terapéutico necesario para actuar como agente tricíclico sobre el SNC (150-250ng/ml) (Drake et al 1999) (Demling, 2001). Sin embargo, debe tenerse en cuenta la ausencia de microcirculación de la mucosa ex vivo en estos estudios experimentales, podría haber dificultado una mayor difusión de la doxepina a través de las capas inferiores hacia la cámara receptora. Esta sugerencia se confirmó con los resultados obtenidos a partir de la extracción y cuantificación del fármaco atrapado en la membrana al final del experimento. La mediana de la cantidad de doxepina retenida en la membrana mucosa era de $0,24\mu\text{g}/\text{cm}^2/\mu\text{g}$ (0,06-0,75). La mucosa bucal es considerablemente menos permeable que el área sublingual y generalmente no es capaz de proporcionar una velocidad de absorción y biodisponibilidad como la observada en la administración sublingual. De hecho, el término “bucal” aunque a veces, erróneamente se utiliza para indicar la totalidad de la mucosa de la cavidad oral, se refiere a la mucosa de la mejilla y la de los labios superior e inferior, que representan un tercio de la superficie mucosa oral total (Rossi et al, 2005).

Los estudios también han demostrado una función de reservorio de la mucosa bucal con una retención del fármaco y una lenta transferencia a la circulación sistémica.

Este hecho promueve condiciones óptimas para la acción local de la doxepina que de otro modo podría dar lugar a efectos centrales indeseables (Fernández Campos y cols, 2012) (Martín y cols, 2012). Las muestras de mucosa sometidos a la difusión de la doxepina no mostraron alteraciones significativas en la morfología celular ni en la estructura del epitelio.

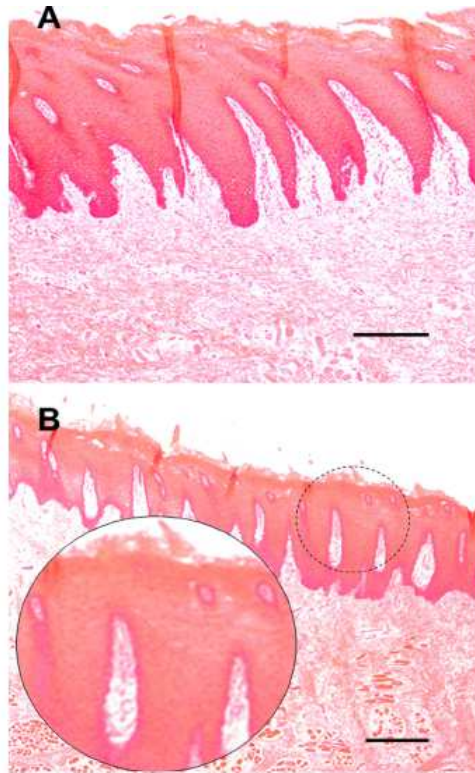


Fig. 2. Microphotographs of formalin-fixed, paraffin embedded cross-sections of porcine buccal mucosa. Control untreated (A). Sample subjected to permeation of doxepin (B). Bars length 500 μ m.

Figura 27 - Microfotografía

No se encontró ningún signo de flogosis en las mucosas tratadas. Se aprecian las células unidas juntas en las diferentes capas del epitelio escamoso no queratinizado estratificado sin la presencia de espacios intercelulares (Figura 27).

El tejido subepitelial aparece denso, irregular y rico en fibras de colágeno con vasos sanguíneos, estructuras nerviosas y vasos de glándulas secretoras.

También se pueden observar secciones transversales de haces de músculo esquelético separadas por tabiques de tejido conectivo y algo de tejido adiposo.

Aparecen unidades secretoras de las glándulas salivales, en su mayoría de tipo mucoso.

En algunos lugares, estas unidades secretoras están rodeadas por fibras musculares.

Sólo se observan en las capas más superficiales una descamación superficial.

Se encontraron diferencias en las capas subepitelial, muscular y glandular debidas a una variabilidad individual y no provocadas por la acción de permeación de la doxepina.

Estos cambios individuales están probablemente relacionados con la manipulación de la muestra para su observación al microscopio.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

5.1 - CONCLUSIONES

- En este estudio se ha desarrollado y caracterizado una nueva nanoemulsión de aceite en agua para la liberación transdérmica de imipramina y doxepina, siendo la mejor la que consiste en un 45% de fase acuosa, 40% mezcla de surfactantes y un 15% de fase oleosa.
- Estudios in vitro para evaluar el comportamiento de la permeación y predecir las concentraciones plasmáticas, concluyen que la aplicación tópica de una nanoemulsión cargada con imipramina y doxepina es segura para su efecto local.
- La actividad in vivo analgésica y antialodínica resulta ser superior para la doxepina, lo que demuestra que una nanoemulsión conteniendo doxepina puede ser prometedora como terapia analgésica alternativa.
- Los datos recogidos en el estudio de crioconservación sugieren que la mucosa bucal congelada en una mezcla de PBS conteniendo un 10% de DMSO y un 4% de albumina, no sufre alteraciones en sus propiedades de barrera permeable corroborando los resultados de permeación ex vivo.
- El método de congelación propuesto puede representar un enfoque más barato y más simple para el estudio de otras rutas de administración de fármacos o nuevos sistemas de liberación de fármacos obviando la necesidad de utilizar la mucosa bucal porcina fresca para multitud de fármacos.
- Se ha propuesto un método no invasivo de evaluación de la integridad de la mucosa bucal, tanto fresca como congelada, basado en el parámetro Transmucosal water loss (TMWL).
- Los estudios de permeación bucal ex vivo de doxepina demuestran que este fármaco posee una baja capacidad intrínseca de permeación bucal.
- La retención óptima de doxepina en el tejido bucal garantizaría el potencial efecto anestésico/ analgésico evitando efectos centrales debido a la absorción sistémica, siendo de posible utilidad en terapias oncológicas, ayudando a minimizar los efectos secundarios provocados tras quimio y radioterapia.
- Se deberán emplear potenciadores de la penetración si se quiere que lleguen cantidades de doxepina a la circulación sistémica para ejercer su acción, debiéndose realizar nuevos estudios ex vivo para analizar el posible daño potencial, tanto químico como físico, que estos potenciadores puedan realizar en la mucosa.

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFIA

6.1 - BIBLIOGRAFIA

- Acosta E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2009;14(1):3-15.
- Al-Khamis K, Davis SS, Hadgraft J. Microviscosity and drug release from topical. Gel formulations. *Pharmaceutical Research* 1986;3(4):214-217.
- Alsarra IA, Alanazi FK, Mahrous GM, Abdel Rahman AA, Al Hezaimi KA. Clinical evaluation of novel buccoadhesive film containing ketorolac in dental and post-oral surgery pain management. *Pharmazie* 2007;62(10):773-778.
- Araujo FA, Kelmann RG, Araujo BV, Finatto RB, Teixeira HF, Koester LS. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. *Eur J Pharm Sci* 2011;42(3):238-245.
- Aungst BJ, Blake JA, Rogers NJ, Hussain MA. Transdermal oxymorphone formulation development and methods for evaluating flux and lag times for two skin permeationenhancing vehicles. *J Pharm Sci* 1990;79(12):1072-1076.
- Aungst BJ. Fatty acid as skin permeation enhancers. In: Smith EW, Maibach HI, editors. *Percutaneous Penetration Enhancers* FL: CRC Press, Boca Raton; 1995. p.277.
- Baboota S, Shakeel F, Ahuja A, Ali J, Shafiq S. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. *Acta Pharm* 2007;57(3):315-332.
- Barry BW. Action of skin penetration enhancers-the Lipid Protein Partitioning theory. *Int J Cosmet Sci* 1988;10(6):281-293.
- Barry BW. Methods for studing percutaneous absorption In: Barry BW, editor. *Dermatological formulation* New York: Marcel Dekker; 1983. p. 234-295.
- Barry BW. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *Journal of controlled release* 1987;6:85-97.

Bell M. D. D. et al. Lancet, 1.73 (1985) 102- 115

Bivas-Benita M, Oudshoorn M, Romeijn S, van Meijgaarden K, Koerten H, van der Meulen H, et al. Cationic submicron emulsions for pulmonary DNA immunization. J Control Release 2004; 100(1):145-155.

Blanco,E, Espinosa JM, Marcos H, .Rodriguez MJ, Guía de buena práctica clínica en dolor y su tratamiento. Ministerio de Sanidad y Consumo (2005)

Bonina FP, Montenegro L, Micali G, West DP, Palicharla P, Koch RL. In vitro percutaneous absorption evaluation of phenobarbital through hairless mouse, adult and premature human skin. International journal of pharmaceutics 1993;98 (1-3):93-99

Burkman RT. The transdermal contraceptive patch: a new approach to hormonal contraception. International Journal of Fertility and Women's Medicine 2002; 47(2):69-76.

Calpena A C, Beatriz Clares and Francisco Fernandez Technological, biopharmaceutical and Pharmacokinetic advances: New formulations of application on the skin and oral mucosa, Recent Advances in Pharmaceutical Sciences, 2011: 175-198

Carelli V, Di Colo G, Nannipieri E, Serafini MF. Enhancement effects in the permeation of alprazolam through hairless mouse skin. International journal of pharmaceutics 1992;88:89-97.

Carelli V, Di Colo G, Nannipieri E, Serafini MF. Enhancement effects in the permeation of alprazolam through hairless mouse skin. International journal of pharmaceutics 1992;88:89-97.

Cevc G, Blume G, Schätzlein A, Gebauer D, Paul A. The skin: a pathway for systemic treatment with patches and lipid-based agent carriers. Advanced Drug Delivery Reviews 1996;18(3):349-378.

- Challacombe SJ, Rahman D, O'Hagan DT. Salivary, gut, vaginal and nasal antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles. *Vaccine* 1997;15(2):169-175.
- Choi MJ, Maibach HI. Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems. *Skin Pharmacol Physiol* 2005;18(5):209-219.
- Clares B, Gallardo V, Medina MM, Ruiz MA. Multilamellar liposomes of triamcinolone acetonide: preparation, stability, and characterization. *J Liposome Res* 2009;19(3):197-206.
- Clifford J. Woolf, MD, Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Physiology in medicine: a series of articles linking medicine with science Ann Intern Med.* 2004;140:441-451.
- Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence *Pain* 1993; 9:259-285
- Costa D, Baños JE. Contribución del sistema nervioso central a la fisiopatología del dolor neuropático. *Med Clin (Barc)* 1993;101:591-595
- Cousido MC, Tomas Carmona I, Garcia-Caballero L, Limeres J, Alvarez M, Diz P. In vivo substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. *Clin Oral Investig* 2010;14(4):397-402.
- Date AA, Nagarsenker MS. Design and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for cefpodoxime proxetil. *Int J Pharm* 2007; 329(1-2):166-172.
- Davis B.J. y col. (1979) Alur HH, Johnston TP, Mitra AK. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Marcel Dekker Inc; 2001:141-166
- Devarajan V, Ravichandran V. Nanoemulsions: as modified drug delivery tool *Pharmacie Globale (IJCP)* 2011;4(01).

- Djordjevic L, Primorac M, Stupar M, Krajisnik D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *Int J Pharm* 2004; 271(1-2):11-19.
- du Plessis J, Pugh WJ, Judefeind A, Hadgraft J. Physico-chemical determinants of dermal drug delivery: effects of the number and substitution pattern of polar groups. *Eur J Pharm Sci* 2002;16(3):107-112.
- Dubey V, Mishra D, Asthana A, Jain NK. Transdermal delivery of a pineal hormone: melatonin via elastic liposomes. *Biomaterials* 2006;27(18):3191-3496.
- Dubey V, Mishra D, Nahar M, Jain V, Jain NK. Enhanced transdermal delivery of an anti-HIV agent via ethanolic liposomes. *Nanomedicine* 2010; 6(4):590-596.
- Dubois JJ, Uso de antidepresivos como coadyuvantes en el tratamiento del dolor crónico, 2006: 214-238
- Elia J, Wilson Z, La Porta LS, Algon SA, Prowler ML, Cartwright ST, et al. Methylphenidate transdermal system: clinical applications for attention deficit/hyperactivity disorder. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2011; 4(3):311-328.
- Elias PM, Cooper ER, Korc A, Brown BE. Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition. *J Invest Dermatol* 1981; 76(4):297-301.
- Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983; 80 Suppl: 44s-49s.
- Epstein JB, Schubert MM, Oropharyngeal mucositis in cancer therapy. Review of pathogenesis, diagnosis and management. *Oncology* 2003; 17; 1767-79
- Feldmann RJ, Maibach HI. Penetration of 14c Hydrocortisone through Normal Skin: the Effect of Stripping and Occlusion. *Arch Dermatol* 1965; 91:661-666.
- Galan G, Torres I, Aplicaciones de la Biofarmacia y Farmacocinética en el desarrollo y control de medicamentos , mayo 2012 -UB

- Galer BS, Gammaitoni AR, Oleka N, Jensen MP, Argoff CE. Use of the lidocaine patch 5% in reducing intensity of various pain qualities reported by patients with low-back pain. *Curr Med Res Opin* 2004; 20 Suppl 2:S5-12.
- Galey WR, Lonsdale HK, Nacht S. The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water. *J Invest Dermatol* 1976; 67(6):713-717.
- Ganta S, Deshpande D, Korde A, Amiji MM. A review of multifunctional nanoemulsion systems to overcome oral and CNS drug delivery barriers. *Mol Membr Biol* 2010;27(7):260-273.
- Gerner P, Srinivasa V, Zizza A.M., Zhuang Z.Y, Luo S.H, Zurakowski D, Eappen S, Wang GK, *Anesth. Analg.* 102 , 2006 ; 283-287
- Goebel C, Hewitt NJ, Kunze G, Wenker M, Hein DW, Beck H, et al. Skin metabolism of aminophenols: human keratinocytes as a suitable in vitro model to qualitatively predict the dermal transformation of 4-amino-2-hydroxytoluene in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 235(1):114-123.
- Gonzalez-Mira E, Nikolic S, Garcia ML, Egea MA, Souto EB, Calpena AC. Potential use of nanostructured lipid carriers for topical delivery of flurbiprofen. *J Pharm Sci* 2011; 100(1):242-251.
- Gore AV, Chien YW. The nicotine transdermal system. *Clin Dermatol* 1998; 16(5): 599-615
- Guglielmini G. Nanostructured novel carrier for topical application. *Clin Dermatol* 2008; 26(4):341-346.
- Hearnden V, Sankar V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr AR, et al. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012; 64(1):16-28.
- Idson B. Percutaneous absorption . *Journal of pharmaceutical sciences* 1975;64(6):901-924.

- Innocenti M, Moscatelli G, Lopez S. Efficacy of gelclair in reducing pain in palliative care patients with oral lesions: preliminary findings from an open pilot study. *J Pain Symptom Manage* 2002;24(5):456-457.
- Izquierdo P, Feng J, Esquena J. The influence of surfactant mixing ratio on nanoemulsion formation by the PIT method. *Journal of colloid and interface science* 2005; 285:388-394.
- Jacobi U, Tassopoulos T, Surber C, Lademann J. Cutaneous distribution and localization of dyes affected by vehicles all with different lipophilicity. *Arch Dermatol Res* 2006; 297(7):303-310.
- James L. et col Doxepin rinse versus placebo in the tractament of acute oral mucositis pain in patients receiving head and neck radiotherapy with or without chemotherapy: a phase III,randomized,double- blind trial . *Journal of Clinical Oncology* Vol 32 (15): may 2014 :224-235
- Kandimalla K, Kanikkannan N, Andega S, Singh M. Effect of fatty acids on the permeation of melatonin across rat and pig skin in-vitro and on the transepidermal wáter loss in rats in-vivo. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51(7):783-790.
- Kelmann RG, Kuminek G, Teixeira HF, Koester LS. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. *Int J Pharm* 007; 342(1- 2):231-239.
- Khosravi P, del Castillo A, Pérez Manga G. Manejo del dolor An. Med. Interna (Madrid) Vol. 24. nº11 554-557, 2007
- Kim CK, Kim JJ, Chi SC, Schim CK. Effect of fatty acids and urea on the penetration of ketoprofen through rat skin. *International journal of pharmaceutics* 1993; 99:109-118.
- Kim MK, Lee CH, Kim DD. Skin permeation of testosterone and its ester derivatives in rats. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52(4):369-375.

- Klang V, Matsko NB, Valenta C, Hofer F. Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron* 2012;43(2-3):85- 103.
- Kogan A, Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv Colloid Interface Sci* 2006; 123-126:369-385.
- Korzeniewska-Rybicka I, Plaznik A. Analgesic effect of antidepressant drugs. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998; 59(2): 331-338.
- Koyama Y, Bando H, Yamashita F, Takakura Y, Sezaki H, Hashida M. Comparative analysis of percutaneous absorption enhancement by d-limonene and oleic acid based on a skin diffusion model. *Pharm Res* 1994; 11(3):377-383.
- Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *advanced drug delivery reviews* 2002;54 Suppl 1:S77-98.
- Kumar M, Misra A, Babbar AK, Mishra AK, Mishra P, Pathak K. Intranasal nanoemulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone. *Int J Pharm* 2008; 358(1-2):285-291.
- Kumar M, Misra A, Pathak K. Formulation and characterization of nanoemulsion of olanzapine for intranasal delivery. *PDA J Pharm Sci Technol* 2009;63(6):501-511.
- Lippold BC. How to optimize drug penetration through the skin. *Pharm Acta Helv* 1992; 67(11):294-300.
- Lopez Timoneda F, Definición y Clasificación del Dolor, Servicio de Publicaciones UCM Madrid 1996: 49-55
- Lu GW, Gao P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. In: Kulkarni V, editor. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*: elsevier; 2010. p. 59-94.
- Madhav NV, Shakya AK, Shakya P, Singh K. Orotransmucosal drug delivery systems: A review. *J Control Release* 2009; 140(1):2-11.

- Manosroi A, Kongkaneromit L, Manosroi J. Characterization of amphotericin B liposome formulations. *Drug Dev Ind Pharm* 2004; 30(5):535-543.
- McCleane G. Analgésicos por vía tópica. *Anesthesiol Clin* 7. N A. 2007; 25: 825-839.
- Micó JA, Ardid D, Berrocoso E, Eschaliér A. Antidepressants 6. and pain. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27(7): 348-354.
- Mistry A, Stolnik S, Illum L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int J Pharm* 2009; 379(1):146-157.
- Montagna W. *The Structure and Function of Skin*. 2nd ed. New York: Academic Press; 1961.:42-66
- Moreno-Brea M^aR., Micó JA, Criterios de utilización que se siguen y cuáles son los antidepresivos a emplear en el dolor neuropático, *Revista de la SED*: 43-44
- Muller RH, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *advanced drug delivery reviews* 2007;59(6):522-530.
- Myc A, Vanhecke T, Landers JJ, Hamouda T, Baker JR,Jr. The fungicidal activity of novel nanoemulsion (X8W60PC) against clinically important yeast and filamentous fungi. *Mycopathologia* 2002; 155(4):195-201.
- Nachum Z, Shupak A, Gordon CR. Transdermal scopolamine for prevention of motion sickness : clinical pharmacokinetics and therapeutic applications. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45(6):543-566.
- Nicolaos G, Crauste-Manciet S, Farinotti R, Brossard D. Improvement of cefpodoxime proxetil oral absorption in rats by an oil-in-water submicron emulsion. *Int J Pharm* 2003; 263(1-2):165-171.
- Onghena P, Van Houdenhove B. The antidepressant-4. induced analgesic effects. *Bailliere Clin Anaes*. 1998; 12(1): 53-68.

- Park I, Kim D, Song J, In CH, Jeong SW, Lee SH, et al. Buprederm, a new transdermal delivery system of buprenorphine: pharmacokinetic, efficacy and skin irritancy studies. *Pharmaceutical research* 2008; 25(5):1052-1062.
- Peter C, Watson N. Antidepressant drugs as adjuvant 2. analgesics. *J Pain and Symptom Manag.* 1994; 9(6): 392-405.
- Peterson DE. New strategies for management of oral mucositis in cancer patients. *J Support Oncol* 2006; 4 (2):9-13
- Pinto JF. Site-specific drug delivery systems within the gastro-intestinal tract: from the mouth to the colon. *Int J Pharm* 2010; 395(1-2):44-52.
- Potts RO, Golden GM, Francoeur MI, Mak V, Guy RH. Mechanism and enhancement of solute transport across the stratum corneum. *Journal of controlled release* 1991; 15:249- 260.
- Puebla Diaz F, Tipos de dolor y escala terapèutica de la OMS. *Dolor iatrogènic. Oncologia radioteràpica*, 2005; 28 (3): 139-143
- Puyal M,,Jimenez C,Chimenos E,López J, Juliá A . Protocolo de estudio y tratamiento de la mucositis bucal en los pacientes con hemopatias malignas. *Med. Oral* 2003; 8: 10-18
- H.P. Rang, M.M Dale, J.M. Ritter, *Farmacologia* 4ª edición Ed. Harcourt 278-299
- Ramalingam K, Amaechi BT, Ralph RH, Lee VA. Antimicrobial activity of nanoemulsion on cariogenic planktonic and biofilm organisms. *Arch Oral Biol* 2012; 57(1):15-22.
- Rao J, McClements DJ. Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method. *J Agric Food Chem* 2011; 59(9):5026-5035.
- Rao SVR, Agarwal P, Shao J. Selfnanoemulsifying drug delivery system (SNEEDS) for oral delivery of protein drugs. II. In vitro transport study. *International journal of pharmaceutics* 2008; 362:10-15.

- 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): 55-67
- Ravi TPU, Padma T. Nanoemulsions for drug delivery through different routes. *Research in Biotechnology* 2011;2(3):1-13.
- Rodriguez IC, Cerezo A, Salem II. Sistemas de liberación bioadhesivos *Ars Pharmaceutica* 2000; 41(1):115-128.
- Romera E, Perena MJ, Perena MF, Rodrigo MD, Neurofisiología del dolor *Rev.Soc.Esp.Dolor* 7:Supl. II, 2000: 11-17
- Rough-Yee Hana, Jia-You Fangb, K.C. Sunga, Oliver Y.P. Huc , Mucoadhesive buccal disks for novel nalbuphine prodrug controlled delivery: effect of formulation variables on drug release and mucoadhesive performance *International Journal of Pharmaceutics* Volume 177, Issue 2, 25 January 1999, Pages 201–209
- Ruiz-Esquide G, Nervi B, Vargas A, Maiz A. Tratamiento y prevención de la mucositis oral asociada al tratamiento del cancer. *Rev. Med. Chile* 2011; 139:373-381
- Sabater Recolons MM, Rodriguez de Rivera Campillo ME, López López J, Chimenos Küstner E , Manifestaciones orales secundarias al tratamiento oncológico. *Pautas de actuación odontológica Av. Odontoestomatología* 2006 22 (6): 335-342
- Salamat-Miller N, Chittchang M, Johnston TP. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *advanced drug delivery reviews* 2005;57(11):1666-1691.
- Sankar V, Hearnden V, Hull K, Juras DV, Greenberg M, Kerr AR, et al. Local drug delivery for oral mucosal diseases: challenges and opportunities. *Oral Dis* 2011;17 Suppl 1:73-84.
- Santos-Magalhaes NS, Pontes A, Pereira VM, Caetano MN. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *Int J Pharm* 2000; 208(1-2):71- 80.

- Santoyo S, Arellano A, Ygartua P, Martin C. In vitro percutaneous absorption of piroxicam through synthetic membranes and abdominal rat skin. *Pharm Acta Helv* 1996; 71(2):141-146.
- Save T, Shah MU, Ghamande AR, Venkitachalam P. Comparative study of buccoadhesive formulations and sublingual capsules of nifedipine. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46(3):192-195.
- Scheuplein RJ, Blank IH. Permeability of the skin. *Physiol* 1971;51: 702-747.
- Şenela S, M.J Kremerb, S Kaşa, P.W Wertz, A.A Hincala, C.A Squierb , Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across buccal mucosa *Biomaterials* Volume 21, Issue 20, October 2000, Pages 2067–2071
- Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK, Ali M. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 66(2):227-243.
- Shakeel F, Ramadan W, Gargum HM, Singh R. Preparation and in vivo evaluation of indomethacin loaded true nanoemulsions. *Sci Pharm.* 2010; 78(1): 47–56.
- Shim J, Kim MJ, Kim HK, Kim DH, Oh SG, Ko SY, et al. Morphological effect of lipid carriers on permeation of lidocaine hydrochloride through lipid membranes. *Int J Pharm* 2010; 388(1-2):251-256.
- Shojaei AH. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *Journal of pharmaceutical sciences* 1998; 1(1):15-30.
- Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2005; 10:102-110.
- Sole I, Pey CM, Maestro A, Gonzalez C, Porras M, Solans C, et al. Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: preparation variables and scale up. *J Colloid Interface Sci* 2010; 344(2):417-423.
- Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK. Buccal bioadhesive drug delivery a promising option for orally less efficient drugs. *J Control Release* 2006; 114(1):15-40.

- Sudoh Y, Cahoon EE, Gerner P. Tricyclic antidepressant as long acting local anesthetics. *Pain*. 2003; 103: 49-55.
- Sutariya VB, Mashru RC, Sankalia MG y Sankalia JM, Transbuccal delivery of salbutamol sulphate: In vitro determination of routes of buccal transport *Ars Pharm* 2005; 46 (4): 337-352.
- Tamilvanan S, Benita S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58(2):357-368.
- Tanner T, Marks R. Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. *Skin Res Technol* 2008; 14(3):249-260.
- Tanojo H, Bouwstra JA, Junginger HE, Bodde HE. In vitro human skin barrier modulation by fatty acids: skin permeation and thermal analysis studies. *Pharm Res* 1997; 14(1):42-49.
- Taylor LJ, Lee RS, Long M, Rawlings AV, Tubek J, Whitehead L, et al. Effect of occlusion on the percutaneous penetration of linoleic acid and glycerol. *Int J Pharm* 2002; 249(1-2):157-164.
- Tendillo F.J., Capacés JF, Manejo del dolor en el perro y el gato *TemisNetwork SL* 2001: 5-18
- Thomas BJ, Finnin BC. The transdermal revolution. *Drug Discov Today* 2004; 9(16):697- 703.
- Tian J, Gu Y, Su D, Wu Y, Wang X, *Eur.J. Pain* 13, 2009; 130-137
- Tiwari SB, Amiji MM. Improved oral delivery of paclitaxel following administration in nanoemulsion formulations. *J Nanosci Nanotechnol* 2006; 6(9-10):3215-3221.
- Travé Rodríguez AL, Reneses Sacristán A. Manejo de los fármacos en el tratamiento de la depresión *Sistema Nacional de Salud Vol 26-nº 1*. 2002:11-20
- Tsai TF, Maibach HI. How irritant is water? An overview. *Contact Dermatitis* 1999; 41(6):311-314.

- Tura B, Tura SM. The analgesic effect of tricyclic 1. antidepressant. *Brain Res.* 1990; 518:19-22
- Valenta C, Wanka M, Heidlas J. Evaluation of novel soya-lecithin formulations for dermal use containing ketoprofen as a model drug. *Journal of controlled release* 2000; 63(1-2):165-173.
- Vyas TK, Shahiwala A, Amiji MM. Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations. *Int J Pharm* 2008; 347(1-2):93-101.
- Walker M, Hadgraft J. Oleic acid - a membrane fluidiser or fluid within the membrane. *International journal of pharmaceutics* 1991; 71:R1-R4.
- Washington N, Washington C, Wilson C.G.: *Physiological Pharmaceutics*, Ed. Taylor and Francis London, 2002 : 37-58
- Wertz PW. The nature of the epidermal barrier: biochemical aspects. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1996; 18:283-294.
- Wester RC, Maibach HI. Regional Variation in Percutaneous Absorption In: Bronaugh RL, Maibach HI, editors. *Percutaneous Absorption Drugs, Cosmetics, Mechanisms, Methods*. 4th ed. New York: Marcel Dekker Inc.; 1999. p. 219.
- Wilkes GL, Brown IA, Wildnauer RH. The biomechanical properties of skin. *CRC Critical Reviews in Bioengineering* 1973; 1(4):453-495.
- Wu H, Ramachandran C, Weiner ND, Roessler BJ. Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions. *Int J Pharm* 2001; 220(1-2):63-75.
- Yamahara H, Lee VHL. Drug metabolism in the oral cavity. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1993; 12:25-40.
- Yamashita F, Koyama Y, Kitano M, Takakura Y, Hashida M. Analysis of in vivo skin penetration enhancement by oleic acid based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum. *International journal of pharmaceutics* 1995; 117(2):173-179.

Yukari Sudoh et col. Tricyclic antidepressants as long-acting local anesthetics, *Pain* 103 (2003) 49-55

Zhou H, Yue Y, Liu G, Li Y, Zhang J, Gong Q, et al. Preparation and characterization of a lecithin nanoemulsion as a topical delivery system. *Nanoscale Res Lett* 2009; 5(1):224- 230.

Zhu W, Yu A, Wang W, Dong R, Wu J, Zhai G. Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir. *Int J Pharm* 2008; 360(1-2):184-190.

